

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Igor V. Pantić

**FRAKTALNA I TEKSTURALNA ANALIZA  
STRUKTURNE KOMPLEKSNOŠTI  
NUKLEUSNOG HROMATINA  
U POSTNATALNOM RAZVOJU  
I STARENJU**

doktorska disertacija

**Beograd, 2013**

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Igor V. Pantić

**FRACTAL AND TEXTURAL ANALYSIS  
OF NUCLEAR CHROMATIN  
STRUCTURAL COMPLEXITY  
IN POSTNATAL DEVELOPMENT  
AND AGING**

Doctoral Dissertation

**Belgrade, 2013**

**Mentor:**

Prof. dr Gordana Basta-Jovanović, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

**Komentor:**

Prof. dr Vesna Starčević, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

**Komisija:**

1. Prof. dr Vladimir Trajković, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet.
2. Prof. dr Slavica Suzić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
3. Prof. dr Nebojša Milošević, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
4. Prof. dr Ivana Novaković, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
5. Akademik Prof. dr Ljubisav Rakić, Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd.

# FRAKTALNA I TEKSTURALNA ANALIZA STRUKTURNE KOMPLEKSNOŠTI NUKLEUSNOG HROMATINA U POSTNATALNOM RAZVOJU I STARENJU

## REZIME

Prethodne studije su utvrdile da tokom starenja veliki broj bioloških struktura kao što su tkiva i organi gubi svoju kompleksnost i da takav gubitak vodi smanjenoj sposobnosti adaptacije na fiziološki stres. Međutim, za sada nema podataka da li se slične strukturne promene dešavaju na individualnim ćelijama i njihovom genetskom materijalu.

Strukturna kompleksnost se može kvantifikovati na nekoliko načina. Skorašnje studije su utvrdile da hromatin, kao i mnoge druge biološke strukture u svojoj morfologiji ispoljavaju karakteristike fraktala. Koncept fraktala se u osnovi bazira na principu samosličnosti, odnosno na činjenici da manji delovi nekog fizičkog ili biološkog sistema nalikuju sistemu kao celini. Kompleksnost fraktalnih struktura se može meriti određivanjem fraktalne dimenzije i lakunarnosti kao dva najznačajnija parametra fraktalne analize. Kao dodatak fraktalnoj analizi, danas se često koristi i teksturalna analiza uz pomoć koje se mogu odrediti parametri teksturalne heterogenosti i neuređenosti biološke strukture kao što je entropija. U našoj studiji, na mišijem eksperimentalnom modelu, ispitivane su starosne promene u strukturnoj kompleksnosti nukleusnog hromatina na ukupno 10 ćelijskih populacija u timusu, slezini, bubregu i jetri. Takođe su opisane

promene u kompleksnosti nukleusne strukture na kulturi ćelija nakon indukcije DNK oštećenja UV zračenjem.

Istraživanje je obavljeno na 80 miševa muškog pola, poreklom iz Vivarijuma za eksperimentalne životinje Instituta za Medicinsku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Pilot istraživanje je obavljeno na grupi od 16 miševa u kojoj je prva životinja bila novorođena, a svaka sledeća životinja je bila 30 dana starija od prethodne (najstarija životinja je bila stara 450 dana). Glavni deo istraživanja na eksperimentalnim životinjama je sproveden na ukupno 64 životinje podeljene u 8 starosnih grupa (n=8): 0, 10, 20, 30, 120, 210, 300 i 390 dana.

Eksperimentalni protokol je dizajniran po sledećoj proceduri: merenje telesne mase, žrtvovanje životinja cervikalnom dislokacijom, ekstirpacija timusa, slezine, bubrega i jetre, fiksiranje u Carnoy fiksativu, kalupljenje u Paraplastu, pravljenje isečaka debljine 5  $\mu\text{m}$ . Isecci tkiva sva četiri organa su potom obojeni tehnikama Hematoksilin/Eozin i Toluidin plavo. Tkivo slezine i timusa je dodatno obojeno Gimza metodom, a tkivo bubrega Azo carmine aniline blue (AZAN) metodom.

Nakon bojenja, pristupilo se pravljenju digitalnih mikrografa tkiva uz pomoć Olympus C-5060 Wide Zoom kamere postavljene na Olympus BX41 svetlosni mikroskop (uveličanje 1000x, imerzioni objektiv 100x). Digitalni mikrografi tkiva su napravljeni i obrađeni po uzoru na našu prethodnu studiju (Pantic & Pantic, 2012). Za svako ispitivano tkivo, uz pomoć specijalnog softvera ImageJ Nacionalnog instituta za zdravlje (SAD) i specijalnih integrisanih podprograma određena je srednja vrednost fraktalne dimenzije, lakunarnosti, entropije, varijanse, angularnog drugog momenta, teksturalnog kontrasta, teksturalne korelacije i inverznog momenta razlike.

Za merenje strukturne kompleksnosti hromatina korišćene su sledeće ćelijske populacije obojene hematoksilin/eozin tehnikom: u timusu kortikalni i medularni timociti i stromalne ćelije; u slezini limfociti folikula, i eritroidne prekurzorske ćelije subkapsularnog hematopoeznog tkiva; u jetri hepatociti; u bubregu ćelije proksimalnih i distalnih tubula, ćelije sabirnih kanalića kao i ćelije macule dense. Analiza pojedinačnih jedara je obavljena po uzoru na sličan protokol opisan u našim prethodnim studijama (Pantic et al. 2012a, Pantic et al. 2012b).

U *in vitro* delu studije ćelije linije U251 su tretirane UVB zracima talasne dužine 312 nm u ukupnom trajanju od 15 minuta. Uzorak od 32 individualne ćelije (vezani uzorak) je praćen kroz 12 vremenskih tačaka: pre UV tretmana, odmah nakon UV tretmana, kao i 30min, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h, 3h, 3.5h, 4h, 4.5h i 5h nakon tretmana. Prva vremenska tačka (neposredno pre UV tretmana) predstavljala je kontrolu. Uz pomoć ImageJ softvera za svaku ćeliju i njeno jedro u svakoj vremenskoj tački određena je vrednost fraktalne dimenzije, lakunarnosti, entropije, angularnog drugog momenta, teksturalnog kontrasta, teksturalne korelacije, varijanse i inverznog momenta razlike, u skladu sa gore navedenim tekstom.

Rezultati naše studije su ukazali da se fraktalna kompleksnost nukleusnog hromatina smanjuje u postnatalnom razvoju i starenju u ćelijskim populacijama kortikalnih i medularnih limfocita timusa, epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, ćelija makule denze, kao i u hepatocitima u jetri. Neuređenost nukleusnog hromatina eritroidnih prekurzorskih ćelija hematopoeznog tkiva slezine, merena teksturalnom entropijom, se povećava sa starenjem. U postnatalnom razvoju i starenju je takođe detektovano značajno smanjenje fraktalne kompleksnosti tkivne arhitekture merene fraktalnom dimenzijom u

korteksu i meduli timusa, korteksu i meduli bubrega, hematopoeznom tkivu slezine i lobulusima jetre. Fraktalna dimenzija tkivne arhitekture je statistički značajno korelirala sa hromatinskom fraktalnom dimenzijom u većini ispitivanih tkiva, odnosno ćelijskih populacija. Nakon indukcije DNK oštećenja *in vitro*, u ćelijskoj kulturi, došlo je do značajnog smanjenja i celularne fraktalne dimenzije i hromatinske lakunarnosti. Ovi nalazi ukazuju da unutrašnji (intrinsic) faktori asocirani sa starenjem ćelije, kao što su akumulacija DNK oštećenja i promene u epigenetskoj regulaciji hromatina imaju značajnu ulogu u starenju ispitivanih ćelijskih populacija, odnosno tkiva.

**Ključne reči:** Kompleksnost, Fraktal, Lakunarnost, Starenje, Entropija

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

**UDK broj:**

# FRACTAL AND TEXTURAL ANALYSIS OF NUCLEAR CHROMATIN STRUCTURAL COMPLEXITY IN POSTNATAL DEVELOPMENT AND AGING

## ABSTRACT

Previous studies have found that during aging a large number of biological structures such as tissues and organs loses its complexity and that such loss leads to reduced ability to adapt to physiological stress. However, so far there is no information on whether similar structural changes occur in individual cells and their genetic material.

Structural complexity can be quantified in several ways. Recent studies have determined that the chromatin, as well as many other biological structures exhibit fractal characteristics in their morphology. The concept of fractals is based on the principle of self-similarity, or the fact that the lower parts of a physical or biological system resemble the system as a whole. The complexity of fractal structures can be measured by determining the fractal dimension and lacunarity as the two most important parameters of fractal analysis. In addition to the fractal analysis, textural analysis as a method is also frequently used. Textural analysis can determine the parameters of textural heterogeneity and disorganization (i.e. entropy) of biological structures. In our study, on the mouse experimental model, we studied age-related changes in chromatin structural complexity in the total of 10 cell populations in the thymus, spleen, kidney and liver. Also, we described changes in the complexity of the nuclear structure in a cell culture after the induction of DNA damage by UV radiation.



The study was conducted on 80 male mice, originating from the experimental animal vivarium of the Institute of Medical Physiology, Faculty of Medicine, Belgrade. The pilot study was conducted on a group of 16 mice in which the first animal was a newborn, and each of the following animals was 30 days older than the previous one (the oldest animals were 450 days old). The main part of the study in laboratory animals, was conducted on a total of 64 animals which were divided into 8 age groups ( $n = 8$ ): 0, 10, 20, 30, 120, 210, 300 and 390 days old.

The experimental protocol was designed according to the following procedure: measurement of body mass, sacrifice by cervical dislocation, extirpation of the thymus, spleen, kidney and liver, fixation in Carnoy fixative, embedding in Paraplast, making of slices of thickness 5 microns. Slices of all four organs were then stained by hematoxylin / eosin and toluidine blue technique. Spleen and thymus was further stained by Gimza technique and kidney tissue with Azo carmine aniline blue (AZAN) method.

After staining, we made digital micrographs of the tissues using the Olympus C-5060 Wide Zoom camera mounted on Olympus BX41 light microscope (1000x magnification, 100x immersion lens). Digital micrographs of tissue were made and processed similarly to our previous study (Pantic & Pantic, 2012). For all examined tissues, with the help of special software ImageJ of the National Institutes of Health (USA) and integrated plugins, we determined the mean value of fractal dimension, lacunarity, entropy, variance, angular second moment, textural contrast, textural correlation and inverse difference moment. We measured the structural complexity of chromatin in the following cell populations stained with hematoxylin / eosin technique: in thymus cortical and medullar lymphocytes and stromal cells; spleen follicular

lymphocytes, and spleen erythroid precursor cells of the subcapsulary haematopoietic tissue; hepatocytes in the liver; kidney cells of proximal and distal tubules , collecting duct cells as well as macula densa cells. Analysis of individual nuclei was performed on the model of a similar protocol described in our previous studies (Pantic et al. 2012a, Pantic et al. 2012b).

In the *in vitro* part of the study, cell line U251 was treated with UVB rays of wavelength 312 nm with a total duration of 15 minutes. A sample of 32 individual cells (paired sample) was monitored in 12 time points: before UV treatment, immediately after UV treatment, and 30min, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h, 3h, 3.5h, 4h, 4.5h and 5h after the treatment. The first time point (immediately before UV treatment) was the control. With the help of ImageJ software for each cell and its nucleus at each time point the following parameters were determined: fractal dimension, lakunarnosti, entropy, angular second moment, textural contrasts, textural correlation, variance and inverse difference moment, in accordance with the above text.

The results of our study indicate that the fractal complexity of nuclear chromatin decreases in postnatal development and aging in the cell populations of cortical and medullar thymic lymphocytes, epithelial cells of the proximal renal tubules, macula densa cells and in hepatocytes in the liver. Disorder of nuclear chromatin in spleen erythroid precursor cells, measured by textural entropy increased with age. In postnatal development and aging significant reduction of tissue architecture complexity (measured by fractal dimension) was detected in the cortex and medulla of thymus, the cortex and medulla of the kidney, spleen hematopoietic tissue and liver lobuluses. The fractal dimension of tissue architecture was significantly correlated with the fractal dimension of chromatin in most examined tissues, and cell

populations. After the induction of DNA damage *in vitro*, in cell culture, there was a significant decrease in cellular fractal dimension and chromatin lacunarity. These findings indicate that the intrinsic factors associated with the aging of cells, such as the accumulation of DNA damage and changes in the epigenetic regulation of chromatin play an important role in the aging of the investigated cell populations and tissues.

**Key words:** Complexity, Fractal, Lacunarity, Ageing, Entropy

**Scientific field:** Medicine

**Special topic:** Molecular medicine

**UDK number:**

# SADRŽAJ

## 1. U V O D

1.1 Kompleksnost hromatina i metode za njenu kvantifikaciju.....	1
1.2 Promene kompleksnosti bioloških struktura u starenju.....	4
1.3 Strukturne promene u tkivima i organima tokom starenja.....	6
1.4. Uzroci starenja.....	12
1.5. Ekstracelularni i intracelularni faktori asocirani sa starenjem tkiva .....	14
1.6. Radna hipoteza.....	16
1.7. Ciljevi istraživanja.....	17

## 2. M A T E R I J A L I I M E T O D E

2.1. <i>Plan eksperimenata na oglednim životinjama.....</i>	18
2.2. <i>Fraktalna analiza.....</i>	28
2.3. <i>Teksturalna analiza.....</i>	30
2.4. <i>Eksperiment na ćelijskoj kulturi.....</i>	36
2.5. <i>Cutofluorometrijska analiza markera apoptoze.....</i>	38
2.5.1. <i>Aktivnost kaspaza.....</i>	39
2.5.2. <i>Merenje permeabilnosti ćelijske membrane.....</i>	39
2.5.3. <i>Analiza fragmentacije DNK.....</i>	39
2.6. <i>Statistička analiza.....</i>	40

### 3. REZULTATI

<b>3.1. Rezultati <i>in vitro</i> eksperimenta.....</b>	<b>41</b>
3.1.1. <i>Promene u fraktalnoj dimenziji i lakunarnosti cele ćelije nakon UV tretmana.....</i>	<b>41</b>
3.1.2 <i>Promene u fraktalnoj dimenziji i lakunarnosti jedra nakon UV tretmana.....</i>	<b>43</b>
3.1.3. <i>Rezultati teksturalne analize u in vitro eksperimentu.....</i>	<b>45</b>
3.1.3.1. <i>Teksturalna analiza celih ćelija.....</i>	<b>45</b>
3.1.3.2. <i>Rezultati teksturalne analize jedarne strukture.....</i>	<b>50</b>
3.1.4. <i>Citofluorometrijski parametri apoptoze.....</i>	<b>55</b>
<b>3.2. Rezultati preliminarnog eksperimenta na oglednim životinjama....</b>	<b>57</b>
<b>3.3. Rezultati glavnog eksperimenta na oglednim životinjama.....</b>	<b>64</b>
3.3.1. <i>Promene u tkivnoj kompleksnosti.....</i>	<b>64</b>
3.3.2. <i>Stromalne ćelije timusa.....</i>	<b>65</b>
3.3.3. <i>Kortikalni limfociti timusa.....</i>	<b>71</b>
3.3.4. <i>Medularni limfociti timusa.....</i>	<b>74</b>
3.3.5. <i>Folikularne ćelije u beloju pulpi slezine.....</i>	<b>78</b>
3.3.6. <i>Eritroidne prekurzorske ćelije slezine.....</i>	<b>80</b>
3.3.7. <i>Epitelne ćelije proksimalnih tubula bubrega .....</i>	<b>87</b>
3.3.8. <i>Epitelne ćelije distalnih tubula bubrega .....</i>	<b>90</b>
3.3.9. <i>Epitelne ćelije sabirnih kanalića bubrega.....</i>	<b>93</b>

3.3.10. Čelije macula densa strukture.....96

3.3.11. Hepatociti .....98

#### **4. DISKUSIJA**

**4.1. Fraktalna analiza u eksperimentalnoj i kliničkoj fiziologiji.....102**

**4.2. Fraktalni parametri kao potencijalni indikatori strukturnih promena u hromatinu nakon UV tretmana.....107**

**4.3. Teksturalna analiza u eksperimentalnoj i kliničkoj fiziologiji.....110**

**4.4. Potencijalna primena GLCM metode u kliničkim naukama.....114**

**4.5. Teksturalna analiza u fundamentalnim medicinskim istraživanjima za procenu strukturalne organizacije tkiva i ćelija.....118**

**4.6. Kompleksnost bioloških struktura i starenje.....121**

**4.7. Strukturne promene u hromatinu tokom starenja.....123**

**4.8. Strukturne promene u slezini tokom postnatalnog razvoja i starenja.....126**

**4.9. Promene kompleksnosti hematopoeznog tkiva slezine.....129**

**4.10. Struktura i funkcija timusa u postnatalnom razviću i starosti.....136**

**4.11. Strukturne i funkcionalne promene u bubregu tokom starenja i njihova veza sa promenama fraktalne kompleksnosti.....143**

**4.12. Promene u tkivnoj i celularnoj fraktalnoj organizaciji jetre tokom postnatalnog razvoja i starenja.....151**

**4.13. Razlike između ispitivanih tkiva u pogledu dinamike i stepena promena strukturne kompleksnosti.....156**

<b>4.14. Budućnost primene fraktalne i teksturalne analize u molekularnoj medicini.....</b>	<b>158</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>160</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>162</b>

# 1. U V O D

## 1.1. Kompleksnost hromatina i metode za njenu kvantifikaciju

Biološke strukture kao što je nukleusni hromatin se odlikuju određenim stepenom strukturne kompleksnosti. Strukturna kompleksnost nukleusnog hromatina je važan pokazatelj očuvanosti i nivoa njegove organizacije. U procesima tokom kojih je distribucija euhromatina i heterohromatina narušena, hromatinska kompleksnost se menja. Tipičan primer ovakvog procesa je apoptoza, tokom čije rane faze dolazi do kondenzacije i marginalizacije hromatina, što se manifestuje kroz smanjenu kompleksnost (Losa & Casteli, 2005; Pantic et al. 2012b).

Tokom poslednjih nekoliko godina, primećeno je da hromatin kao biološki i biofizički sistem poseduje tzv. fraktalne karakteristike (Lebedev et al. 2005; Bancaud et al. 2009; Mirny, 2011). Koncept fraktala se u osnovi bazira na principu samosličnosti (engl. self-similarity), odnosno na činjenici da manji delovi nekog fizičkog ili biološkog sistema nalikuju sistemu kao celini. Fraktalna priroda hromatina je potvrđena na osnovu karakteristične, nenasumične distribucije pojedinih nanomaterijala u ćelijskom jedru, kao i na osnovu specifičnosti u kinetici pojedinih hromatin-vezujućih proteina (McNally & Mazza, 2010). Takođe je demonstrirano da su fraktalne osobine euhromatina izražene u znatno većoj meri nego kod heterohromatina, što ukazuje na potencijalni značaj fraktalne analize u proceni transkripcione aktivnosti jedra kao celine (Bancaud et al. 2009; McNally & Mazza, 2010).



U biološkim i medicinskim naukama, postoji nekoliko načina za kvantifikovanje strukturne kompleksnosti. One biološke strukture koje u svojoj morfologiji ispoljavaju karakteristike fraktala mogu se analizirati određivanjem fraktalne dimenzije i lakunarnosti. Ove dve veličine u biologiji i medicini se koriste za objektivno vrednovanje, opisivanje i klasifikaciju raznih struktura i pojava koji ne podležu pravilima Euklidske geometrije i do sada su uspešno primenjene u raznim medicinskim granama (Burgos, 1996; Roy et al. 2004; Moal et al. 2006; Randall et al. 2006; Borys et al. 2008; Gilmore et al. 2009; Ferro et al. 2011; Landini et al. 2011). Smanjenje fraktalne dimenzije bioloških struktura kao što je nukleusni hromatin u pojedinim stanjima je pokazatelj gubitka kompleksnosti.

Druga metoda koja se danas često koristi kao dodatak fraktalnoj analizi za procenu kompleksnosti bioloških struktura je teksturalna analiza upotrebom GLCM (Grey level co-occurrence matrix) tehnike (Losa & Casteli, 2005; Park et al. 2011; Pantic et al. 2012b, Pantic & Pantic, 2012). Ova metoda omogućava kvantifikaciju teksturalnih karakteristika posmatranog biološkog sistema kao što je stepen homogenosti i neuređenosti (entropije). U fundamentalnim medicinskim naukama, GLCM metodom se najčešće analiziraju digitalni mikrografa tkiva, odnosno ćelijskih elemenata, a najčešći parametri koji se na ovaj način određuju su GLCM entropija, GLCM varijansa, angularni drugi momenat (Angular second moment), teksturalni kontrast, teksturalna korelacija, i inverzni momenat razlike (inverse difference moment). Ove veličine se dobijaju primenom statistike drugog reda na distribuciju (matriks) vrednosti rezolucionih jedinica u digitalnim mikrografima. Dok fraktalna dimenzija u osnovi daje ocenu o tome da li

se kompleksnost povećava ili smanjuje, GLCM parametri odgovaraju na pitanje da li je detektovana promena kompleksnosti biološke strukture posledica promena u teksturi (Losa & Casteli, 2005; Park et al. 2011).

Nukleusni hromatin se sastoji od molekula DNK i proteina vezanih za njih. Posmatran pomoću konvencionalne svetlosne mikroskopije hromatin se ispoljava kao mozaik isprepletanih tamnih i svetlih polja u nukleusu interfazne ćelije čineći dva tipa hromatina: visoko kondenzovanog tipa zvanog heterohromatin, i manje kondenzovanog, zvanog euhromatin (Losa & Casteli, 2005; Vido et al. 2011; Ferro et al. 2011; Choi et al. 2012; Riddle et al; 2012).

Smatra se da nekoliko faktora uočljivih svetlosnom mikroskopijom može uticati na sveukupnu kompleksnost hromatina. Kondenzacija hromatina u osnovi predstavlja stepen izuvijanosti hromatinske strukture. On se menja normalno tokom ćelijskog ciklusa, tako da na početku mitoze ćelije (profazi), kondenzacija hromatina je na višem nivou nego tokom perioda kad se ćelija ne deli (interfaza). Takođe, jedan od prvih fenomena koji se dešavaju u ranom stadijumu apoptoze predstavlja upravo kondenzacija hromatina. U mnogim slučajevima kondenzacija je svojevrsna priprema genetskog materijala za kasniju fragmentaciju DNK tokom apoptoze.

Distribucija, ili topografski raspored euhromatina odnosno heterohromatina u jedru ćelije je takođe važan faktor koji može uticati na fraktalne i teksturalne karakteristike ćelije (Vido et al. 2011; Ferro et al. 2011). Hromatin koji u nukleusnoj strukturi ima ravnomernu distribuciju, odnosno nizak stepen heterogenosti, će imati manju vrednost teksturalne neuređenosti (entropije) od hromatina sa nepravilnom distribucijom. Nukleusna struktura u kojoj postoje polja bez prisustva vidljivog hromatina (lakune) će imati veće vrednosti

pojedinih parametara strukturne kompleksnosti, kao što je npr. lakunarnost (Pantic et al. 2012d).

Tipičan primer procesa u kome dolazi do menjanja hromatinske distribucije je marginalizacija hromatina koja se kao i kondenzacija dešava u ranim stadijumima apoptoze, ali i mnogim drugim patološkim stanjima kao što je npr. infekcija pojedinim virusima (Strang et al. 2012). U našoj prethodnoj studiji, sugerirali smo da bi određeni parametri nukleusne teksturalne analize poput entropije, angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike, mogli biti u vezi sa marginalizacijom hromatina u ranoj apoptozi (Pantic et al. 2012b).

## **1.2. Promene kompleksnosti bioloških struktura u starenju**

Nekoliko studija je do sada utvrdilo da tokom starenja veliki broj tkiva i organa kao celine gubi svoju kompleksnost i da takav gubitak vodi smanjenoj sposobnosti adaptacije na fiziološki stres (Lipsitz & Goldberger, 1992; Goldberger et al. 2002; Lipsitz, 2004; Zhang et al. 2007; Shamir et al. 2009). Gubitak kompleksnosti je u većini slučajeva dokazan smanjenim vrednostima fraktalne dimenzije tkiva, odnosno organa. Kad je u pitanju GLCM analiza, Shamir i saradnici (2009) su na animalnom modelu našli da se entropija tkiva povećava tokom postnatalnog razvoja i starenja, što se takođe može tumačiti kroz smanjenje tkivne kompleksnosti.

Sve dosadašnje studije koje su ispitivale uticaj starenja na strukturnu kompleksnost su se fokusirale na kompleksnost tkiva kao celine (Lipsitz & Goldberger, 1992; Goldberger et al. 2002; Lipsitz,

2004; Zhang et al. 2007; Shamir et al. 2009). Na ovaj način su prevashodno ispitivani spoljni (extrinsic) faktori koji dovode do smanjene funkcije tkiva tokom starenja kao što su poremećaji u međućelijskoj komunikaciji i citoarhitektonici. Sa druge strane, uloga unutrašnjih (intrinsic) faktora, kao što je akumulacija DNK oštećenja u jedru ćelije, kao i razni epigenetski činioci (poremećaj regulacije organizacije hromatina) tokom starenja je za veliki broj tkiva i dalje nepoznata.

Postoji nekoliko eksperimentalnih modela za ispitivanje starenja na pojedinačnim ćelijskim strukturama. U *in vitro* studijama na ćelijskim kulturama, često se koristi model tzv. indukovanog starenja, u kome se pomoću ultraljubičastog zračenja (tzv. photoaging) na izolovanim ćelijama izazivaju promene karakteristične za starenje, poput akumulacije DNK oštećenja, i aktivacije mehanizama DNK popravke (Almagor & Cole, 1989; Nyström & Osiewacz, 2004; Rochette & Brash, 2010; Mund et al. 2012). Na ovaj način u relativno kratkom vremenskom periodu (nekoliko časova), možemo pomoću svetlosne mikroskopije posmatrati morfološke promene na izolovanim ćelijama i njihovim jedrima. U studijama na oglednim životinjama, postoje dva potencijalna pristupa za ispitivanje uticaja starenja na ćelije, odnosno tkiva. Prvi način podrazumeva formiranje različitih starosnih grupa i ispitivanje da li postoji statistički značajna razlika između grupa u ispitivanom parametru. Drugi pristup bi bio formiranje jedne grupe u kojoj su životinje različite životne dobi sa ciljem da se ispitivanja da li postoji statistički značajna povezanost (korelacija) između starosti i testiranog parametra. U ovom radu, opredelili smo se za kombinaciju modela starenja na eksperimentalnoj životinji (miš), i *in vitro* modela UV-indukovanog starenja na ćelijskoj kulturi.

U našoj skorašnjoj studiji (Pantic et al. 2012b) smo pokazali da su određeni GLCM parametri hromatina limfocita u germinativnim centrima slezine potencijalno važni pokazatelji finih ultrastrukturnih promena koje se dešavaju tokom kondenzacije i marginalizacije hromatina u ranoj apoptozi. Detektovana je statistički značajna korelacija između entropije, angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike sa jedne strane i konvencionalnih parametara veličine i oblika jedra sa druge strane. Ovo je ukazalo na značaj GLCM kao metode u detekciji diskretnih promena u kompleksnosti hromatina tokom procesa umiranja ćelije, koje je nemoguće uočiti standardnom svetlosnom mikroskopijom (Pantic et al. 2012b).

U našoj drugoj studiji (Pantic & Pantic, 2012) smo pokazali da je teksturalna entropija validan i senzitiv indikator neuređenosti tkiva germinativnog centra slezine kao mere strukturne degradacije nakon pokretanja imunskog odgovora. Na osnovu rezultata ove studije zaključili smo da je GLCM metoda primenljiva ne samo za analizu pojedinačnih ćelijskih struktura (hromatin), već i za analizu starosno-zavisne strukturne degradacije tkiva kao celine, što je u skladu sa nalazima drugih autora (Shamir et al. 2009).

### **1.3. Strukturne promene u tkivima i organima tokom starenja**

Procesi koji karakterišu fiziološko starenje u širem smislu, počinju već od samog početka individualnog života, od samog začeća. U toku ćelijskih diferencijacija od nediferentovanih ćelija nastaju progresivno starije ćelije koje na kraju, ispoljavajući degenerativne promene, završavaju svoj životni vek (Lata & Walia 2007). Razlikuju se

dve faze starenja. U prvoj fazi organizam raste i napreduje i kvantitativno i kvalitativno, i pošto se izvesno vreme održava maksimum vitalnosti, organizam u drugoj fazi slabi i propada. Ponekad se starenjem naziva samo druga faza (Lata & Walia 2007), međutim, granicu između ove dve faze teško je odrediti. U ovom radu se izučavaju strukturne promene nukleusnog hromatina u postnatalnom razvoju, zreloj dobi, i u periodu normalnog starenja u užem smislu.

U toku normalnog starenja nastaju brojne promene u organizmu koje treba razlikovati od bolesti. Fiziološko ili normalno starenje dovodi do smanjenja sposobnosti adaptacije organizma koji kao posledica toga postaje osetljiviji na povrede i infekcije, i smanjuje sposobnost homeostaze i regulacije funkcionalnih sistema. Iako promene fiziološkog starenja nastaju kod svih jedinki, postoje individualne, sistemske i organske razlike u brzini tih promena a važno je naglasiti i to da brzina tih promena može biti modifikovana. (Reed et al 1998; Kuzumaki et al. 2010).

Poznato je da u ljudskom organizmu, kao i kod eksperimentalnih animalnih modela, limfoidni organi, kao i tkiva direktno vezana za funkcionisanje imunskog sistema kao npr. hematopoezno tkivo, imaju drugačiju dinamiku starenja nego što je to slučaj sa ostalim tkivima i organima. Imunski sistem u postnatalnom razvoju sazreva relativno brzo, a u adultnoj životnoj dobi mnoga tkiva imunskog sistema podležu atrofičnim promenama (Reed et al. 1998; Appay et al. 2010; Cesta et al. 2006).

Starosne promene u imunskom sistemu povećavaju osetljivost prema infekcijama, tumorima i imunskim bolestima (Reed et al. 1998). Ovo se dešava kao posledica nekoliko fenomena. Prvo, sa starenjem se smanjuje proizvodnja i broj funkcionalnih limfocita, kao i njihova

sposobnost da dovedu do adekvatnog sekundarnog imunskog odgovora na antigen. Drugo, funkcionisanje ćelija urođene imunosti kao što su neutrofilni granulociti ili NK ćelije, je takođe smanjeno sa starenjem. U starijih osoba, u poređenju sa mladom populacijom, verovatnoća nastanka smrtnog ishoda je 3 puta veća kod pneumonije ili sepse, 3 do 5 puta veća kod urinarnih infekcija, i 15 do 20 puta veća kod apendicitisa (Reed et al. 1998).

Involucija timusa počinje posle adolescencije a nivo timusnih hormona važnih za razvoj leukocita se smanjuje posle 30. godine života života (Appay et al. 2010). Formiranje T - limfocita u humanom timusu posle puberteta se značajno smanjuje što korelira sa smanjenim odgovorom imunskog sistema na antigene (merenog kožnim testovima). U ranom adultnom stadijumu života, funkcionalni parenhim timusa se ubrzano zamenjuje fibroznim vezivnim tkivom što se jasno može uočiti svetlosnom mikroskopijom. U drugoj polovini adultnog života timus je skoro u potpunosti zahvaćen atrofičnim promenama, a timusni hormoni se ne mogu detektovati u krvi. Slično ljudskom organizmu, i u animalnim eksperimentalnim modelima kao što su miš i pacov, u timusu dolazi do involucije i atrofije. Kod starijih životinja (npr. kod miševa starijih od godinu dana), ovi procesi su toliko izraženi da je ponekad teško tokom eksperimenta uraditi adekvatnu ekstirpaciju i histološku analizu (Appay et al. 2010; Gui et al. 2012; den Braber et al. 2012).

Slezina kao sekundarni limfoidni organ sa starenjem takođe podleže strukturnim i funkcionalnim promenama koje imaju sporiju dinamiku nego kod timusa. Kod laboratorijskih životinja kao što je pacov, razvoj slezine dostiže vrhunac u pubertetu a zatim nastaje postepena involucija. U delu bele pulpe slezine koja je lokalizovana u okolini arterijskih krvnih sudova, odnosno PALS-u (periarterial

lymphatic sheaths) postoji tendencija smanjenja broj limfocita, a ovo smanjenje iznosi čak 80% između 4-g i 30-og meseca. Kod starijih glodara u slezini takođe postoji značajno manji broj sekundarnih folikula sa germinativnim centrima što utiče na intenzitet humoralnog imunskog odgovora na strani antigen i druge funkcije B-limfocita (Cesta et al. 2006).

Kao i organi imunskog sistema, i drugi parenhimatozni organi trpe morfološke i funkcionalne promene tokom starenja. Razlika je u tome što ove promene nastaju sporije, dok postnatalni razvoj traje duže. Tipični primeri dinamike starenja u nelimfoidnim parenhimatoznim organima su promene koje se dešavaju u bubregu i jetri (Beck et al. 2000; Reed al. 1998; Anantharaju et al. 2002; Liska et al. 2012).

U životnoj dobi od sredine četrdesetih godina kod većine osoba renalna funkcija se smanjuje (Beck et al. 2000). Iako je kapacitet bubrega da stvara i koncentriše urin više nego dovoljan u normalnim uslovima, protok krvi kroz bubrege se smanjuje tempom od oko deset procenata po dekadi. Sa starenjem bubrezi gube četvrtinu do trećine svoje mase zbog smanjenja broja i veličine nefrona. Od 80. godine života, ukupan broj nefrona opada za 30% do 40%, a još 30% može biti sklerotično i nefunkcionalno (Beck et al. 2000). Hormonska regulacija održavanja volumena telesnih tečnosti i konzervacije natrijuma se smanjuju tako da se znatno povećava verovanoća nastanka dehidratacije u patološkim uslovima, a bubrezi postaju manje efikasni u koncentraciji urina i eliminaciji toksičnih materija.

Treba imati u vidu starosne promene u bubregu tokom najvećeg dela adultnog života nemaju veliki klinički značaj, s obzirom na to da



bubreg raspolaže velikom funkcionalnom rezervom nefrona koja može kompenzovati bilo kakvo starosno-zavisno smanjenje glomerulske filtracije, protoka krvi kroz bubreg, odnosno veličinu klirensa toksina i metabolita. Međutim, kod jednog procenta starih osoba (posle 70. godine života), ove promene mogu uticati na progresiju i prognozu pojedinih bolesti, kao i na uspešnost terapije (Reed al. 1998; Beck et al. 2000).

Primer parenhimatoznog organa u kome morfološke i funkcionalne promene vezane za starenje nisu izražene u velikoj meri je jetra. Jetrin parenhim ima veliku sposobnost regeneracije delom zahvaljujući prisustvu matičnih ćelija na periferiji hepatičnih lobulusa, a takođe i zbog specifične retikularne potke koja usmerava deobu i diferencijaciju ovih ćelija u funkcionalne hepatocite (Anantharaju et al. 2002; Reed et al. 1998).

Morfološke i funkcionalne promene u tkivu jetre tokom starenja ispoljavaju se kao smanjenje volumena i mase jetre, smanjen protok krvi, smanjen klirens nekih lekova. Takođe, regenerativni potencijal hepatocita opada u određenoj meri, ali klinički značaj ovih promena je i dalje nepoznat (Anantharaju et al. 2002; Reed et al. 1998).

Sa druge strane, integritet mitohondrija i enzimaska aktivnost hepatocita ostaju uglavnom nepromenjeni tokom starenja. Isto važi i za koncentracije ključnih intrahepatocitnih enzima u krvi kao što su alanin aminotransferaza i aspartat aminotransferaza koji su istovremeno indikatori hepatičnog oštećenja. Takođe, iako klirens određenih lekova koji se izlučuju putem žuči sa starenjem može biti smanjen, to ne utiče na jetrinu sveukupnu sposobnost detoksikacije (Anantharaju et al. 2002; Reed et al. 1998).

U našoj studiji, opredelili smo se za ispitivnje starosnih promena u strukturnoj kompleksnosti ćelija i tkiva na dva limfoidna organa – timusu i slezini, i dve nelimfoidna organa – bubregu i jetri. Kao što je gore navedeno, poznato je da se u ovim organima dešavaju značajne promene u morfologiji i funkciji tokom postnatalnog razvoja i starenja, kao i da se dinamika javljanja ovih promena i određene specifičnosti u histološkoj slici znatno razlikuju. U poređenju sa drugim organima, timus (kao primarni limfatički organ) veoma rano podleže smanjenju funkcionalnog kapaciteta uz karakteristične morfološke promene koje se ogledaju kroz zamenu funkcionalnog parenhima vezivnim tkivom, što dovodi do atrofije. Slezina, sa druge strane, kao sekundarni limfoidni organ se odlikuje znatno manjim i kasnijim gubitkom tkivne organizacije i funkcije. Jetra se slično slezini tokom starenja uspešno odupire uticaju štetnih endogenih i egzogenih činilaca, jednim delom zahvaljujući visokoj sposobnosti regeneracije hepatocita (Liska et al. 2012). Bubrež tokom starenja pokazuje određene specifičnosti koje se pored ostalog ogledaju u progresivnom gubitku funkcionalnih jedinica-nefrona. Bez obzira na specifičnosti morfoloških promena tokom starenja u pojedinim organima, drugi autori su ukazali da se ove promene ispoljavaju kroz gubitak kompleksnosti tkiva i organa u celini, dok efekti starenja na kompleksnost individualnih ćelija i intracelularnih struktura ostaju nepoznanica (Lipsitz & Goldberger, 1992; Lipsitz, 2004; Zhang et al. 2007; Shamir et al. 2009).

#### 1.4. Uzroci starenja

I pored mnogobrojnih studija sprovedenih u polju gerontologije, tačni uzroci i mehanizmi starenja, kao i faktori koji dovode do dugovečnosti kako u ljudskom, tako i u životinjskom organizmu, još uvek ostaju nepoznanica. Tokom proteklih nekoliko decenija, formulisano je nekoliko teorija koje pokušavaju da objasne zašto čovek stari i kako produžiti ljudski vek. Najvažnije od tih teorija su: evolucionarne teorije, teorije genske regulacije, teorije ćelijskog starenja, teorija slobodnih radikala, i neuro-endokrino-immunska teorija (Weinert et al. 2003; Carey, 2003).

Prema evolucionim teorijama dugovečnost zavisi od procesa prirodne selekcije, a da bi se neka karakteristika selektovala ona mora da predstavlja određenu evolucionu korist u cilju prilagođavanja na uslove spoljašnje sredine (Keller & Genoud, 1997).

Teorija genske regulacije sugerise da je senescencija rezultat promene u regulaciji ekspresije pojedinih gena što rezultira smanjenom ili povećanom sintezom odgovarajućih enzima koji učestvuju u metaboličkim i drugim vitalnim funkcijama organizma (Carey, 2003). Ove promene u enzimskoj aktivnosti dovode do smanjenja funkcionalnih kapaciteta većine tkiva i organa u starosti.

Prema teoriji ćelijskog starenja, starenje je rezultat ograničavanja broja ćelijskih deoba pokretanjem odgovarajućih signalnih puteva koji dovode do nastanka programirane ćelijske smrti (apoptoze). Ova teorija uvodi pojam tzv. "replikacione senescencije" da bi se ukazalo na činjenicu da je replikacija genetskog materijala osnovni limitirajući faktor u životnom veku individualnih ćelija (Kim et

al. 1994; Di Micco et al. 2006; Iglesias-Ara et al. 2010; Maicher et al 2012).

Replikaciona senescencija je tip ćelijske senescencije koja u osnovi dovodi do gubitka telomera (Kim et al. 1994). Telomere predstavljaju regione repetitivnih DNK sekvenci na krajevima svakog pojedinačnog hromozoma. Tokom procesa replikacije DNK mali deo telomere se gubi. Smatra se da je smisao postojanja telomera zaštita funkcionalnih genskih sekvenci koje se nalaze blizu hromozomskih krajeva od ovog replikacionog gubitka. Posle odgovarajućeg broja replikacija i velikog skraćanja telomera, dolazi do aktivacije proapoptotskih signalnih puteva koji dovode do programirane smrti "ostarele" ćelije (Ohya et al. 2002). Embrionalne matične ćelije, kao i one ćelijske populacije u organizmu za koje postoji potreba da se kontinuirno dele (npr. neke ćelije imunskog sistema) poseduju enzim telomerazu koja stvara nove DNK sekvence na telomerama i time nadoknađuje gubitak nastao tokom replikacije. Telomeraza je po svojoj prirodi reverzna transkriptaza i smatra se da je veoma važna u patogenezi mnogih tipova kancera. Poznato je da mnoge maligne ćelije poseduju ovaj enzim u velikim količinama što im omogućava tzv. replikacionu besmrtnost.

Prema teoriji slobodnih radikala, slobodni kiseonični radikali koji se normalno stvaraju u oksidativnim metaboličkim procesima, ali i u nekim patološkim stanjima (npr. tokom dejstava UV zračenja, kao posledica delovanja štetnih hemijskih agenasa itd), oštećuju ćelijske strukture. Negativno dejstvo slobodnih kiseoničnih radikala u starenju se ispoljava kroz oštećenje genetskog materijala, oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina (lipidna peroksidacija), oksidaciju aminokiselina u proteina, i inaktivaciju enzima putem oksidacije

njihovih kofaktora (Afanas'ev et al. 2010; Kemeleva et al. 2006). Predpostavlja se da je akumulacija DNK oštećenja zbog dejstva slobodnih radikala jedan od važnih uzroka povećane incidencije kancera u starosti. Takođe osidativne promene na proteinskom nivou pored uticaja na aktivnost enzima dovode i do strukturnih promena u gradivnim proteinima organa (kolagen, elastin itd.) što remeti sveukupnu citoarhitektoniku tkiva. Ljudski i animalni organizmi poseduju nekoliko mehanizama za neutralisanje štetnog dejstva slobodnih kiseoničnih radikala, kao što su enzimi alfa-1-mikroglobulin, superoksidna dismutaza, katalaza, laktoperoksidaza, glutation peroksidaza, i vitamini askorbinska kiselina i tokoferol. Međutim, iako je efikasnost ovih sistema relativno velika, tokom života, odnosno starenja, mnogi slobodni radikali ostanu intaktni i deluju na proteine i genetski materijal (Afanas'ev et al. 2010; Kemeleva et al. 2006; Levin et al. 2005).

### **1.5. Ekstracelularni i intracelularni faktori asocirani sa starenjem tkiva**

Danas je opšte prihvaćeno da postoje dve osnovne vrste faktora koje se dovode u vezu sa starenjem tkiva. Prva grupa faktora se odnosi na specifičnu mikrosredinu koja okružuje ćelije (Vas et al. 2012; Lefebvre et al. 2012). U ovoj mikrosredini nalaze se različiti hemijski medijatori kao što su faktori rasta, citokini i hormoni. Sa starenjem organizma njihove koncentracije mogu da se menjaju kao posledica promena u brzini njihove sinteze, ili razgradnje. Posledice alternacije tkivne mikrosredine se ogledaju u poremećajima u međućelijskoj

komunikaciji kao i u rastu i deobi ćelija u starosti (Vas et al. 2012; Lefebvre et al. 2012).

Druga grupa faktora se odnosi na promene koje se tokom starenja dešavaju na individualnim ćelijama odnosno njihovom genetskom materijalu. Danas se zna da su dva osnovna intracelularna faktora asocirana sa starenjem akumulacija DNK oštećenja, i promene u epigenetskoj regulaciji hromatina (Garagnani et al. 2012; Gentilini et al. 2012). Ovi faktori, u poređenju sa faktorima mikrosredine su mnogo manje izučeni i nije poznato u kojim konkretno ćelijskim populacijama u organizmu oni dolaze do izražaja tokom starenja. Takođe, vrlo je malo literaturnih podataka o uticaju akumulacije DNK oštećenja i epigenetskih promena u sveukupnom gubitku funkcionalnog kapaciteta tkiva i organa u starosti.

Praćenje strukturne kompleksnosti hromatina pojedinačnih ćelijskih populacija tkiva i organa je jedan od načina procene uticaja unutarjedarnih (intrinsic) faktora na već dokumentovane promene tkivne morfologije i funkcije (Pantic et al. 2012c, Pantic et al. 2012d). Zbog toga će jedan od važnih ciljeva naše studije biti da se sagleda potencijalni uticaj promene hromatinske kompleksnosti određenih ćelijskih populacija na promene ukupne kompleksnosti tkiva, odnosno organa.

## 1.6. Radna hipoteza

Polazeći od činjenice da promena strukturne kompleksnosti ćelija, tkiva i organa, dovodi do promene sposobnosti adaptacije određenih funkcionalnih sistema organizma, pretpostavili smo

(1) da u toku senescencije tj starenja u užem smislu dolazi do smanjenja strukturne kompleksnosti (merene fraktalnom dimenzijom) nukleusnog hromatina ćelija svih ispitivanih organa;

(2) da u toku ukupnog trajanja postnatalnog razvoja i starenja promene strukturne kompleksnosti nukleusnog hromatina mogu biti različite, zavisno od tipa ćelija, vrste organa i ispitivanog perioda.

(3) Pretpostavili smo takođe, da u toku postnatalnog razvoja i starenja, postoje razlike između ispitivanih tkiva u pogledu dinamike i stepena promena strukturne kompleksnosti nukleusnog hromatina.

Što se tiče istraživanja *in vitro*, pretpostavili smo da će nakon iradijacije UV zracima doći do ustaljenog i ireverzibilnog smanjenja strukturne kompleksnosti individualnih ćelija i njihovog nukleusnog hromatina.

## 1.7. Ciljevi istraživanja

Polazeći od navedenih pretpostavki želeli smo da pomoću fraktalne i GLCM analize utvrdimo

(1) da li dolazi do promene strukturne kompleksnosti nukleusnog hromatina u ispitivanim organima (timus, slezina, bubreg i jetra) u toku postnatalnog razvoja i starenja u miševa

(2) da utvrdimo intenzitet i dinamiku očekivanih promena, kao i da utvrdimo

(3) da li postoji razlika u promeni strukturne kompleksnosti nukleusnog hromatina između ispitivanih tkiva u toku postnatalnog razvoja i starenja.

Želeli smo takođe da *in vitro* u ćelijskoj kulturi, na modelu starenja indukovano UV zračenjem ispitamo postojanje i intenzitet promene strukturne kompleksnosti nukleusnog hromatina.

Predložena istraživanja uz upotrebu savremenih preciznih metoda kvantitativnog merenja kompleksnosti nukleusnog hromatina u postnatalnom razvoju i starenju treba da doprinesu znanjima u navedenim oblastima nauke i unapređenju medicinske prakse.



## **2. M A T E R I J A L I I M E T O D E**

### **2.1. Plan eksperimenata na oglednim životinjama**

Istraživanje je obavljeno na 80 miševa muškog pola sorte Swiss albino, poreklom iz Vivarijuma za eksperimentalne životinje Instituta za Medicinsku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Pilot istraživanje je obavljeno na grupi od 16 miševa u kojoj je prva životinja bila novorođena (0 dana starosti), a svaka sledeća životinja je bila 30 dana starija od prethodne (najstarija životinja je bila stara 450 dana). Cilj ovog pilot eksperimenta je bio da se ispita da li postoji statistički značajna povezanost (korelacija) između životne dobi i ispitivanih parametara nukleusnog hromatina. Na osnovu dobijenih rezultata izveden je zaključak o opravdanosti daljeg proširenja eksperimenta na veći uzorak. Glavni deo istraživanja na oglednim životinjama je sproveden na ukupno 64 životinje podeljene u 8 starosnih grupa (n=8): 0, 10, 20, 30, 120, 210, 300 i 390 dana. Cilj ovog dela studije je bio da se ispita da li postoji statistički značajna razlika u fraktalnim / GLCM parametrima između starosnih grupa.

Eksperiment je dobio pozitivno mišljenje Etičke komisije za zaštitu i dobrobit oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu uz ocenu da ima etičku i naučnu opravdanost (mišljenje br. 1881/2). Na osnovu ovog dokumenta, Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede - Uprava za veterinu je donelo rešenje o odobrenju sprovođenja ogleđa (rešenje br 323-07-03985/2012-05/1).

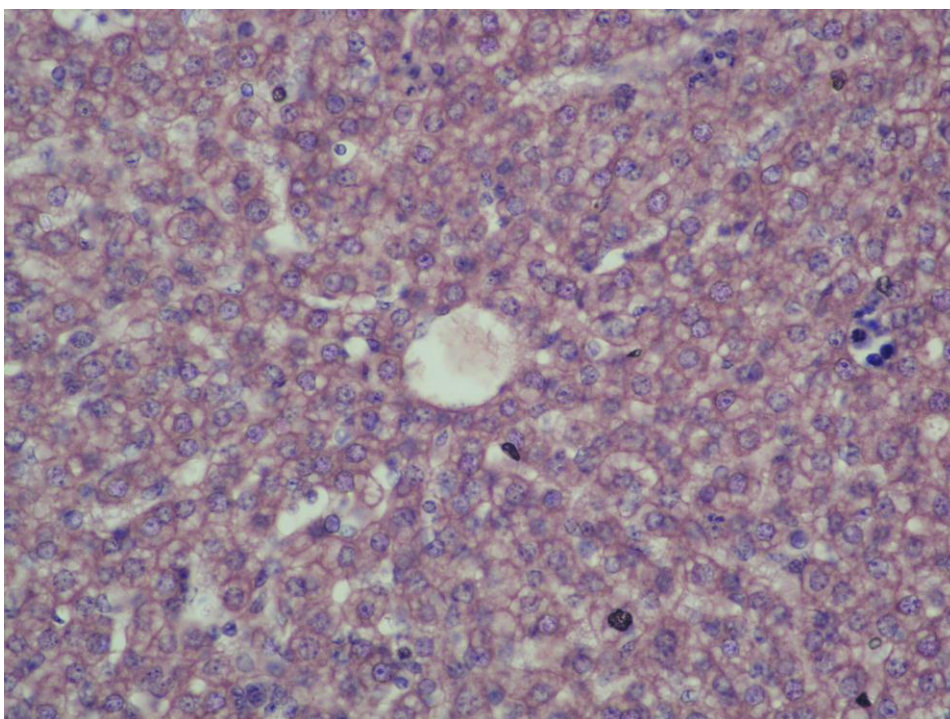
Studija je takođe usklađena sa pravilima Vodiča za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals, published by the U.S. National Institute of Health NIH Publication No. 85 - 23, revised 1985). Lice koje je obavilo eksperiment je imalo sertifikat o osposobljenosti za rad na eksperimentalni životinjama (I.Pantić; br. PF080001, izdat od strane Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu).

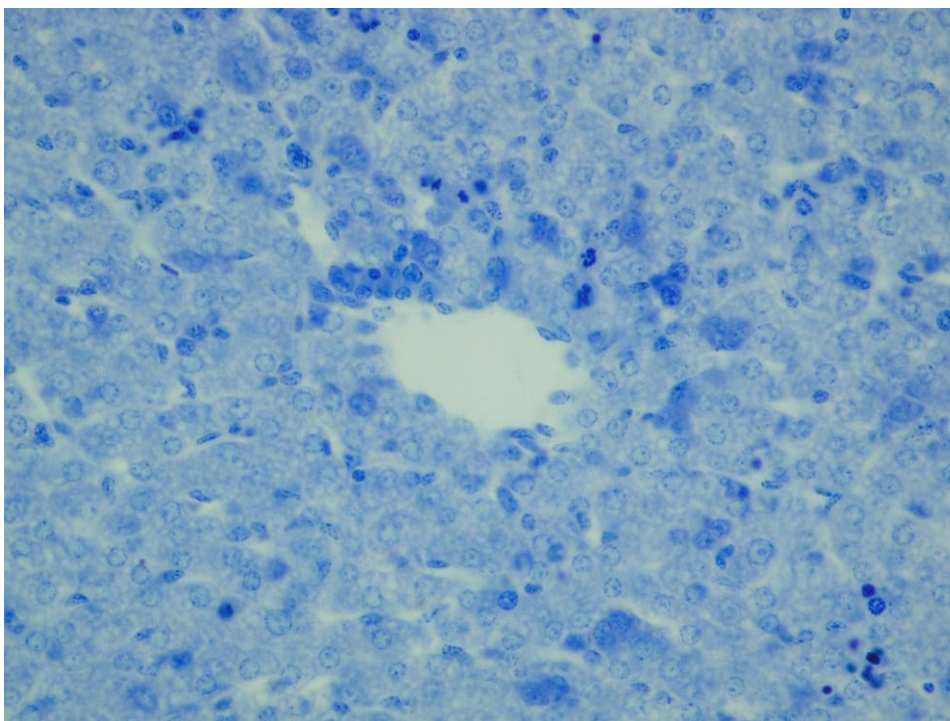
Sve životinje su pre eksperimenta u vivarijumu, odnosno u laboratoriji čuvane pod istim ambijetalnim uslovima: temperatura 21-25°C, ista vlažnost vazduha i ciklus dan-noć. Ishrana životinja se nije značajno razlikovala između starosnih grupa. Životinje su tokom života bile pod redovnom veterinarskom kontrolom.

Eksperimentalni protokol je dizajniran po sledećoj proceduri: merenje telesne mase, žrtvovanje životinja cervikalnom dislokacijom, ekstirpacija timusa, slezine, bubrega i jetre, fiksiranje u Carnoy fiksativu, kalupljenje u Paraplastu, pravljenje isečaka debljine 5 µm. Isecci tkiva sva četiri organa su potom obojeni tehnikama hematoksilin/eozin i Toluidin plavo. Tkivo slezine i timusa je dodatno obojeno Gimza metodom, a tkivo bubrega Azo carmine aniline blue (AZAN) metodom.

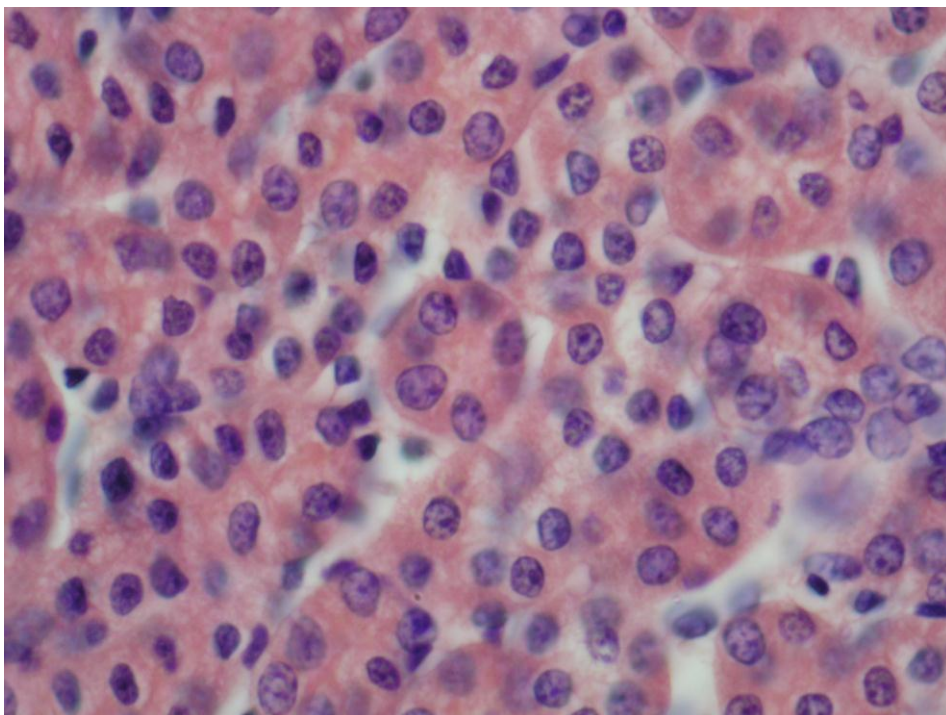
Nakon bojenja, pristupilo se pravljenju digitalnih mikrografa tkiva uz pomoć Olympus C-5060 Wide Zoom kamere postavljene na Olympus BX41 svetlosni mikroskop (uveličanje 1000x, imerzioni objektiv 100x). Primeri mikrografa navedenih tkiva obojenih različitim tehnikama su prikazani na slikama 1-14. Digitalni mikrografi tkiva su napravljeni i obrađeni po uzoru na našu prethodnu studiju (Pantic & Pantic, 2012).



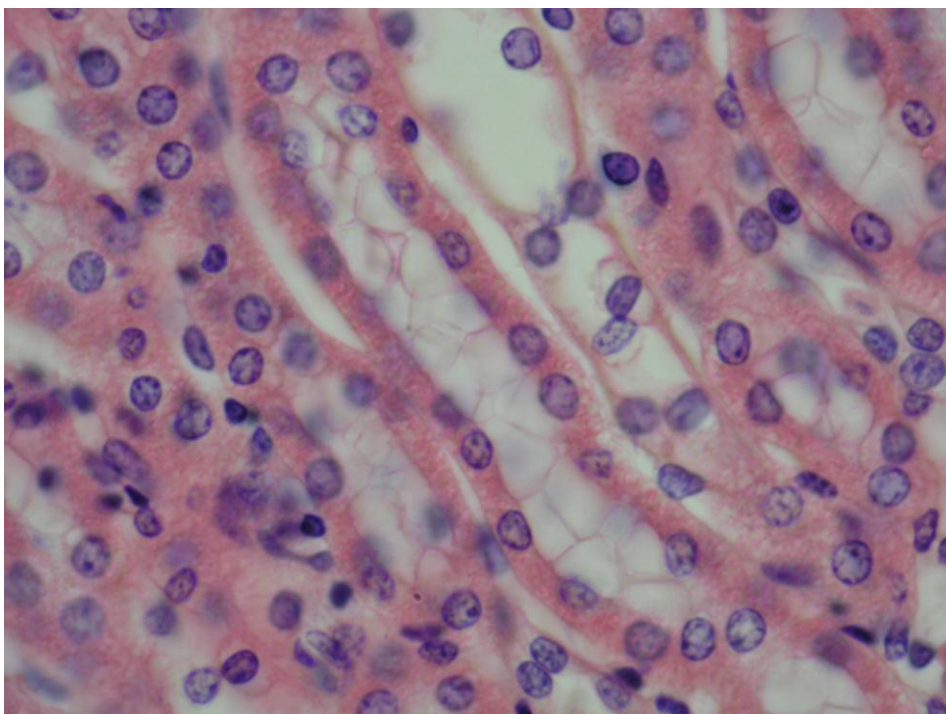
Slika 1. Jetrin lobulus nakon bojenja tehnikom hematoksilin eozin (novorođena životinja).



Slika 2. Jetrin lobulus nakon bojenja tehnikom Toluidin plavo (novorođena životinja).



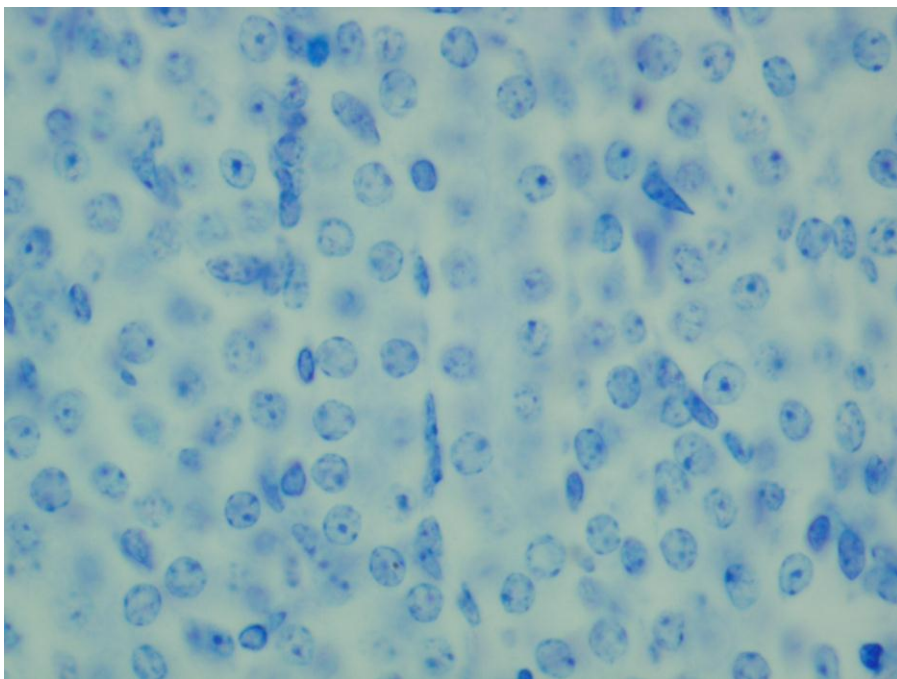
Slika 3. Proksimalni tubuli bubrega (hematoksilin-eozin bojenje, životinja stara 20 dana).



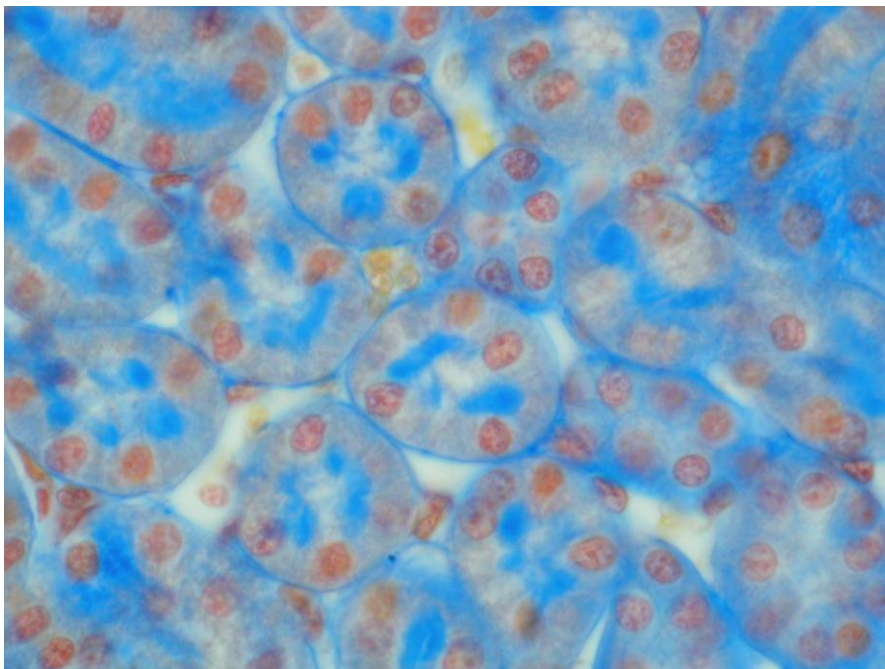
Slika 4. Medula bubrega (hematoksilin-eozin bojenje, životinja stara 210 dana).

Za svako ispitivano tkivo, uz pomoć specijalnog softvera ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) Nacionalnog instituta za zdravlje (SAD) i odovarajućih integrisanih podprograma (FracLac, Texture Analyzer) je određena srednja vrednost fraktalne dimenzije, lakunarnosti, entropije, varijanse, angularnog drugog momenta, teksturalnog kontrasta, teksturalne korelacije i inverznog momenta razlike.

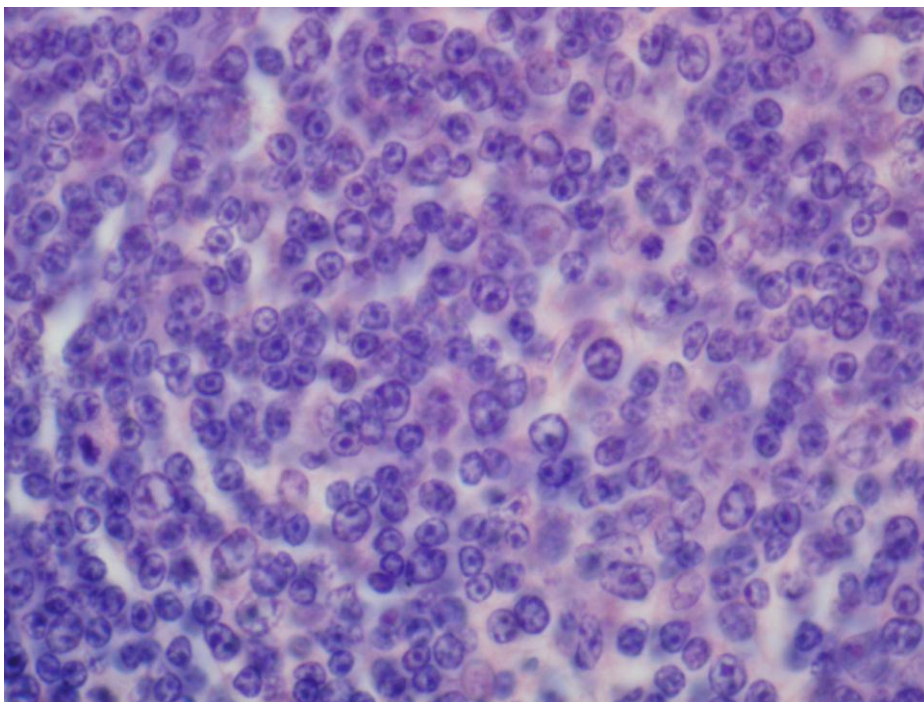
Za merenje strukturne kompleksnosti hromatina korišćene su sledeće ćelijske populacije obojene hematoksilin/eozin tehnikom: u timusu kortikalni i medularni timociti i stromalne ćelije; u slezini limfociti folikula i eritroidne prekurzorske ćelije subkapsularnog hematopoeznog tkiva; u jetri hepatociti; u bubregu ćelije proksimalnih i distalnih tubula, ćelije sabirnih kanalića kao i ćelije macule dense. Analiza pojedinačnih jedara je obavljena po uzoru na sličan protokol opisan u prethodnim studijama (Pantic et al. 2012a, Pantic et al. 2012b). Ukratko, pomoću ImageJ softvera, na odgovarajućim uzorcima ćelijskih populacija, za svako jedro je izračunata srednja hromatinska fraktalna dimenzija, lakunarnost, entropija, varijansa, angularni drugi momenat, teksturalni kontrast, teksturalna korelacija i inverzni momenat razlike. Na svakom mikrografu nasumično je izabrano minimum 12 jedara (saglasno publikovanoj studiji Pantic et al. 2012b) određivanjem takozvanih interesnih regiona (Regions of interest, ROI). Za ćelijske populacije koje su pokazivale veći stepen heterogenosti hromatinske strukture, broj analiziranih regiona po životinji je bio veći (npr. hematopoezne matične ćelije i ćelije makule denze - 20 ROI po životinji, limfociti timusa 15 ROI po životinji). Nakon toga za svaku analiziranu ćelijsku populaciju i za svaku životinju izračunata je srednja vrednost.



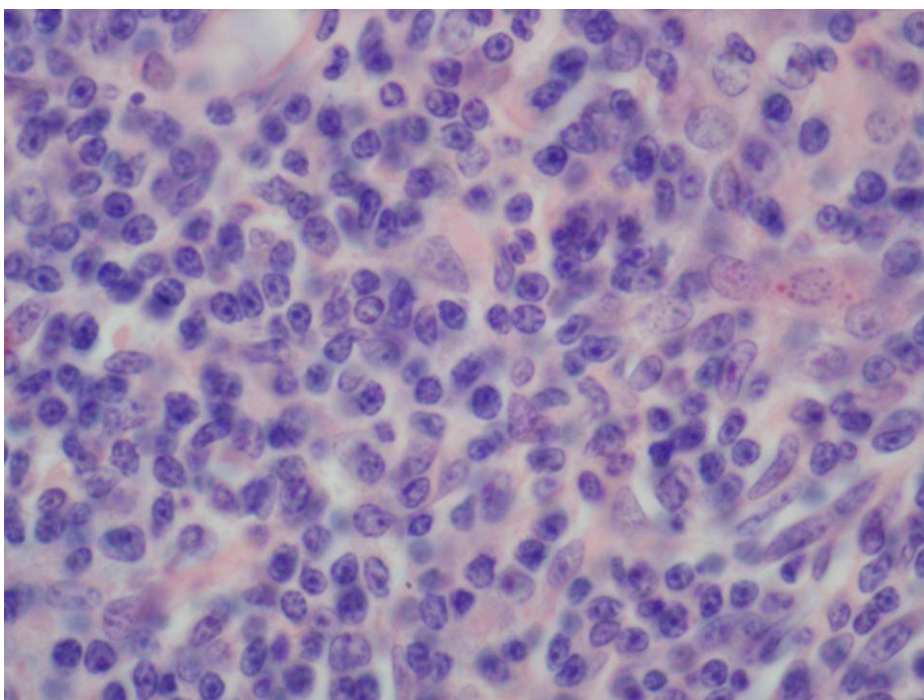
Slika 5. Medula bubrega (Toluidin plavo bojenje, životinja stara 120 dana)



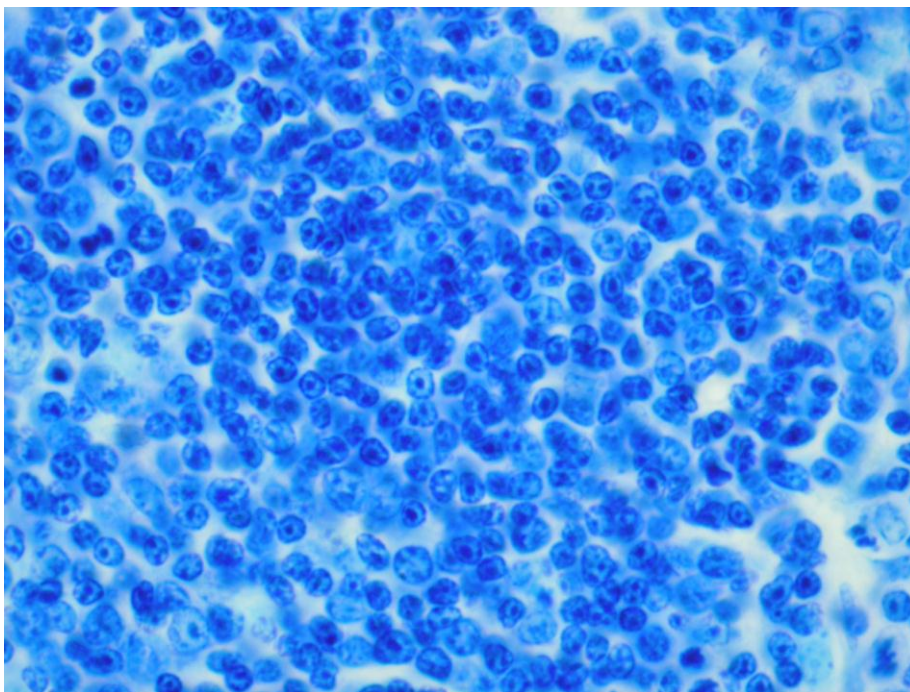
Slika 6. Korteks bubrega (AZAN bojenje, životinja stara 390 dana)



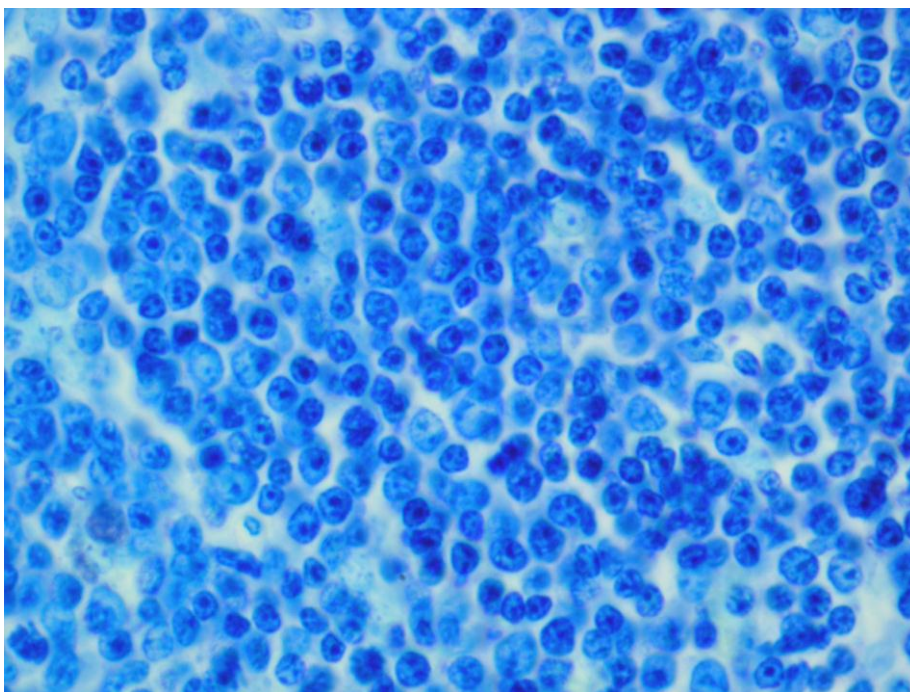
Slika 7. Korteks timusa (H/E bojenje, životinja stara 10 dana)



Slika 8. Medula timusa (H/E bojenje, životinja stara 10 dana)

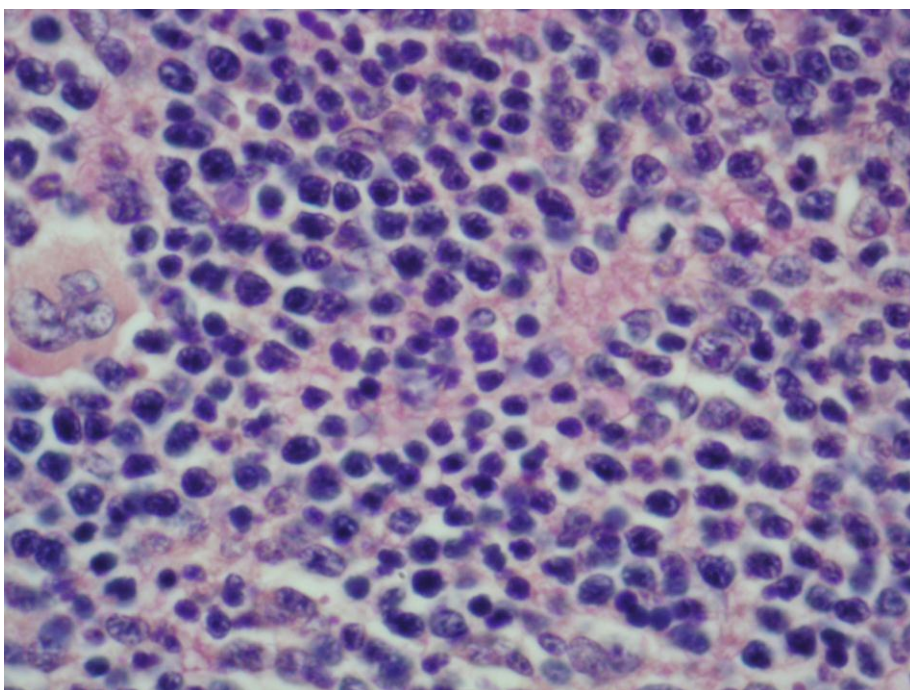


Slika 9. Korteks timusa (Toluidin plavo bojenje, životinja stara 210 dana)

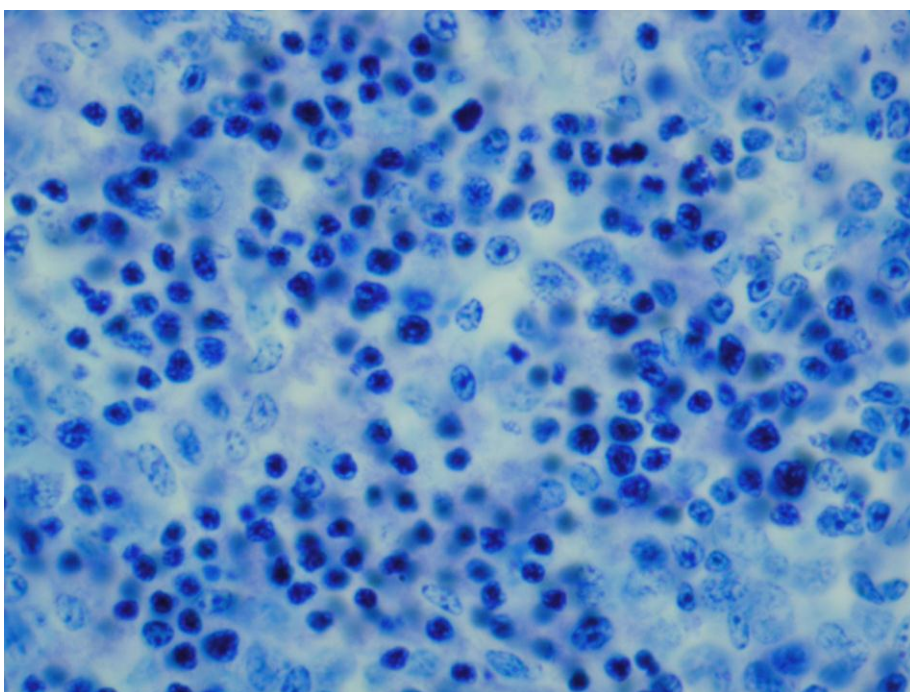


Slika 10. Medula timusa (Toluidin plavo bojenje, životinja stara 20 dana)

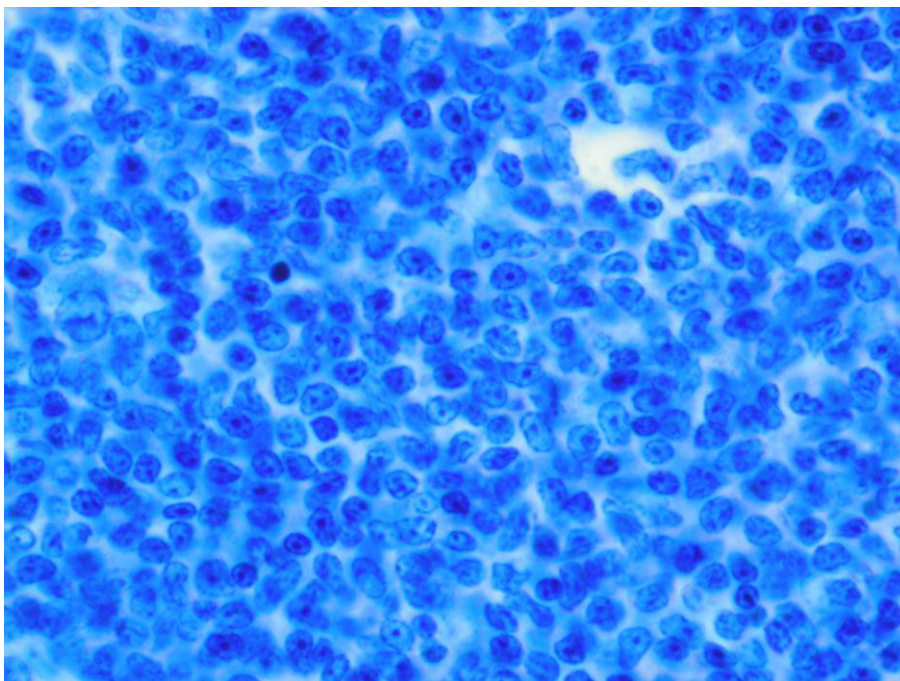




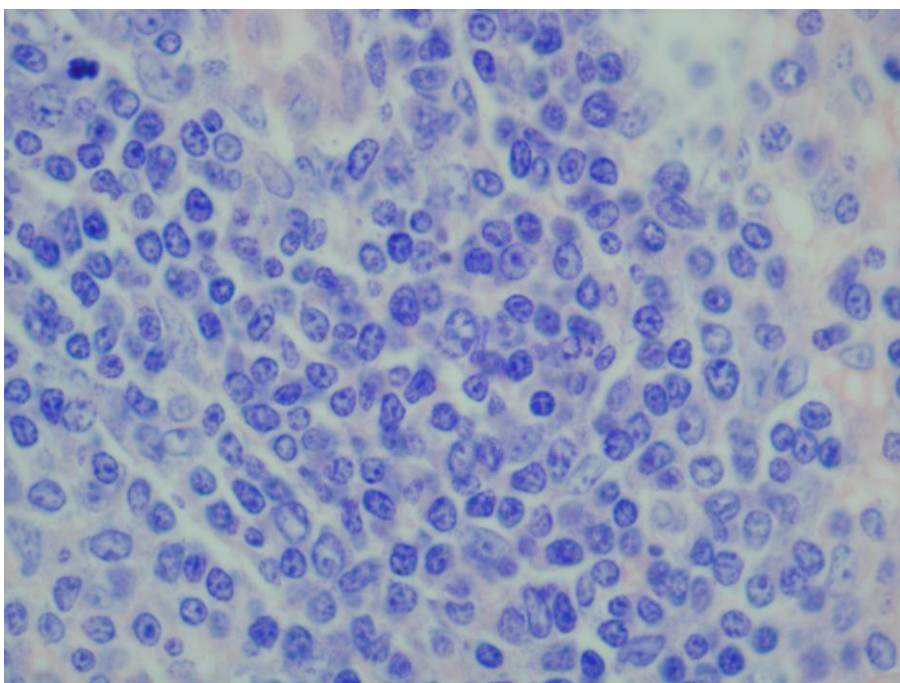
Slika 11. Hematopoezno tkivo slezine. Eritroidne prekurzorske ćelije (H/E bojenje, životinja stara 10 dana)



Slika 12. Hematopoezno tkivo slezine. Eritroidne prekurzorske ćelije (H/E bojenje, životinja stara 30 dana)



Slika 13. Primarni folikul slezine (životinja stara 10 dana, toluidin plavo bojenje)



Slika 14. Primarni folikul slezine (novorođena životinja, Gimza bojenje)

Pored testiranja povezanosti hromatinskih parametara sa starosnom dobi (pilot eksperiment) i razlike u hromatinskim parametrima između starosnih grupa, testirano je prisustvo i jačina povezanosti između parametara kompleksnosti hromatina sa jedne strane i parametara sveukupne kompleksnosti ispitivanih tkiva sa druge strane.

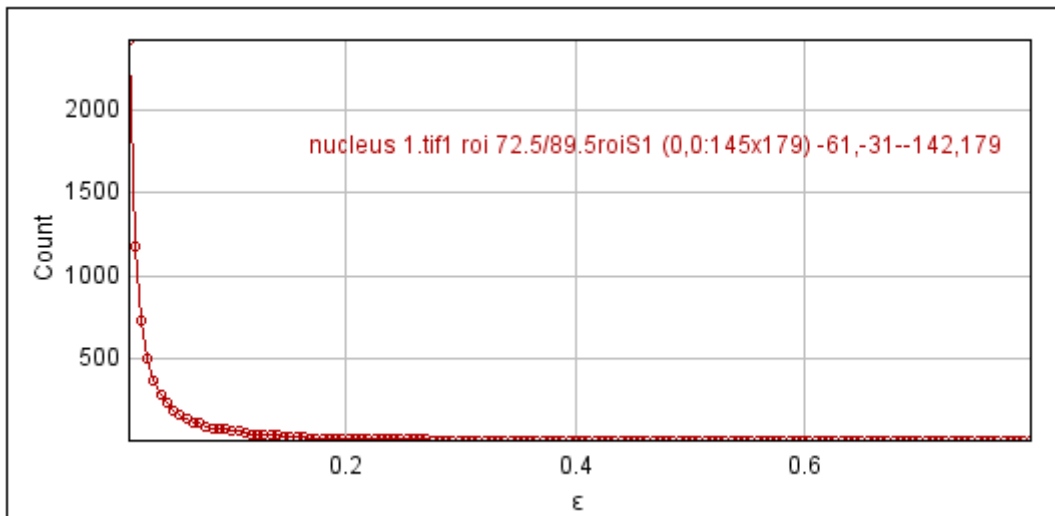
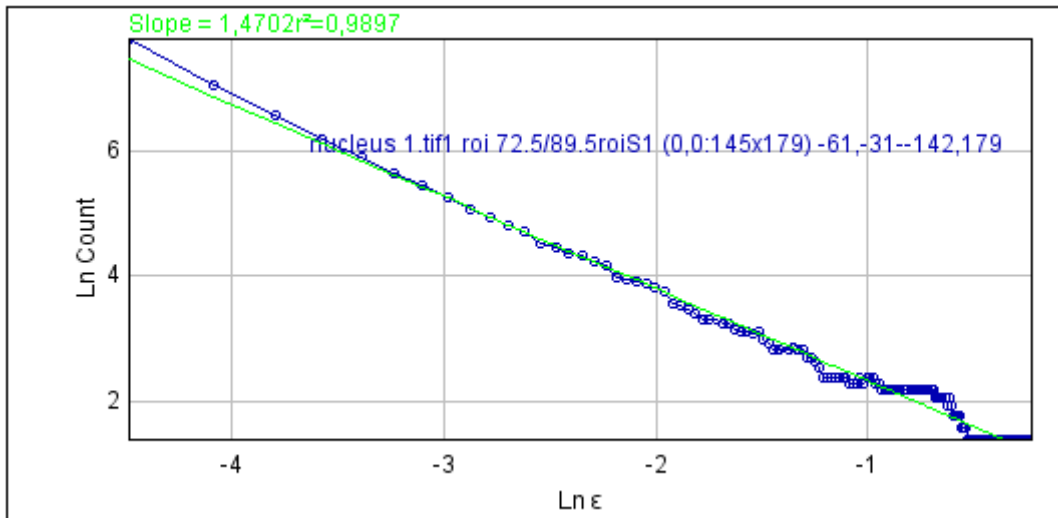
## 2.2. Fraktalna analiza

Fraktalnom analizom određene su vrednosti fraktalne dimenzije ( $D$ ) i lakunarnosti ( $\Lambda$ ) za svako analizirano tkivo, odnosno hromatinsku strukturu. Za analizu je korišćen podprogram FracLac autora Odri Karperien (Karperien, 2007).

Fraktalna dimenzija je izračunata uz pomoć box-counting metoda. Ovom metodom se fraktalni objekat prekriva serijom kvadrata (boxes) određene dimenzije ivice  $\varepsilon$ . Nakon toga softver izračunava broj kvadrata koji su makar delimično ispunjeni posmatranim objektom:  $N(\varepsilon)$ . Kada se uzmu u obzir kvadrati različitih dimenzija  $\varepsilon$ , fraktalna dimenzija se računa iz log-log grafika zavisnosti  $N(\varepsilon)$  od  $\varepsilon$  (slika 15). Kod kvadrata manjih dimenzija  $\varepsilon$ ,  $N(\varepsilon)$  postaje direktno proporcionalan  $\varepsilon^{-D}$ . Na osnovu ovoga, fraktalna dimenzija se izračunava formulom:

$$D = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\varepsilon)}{\log \varepsilon}$$

U našoj studiji fraktalna analiza je urađena nakon prethodne binarizacije digitalnih mikrografa. Ovako dobijena fraktalna dimenzija se u stručnoj literaturi često označava kao  $(D)_{\text{bin}}$ .



Slika 15. Fraktalna dimenzija je izračunata uz pomoć box-counting metoda. Ovom metodom se fraktalni objekat prekriva serijom kvadrata (boxes) određene dimenzije ivice  $\epsilon$ . Nakon toga softver izračunava broj kvadrata koji su makar delimično ispunjeni posmatranim objektom (Count, odnosno  $N(\epsilon)$ ). Kada se uzmu u obzir kvadrati različitih dimenzija  $\epsilon$ , fraktalna dimenzija se računa iz log-log grafika zavisnosti broja kvadrata od  $\epsilon$ .

Lakunarnost je određena takođe korišćenjem box-counting metoda na osnovu koeficijenta varijacije rezolucionih jedinica po kvadratu:

$$\Lambda = CV_{\varepsilon,g}^2$$

$$\Lambda = \left( \frac{\sigma_{\varepsilon,g}}{\mu_{\varepsilon,g}} \right)^2$$

pri čemu je  $\sigma$  standardna devijacija, a  $\mu$  je srednja vrednost broja piksela po kvadratu stranice  $\varepsilon$  za orijentaciju  $g$ .

U našem radu najmanja vrednost kvadrata iznosila je 2 rezolucione jedinice, a najveća vrednost je bila 1024 ili 2048 piksela u zavisnosti od broja veličine digitalnog mikrografa. Regresiona linija (nakon plotovanja vrednosti  $\log N(\varepsilon)$  prema  $\varepsilon$  pri određivanju vrednosti fraktalne dimenzije) je fitovana kroz 10 (ili 11) tačaka pri čemu je korelacioni koeficijent  $R$  u svim slučajevima bio veći od 0.95, dokazujući linearnu zavisnost između  $\log N(\varepsilon)$  i  $\varepsilon$  (Milosevic et al. 2009).

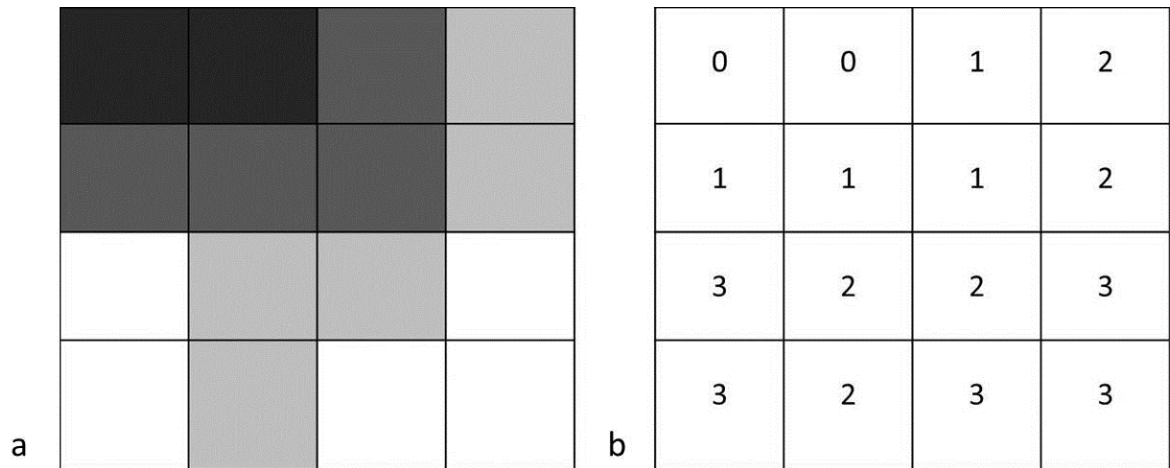
### 2.3. Teksturalna analiza

Jedan od danas najčešće korišćenih metoda za teksturalnu analizu je takozvana GLCM (Grey Level Cooccurrence Matrix) metoda, koja se zasniva na određivanju distribucije i međusobnog odnosa rezolucionih jedinica u slici. GLCM je prvi put uveden 1973. godine, od strane Roberta M. Haralika i saradnika koji su razvili metod u stanju da kvantifikuje prostorni odnos između sivih tonova (grey levels)

osvetljenosti rezolucionih jedinica (piksela) na slici. Ovaj metod koristi tzv. statistiku "drugog reda", što znači da procenjuje odnos između parova rezolucionih jedinica (piksela) u kojima su jedinice odvojene definisanim rastojanjem ( $d$ ) (Haralick et al. 1973). Ovo je značajna razlika u poređenju sa tzv. statističkim metodama "prvog reda", koje imaju mnogo jednostavniji pristup, računajući samo odnos između pojedinačnih jedinica rezolucije, a ne između grupa (parova) (Haralick et al. 1973).

Pretpostavimo da se svaki piksel na slici može definisati sa samo 4 potencijalne sive vrednosti: 0, 1, 2 i 3. Pretpostavimo takođe da se "region od interesa" (region of interest - ROI) koji želimo da analiziramo sastoji od samo 16 jedinica (distribuiranih u kvadratnom regionu 4x4 piksela; za detalje videti Haralick et al. 1973). Primer takvog ROI je prikazan na slici 16a. Na slici 16b, svakoj jedinici rezolucije je dodeljena siva vrednost ("crni" piksel ima minimalnu vrednost 0, a najsvetlijem, "belom" pikselu se dodeljuje maksimalna vrednost 3). Postoji 16 mogućih kombinacija piksel-parova na osnovu sivih vrednosti koje počinju sa kombinacijom (0,0), i završavaju se sa kombinacijom (3,3) (tabela 1). Ako uzmemo u obzir samo parove susednih piksela horizontalno, možemo da dizajniramo tabelu distribucije frekvencija ovih parova vrednosti (kombinacije) u izabranom ROI (tabela 2). Na primer, kombinacija "(0,1)" se pojavljuje samo jednom u okviru ove distribucije. Kombinacija "(1,2)" se pojavljuje dva puta. Treba napomenuti da se kombinacija "(0,0)" takođe javlja dva puta, jer prvi put "leva nulta vrednost" (slika 16b) je referentni piksel, a drugi put "desna nulta vrednost" je referentni piksel. Ovaj GLCM je dizajniran i analiziran isključivo za horizontalne parove susednih piksela (ugao 0°). Sličan matriks se može dizajnirati

za uglove 90° (vertikalni parovi susednih piksela), kao i 45° i 135° (dijagonalni parovi susednih piksela).



Slika 16. Primer interesnog regiona veličine 4x4 rezolucione jedinice (a). Svakoj rezolucionalnoj jedinici je dodeljena siva vrednost (gray value, b)

Tabela 1. Moguće kombinacije parova rezolucionalnih jedinica bazirane na njihovim sivim vrednostima, počevši od kombinacije (0,0).

Gray level	0	1	2	3
0	(0,0)	(0,1)	(0,2)	(0,3)
1	(1,0)	(1,1)	(1,2)	(1,3)
2	(2,0)	(2,1)	(2,2)	(2,3)
3	(3,0)	(3,1)	(3,2)	(3,3)

Tabela 2. Frekvencije javljanja određenih parova rezolucionih jedinica na slici 16.

(0,0) <b>2</b>	(0,1) <b>1</b>	(0,2) <b>0</b>	(0,3) <b>0</b>
(1,0) <b>1</b>	(1,1) <b>4</b>	(1,2) <b>2</b>	(1,3) <b>0</b>
(2,0) <b>0</b>	(2,1) <b>1</b>	(2,2) <b>2</b>	(2,3) <b>3</b>
(3,0) <b>0</b>	(3,1) <b>0</b>	(3,2) <b>3</b>	(3,3) <b>2</b>

Takođe, analizirani pikseli u okviru jednog para, ne moraju da budu neposredni susedi (rastojanje, odnosno vrednost  $d$  između dva piksela može biti veći od 1). Ugao i rastojanje su bitne odrednice GLCM analize; ako se ove vrednosti menjaju, statistički parametri i rezultat analize takođe može značajno promeniti, naročito u heterogenim slikama (Haralick et al. 1973).

Uz kalkulaciju i dizajn GLCM distribucije, Haralick i saradnici su takođe definisali ukupno 14 teksturalnih karakteristika izvedenih iz teksturalnog matriksa: angularni drugi momenat (angular second moment), GLCM kontrast, GLCM korelacija, varijansa, inverzni momenat razlike (inverse difference moment, homogenost), prosečna suma, suma varijanse, suma entropije, entropija, razlika varijanse, razlika entropija, informacione mere korelacije (dve veličine), i maksimalan koeficijent korelacije (Haralick et al. 1973). Danas, u medicinskim i biološkim istraživanjima, najvažniji parametri su angularni drugi momenat,



kontrast, korelacija, entropija i inverzni momenat razlike (Shamir et al. 2009; Losa & Casteli, 2005; Li & Pai, 2009; Yogesan et al. 1996).

Angularni drugi momenat (Angular second moment, *ASM*) je u našoj studiji izračunat prema sledećoj formuli:

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

gde su *i* i *j* koordinate GLCM matriksa. Angularni drugi momenat se u stručnoj literaturi često definiše kao mera uniformnosti slike.

Entropija (*ENT*) je dobijena na osnovu formule:

$$ENT = - \sum_i \sum_j p(i,j) \log(p(i,j))$$

Entropija je mera neuređenosti rezolucionih jedinica na digitalnom mikrogramu (Haralick et al. 1973).

Teksturalna korelacija kao mera povezanosti slike (textural correlation, *COR*) je izračunata na sledeći način:

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

Korelacija može imati vrednosti od -1 do +1. Vrednost 0 znači da teksturalna organizacija rezolucionih jedinica nije u korelaciji dok vrednosti +1 i -1 označavaju savršenu pozitivnu, odnosno negativnu korelaciju.

Formula za izračunavanje inverznog momenta razlike (Inverse difference moment, *IDM*) je sledeća:

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

Inverzni momenat razlike je mera homogenosti slike. Heterogeni mikrografi imaju manju vrednost IDM i obrnuto.

Teksturalni kontrast (*CON*) kontrast kao mera obrnuto proporcionalna inverznom momentu razlike se računa kao:

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

Kontrast u osnovi procenjuje razliku sivih vrednosti između dve susedne rezolucione jedinice.

Varijansa teksturalnog matriksa (*Variance*) se određuje pomoću formule:

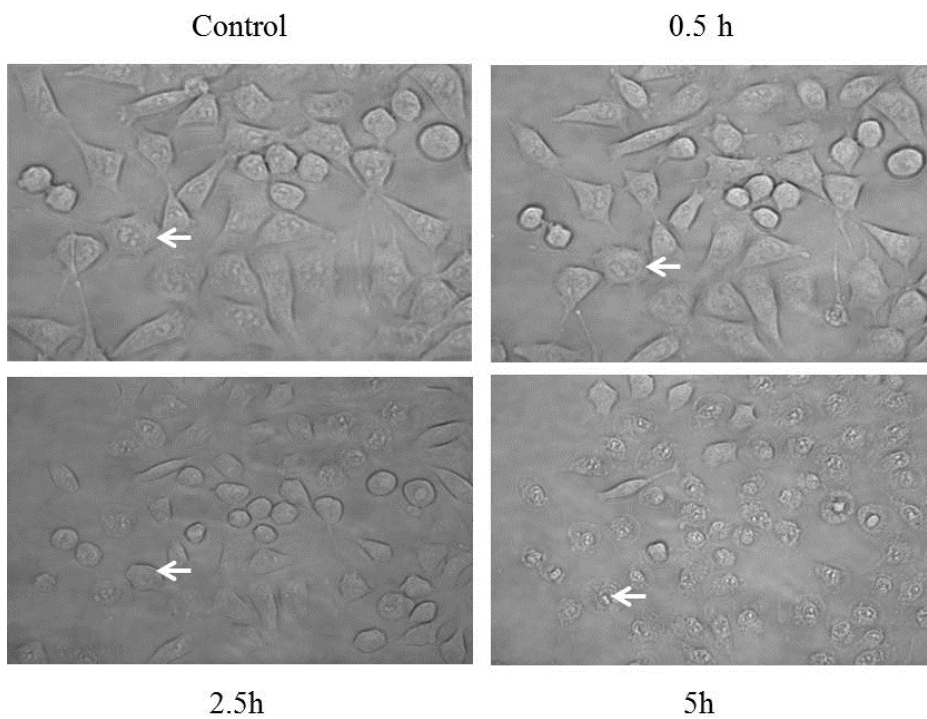
$$\text{Variance} = \sum_i \sum_j (i - \mu)^2 p(i, j)$$

Vrednosti varijanse zavise od koeficijenta varijacije sivih vrednosti rezolucionih jedinica.

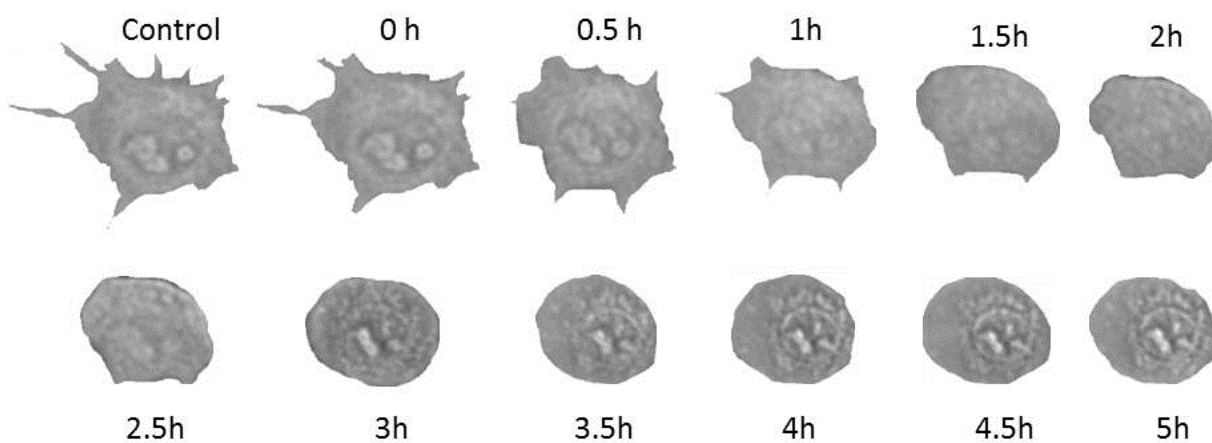
#### **2.4. Eksperiment na ćelijskoj kulturi**

Istraživanje je obavljeno na kulturi kancerskih ćelija linije U251 (donacija Dr. Pedro Tranque, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain), prethodno čuvanih u standardnom RPMI 1640 medijumu sa dodatkom 5% FCS (fetal calf serum), 2 mM L-glutamina, 10 mM natrijum piruvata i penicilina, odnosno streptomocina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Nakon dobijanja jednoćelijske suspenzije tripsinom, ćelije su zasađene u sterilne Petri šolje za kultivaciju (dijametra 35 mm) u koncentraciji 300 000/mL.

Ćelije su tretirane UVB zracima talasne dužine 312 nm uz pomoć transiluminatora Vilber Lourmat TFX-20M (6 x 15 W, LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg, Nemačka) u ukupnom trajanju od 15 minuta. Izlaganje ćelija u kulturi UV zracima je često korišćeni model indukovanog starenja (fotostarenja) pri čemu UV zraci u relativno kratkom vremenskom period u jedru ćelija izazivaju promene (akumulacija DNK oštećenja) koje nalikuju promenama tokom biološkog starenja (Almagor & Cole, 1989; Nyström & Osiewacz, 2004; Rochette & Brash, 2010).



Slika 17. Čelije linije U251 u različitim vremenskim tačkama (Control-pre UV tretmana, *in vitro* eksperiment)



Slika 18. Pojedinačna analizirana ćelija (prikazana na gornjoj slici) u različitim vremenskim tačkama (Control-pre UV tretmana, 0h-neposredno nakon UV tretmana; *in vitro* eksperiment)

Uzorak od 32 individualne ćelije (vezani uzorak) je praćen kroz 12 vremenskih tačaka: pre UV tretmana, odmah nakon UV tretmana, kao i do 5h nakon tretmana u rasponu od 30 minuta. Prva vremenska tačka (neposredno pre UV tretmana) predstavljala je kontrolu (slike 17 i 18). Za vizuelizaciju i slikanje ćelija korišćen je Leica Microsystems fazno-kontrastni mikroskop (uveličanje 400x). Slično kao i kod studije na oglednim životinjama, uz pomoć ImageJ softvera (NIH, SAD) za svako ćelijsko jedro u svakoj vremenskoj tački određena je vrednost fraktalne dimenzije, lakunarnosti, entropije, angularnog drugog momenta, teksturalnog kontrasta, teksturalne korelacije, varijanse i inverznog momenta razlike, u skladu sa gore navedenim tekstom. Testiralo se da li postoji statistički značajna razlika u fraktalnim i GLCM parametrima hromatina u navedenim vremenskim tačkama u poređenju sa kontrolom (ćelije pre UV tretmana).

## **2.5. Citofluorometrijska analiza markera apoptoze**

Kao dodatak *in vitro* delu studije, citofluorometrijskim metodama (Aneksin/propidium jodid bojenje, aktivnost kaspaza i analiza ćelijskog ciklusa), određen je trenutak (vremenska tačka) nastupanja programirane ćelijske smrti (apoptoze) za dato izlaganje UV zracima. Na ovaj način je procenjena senzitivnost fraktalnih i GLCM parametara u detektovanju finih strukturnih promena u hromatinu koje prethode citofluorometrijskoj identifikaciji apoptoze.

### *2.5.1. Aktivnost kaspaza*

Aktivnost kaspaza (cysteine-dependent aspartate-directed proteases) je merena nakon obeležavanja ćelija FITC-konjugovanim pan-kaspaznim inhibitorom (ApoStat; R&D Systems, Minneapolis, MN). Povećanje u zelenoj fluorescenciji (515-545 nm) kao mera aktivnosti kaspaza u ćelijama analiziranog uzorka, određena je uz pomoć FACSCalibur protočnog citofluorometra. Rezultati su izraženi kao procenat ćelija koje poseduju aktivne kaspaze.

### *2.5.2. Merenje permeabilnosti ćelijske membrane*

Merenje permeabilnosti ćelijske membrane je analizirano dvostrukim bojenjem sa aneksin V-FITC i propidium jodidom. Tokom ovog procesa, aneksin se vezuje sa ćelije u ranoj apoptozi koje eksprimiraju fosfatidilserin. Te ćelije su tzv. annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>. Propidium jodid sa druge strane obeležava ćelije koje se nalaze u kasnom stadijumu apoptoze i kod kojih je nastupilo oštećenje membrane. Takve ćelije se označavaju kao annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>.

### *2.5.3. Analiza fragmentacije DNK*

Fragmentacija DNK je procenjena analizom ćelijskog ciklusa nakon fiksacije ćelija etanolom i bojenja DNK-vezujućom bojom, propidium jodidom, kao što je prethodno opisano. Za detalje o metodi, pogledati referencu Kaludjerovic et al. (2005).

## 2.6. Statistička analiza

U delu studije na ćelijskoj kulturi, za detektovanje razlike između pojedinih vremenskih tačaka korišćen je ANOVA test za vezani uzorak. Za procenu statističke značajnosti razlike između ispitivanih starosnih grupa životinja korišćen je ANOVA test za nezavisne uzorke i post hoc Dunnett test. P vrednost manja od 0.05 smatrana je statistički značajnom.

Za procenu statističke značajnosti povezanosti (korelacije) korišćena je Pearsonova, odnosno Spearmanova korelacija u zavisnosti od parametarske prirode podataka i normalnosti distribucije.

Statistička analiza je urađena uz pomoć specijalizovanih programa GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA) i SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Za grafičko prikazivanje podataka vezanih za korelacionu analizu, korišćen je softver OriginPro 8.0 (Origin Labs, CA, USA) i Office Excel (Microsoft Corporation, CA, USA).

### 3. REZULTATI

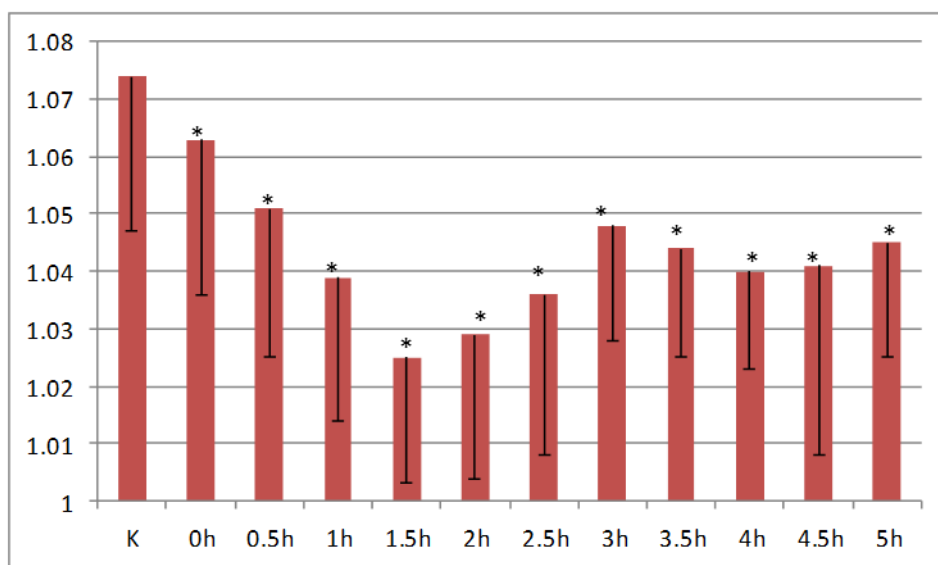
#### 3.1. Rezultati *in vitro* eksperimenta

##### 3.1.1. Promene u fraktalnoj dimenziji i lakunarnosti cele ćelije nakon UV tretmana

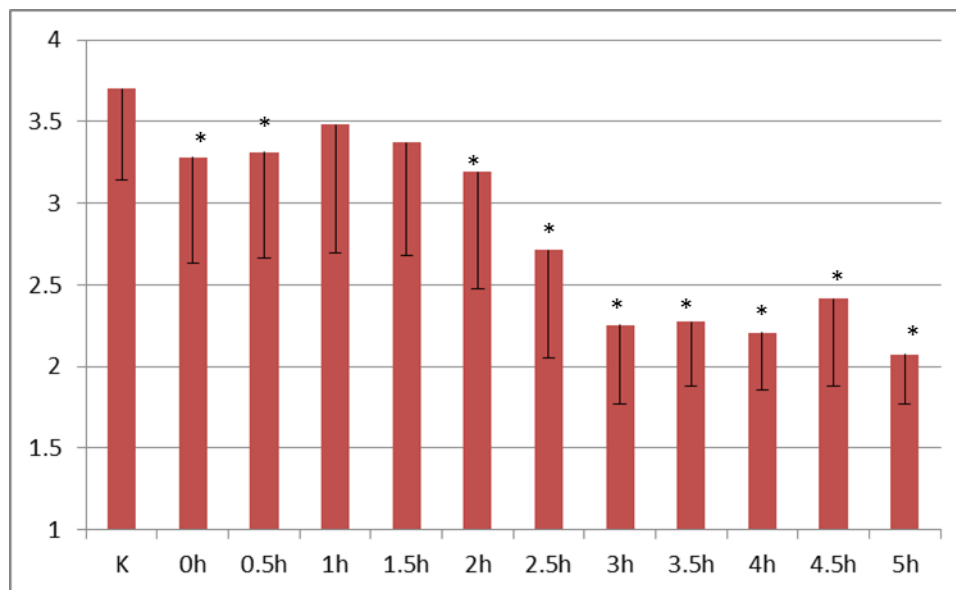
Prosečna vrednost fraktalne dimenzije cele ćelije pre tretmana ultraljubičastim zracima je bila  $1.074 \pm 0.027$ , a lakunarnosti  $3.701 \pm 0.561$ . Prosečne vrednosti fraktalne dimenzije i lakunarnosti u različitim vremenskim tačkama su prezentovane na slikama 19 i 20. Oba parametra su pokazala relativno veliki stepen homogenosti, sa niskim standardnim devijacijama i koeficijentom varijacije (manjim od 20%).

Nakon UV tretmana, i celularna fraktalna dimenzija i lakunarnost su počele da se smanjuju (slika 19). Trideset minuta nakon tretmana, celularna fraktalna dimenzija je pala na  $1.051 \pm 0.026$  što je predstavljalo statistički visoko signifikantan pad u poređenju sa kontrolom ( $p < 0.001$ ). U sledećim vremenskim tačkama, celularna fraktalna dimenzija je ostala značajno manja od kontrole, sa najvećim zabeleženim padom 1.5h i 2h nakon tretmana ( $1.025 \pm 0.028$ , odnosno  $1.029 \pm 0.025$ ). Ovaj ustaljeni pad celularne fraktlane dimenzije ukazuje da je ona potencijalno visoko senzitivni parametar u kvantifikaciji diskretnih mikroskopskih promena u individualnim ćelijama nakon tretmana UV zracima.





Slika 19. Fraktalna dimenzija celih ćelija u različitim vremenskim tačkama.  
\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



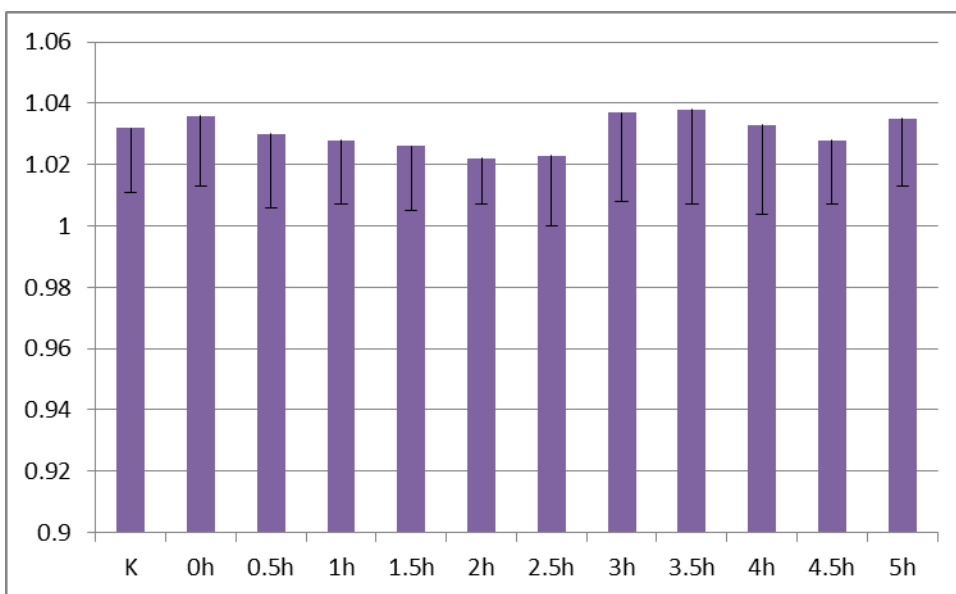
Slika 20. Lakunarnost celih ćelija u različitim vremenskim tačkama  
\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom

Celularna lakunarnost se takođe smanjila nakon tretmana, i ovaj pad je postao statistički značajan odmah nakon ozračivanja ( $3.282 \pm 0.651$ ,  $p < 0.01$ , slika 20). Lakunarnost je ostala statistički značajno smanjena tokom sledećih 30 minuta, međutim, posle 60 i 90 minuta, lakunarnost se povećala i njene vrednosti nisu bile statistički značajno drugačije u poređenju sa kontrolom. Celularna lakunarnost je ponovo pala 2 časa nakon tretmana ( $3.190 \pm 0.718$ ,  $p < 0.05$ ), i ostala je na niskim vrednostima do kraja eksperimenta. Pet časova nakon tretmana prosečna vrednost celularne lakunarnosti je dostigla najmanji nivo ( $2.073 \pm 0.301$ ,  $p < 0.001$ ).

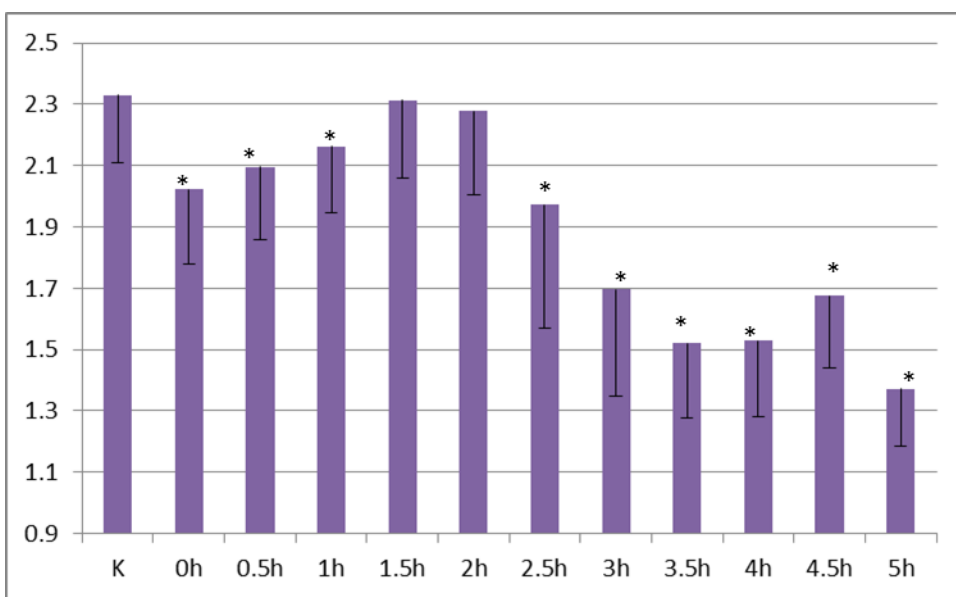
### *3.1.2 Promene u fraktalnoj dimenziji i lakunarnosti jedra nakon UV tretmana*

Nuklearna fraktalna dimenzija ćelija pre UV tretmana bila je  $1.032 \pm 0.021$ , a lakunarnost  $2.330 \pm 0.228$ . Srednje vrednosti nuklearne fraktalne dimenzije i lakunarnosti u različitim vremenskim tačkama prikazane su na slikama 21 i 22. Nuklearna fraktalna dimenzija je dostigla maksimum 3.5h (210 minuta) nakon tretmana ( $1.038 \pm 0.031$ ), a bila je na najmanjem nivou dva časa nakon tretmana ( $1.022 \pm 0.015$ ). Nijedna vrednost nuklearne fraktalne dimenzije, za bilo koju posmatranu vremensku tačku, nije se statistički razlikovala u poređenju sa kontrolom ( $p > 0.05$ ).

Nuklearna lakunarnost se statistički značajno smanjila odmah nakon tretmana ( $2.023 \pm 0.245$  prema kontroli  $2.330 \pm 0.228$ ,  $p < 0.05$ ), a 30 minuta i prvog sata, razlika je postala statistički visoko signifikantna ( $2.096 \pm 0.237$ , odnosno  $2.162 \pm 0.217$ ,  $p < 0.01$ ).



Slika 21. Nuklearna fraktalna dimenzija u različitim vremenskim tačkama.



Slika 22. Nuklearna lakunarnost u različitim vremenskim tačkama

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom

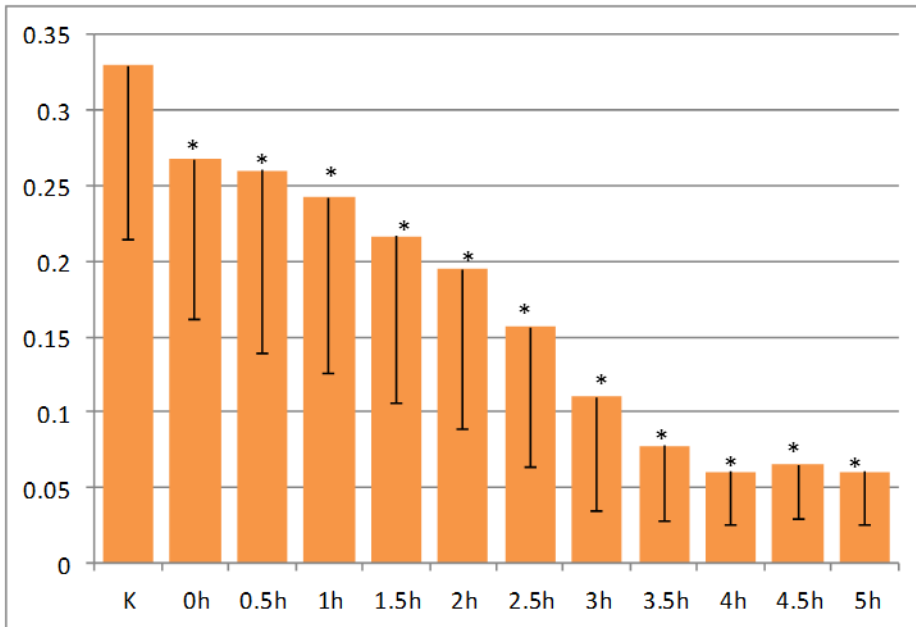
Međutim, tokom narednog sata, nuklearna lakunarnost se povećala, a statistička značajnost izgubila. (u vremenskoj tački 1.5h iznosila je  $2.313 \pm 0.253$ ,  $p > 0.05$ ). 2.5 h posle tretmana, lakunarnost je ponovo opala ( $1.972 \pm 0.401$ ,  $p < 0.001$ , u poređenju sa kontrolom), i ostala je relativno niska sve do kraja eksperimenta. Svoju minimalnu vrednost ( $1.373 \pm 0.188$ ,  $p < 0.001$ ), nuklearna lakunarnost je dostigla 5 časova nakon tretmana.

### *3.1.3. Rezultati teksturalne analize u in vitro eksperimentu*

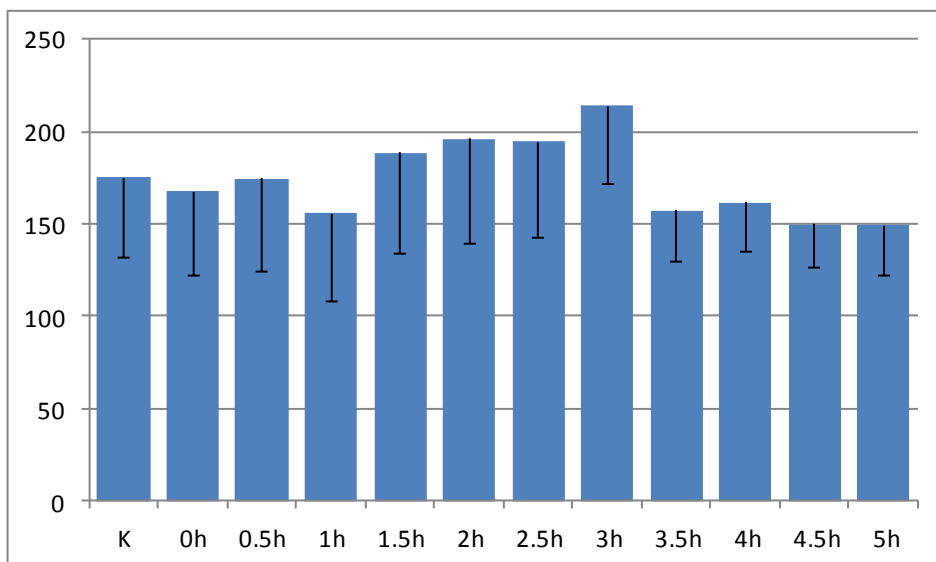
#### *3.1.3.1. Teksturalna analiza celih ćelija*

Vrednost angularnog drugog momenata za cele ćelije pre tretmana iznosila je  $0.330 \pm 0.115$ . Nakon ozračivanja ova vrednost se statistički značajno smanjila ( $0.267 \pm 0.107$ ,  $p < 0.05$ , slika 23), da bi 60 minuta nakon tretmana razlika postala statistički visoko signifikantna ( $0.243 \pm 0.117$ ,  $p < 0.01$ , slika 23). ASM je tokom narednih nekoliko časova ostao smanjen: 2h nakon tretmana  $0.195 \pm 0.106$ ; 3h nakon tretmana  $0.110 \pm 0.076$ ; 4 časa nakon tretmana  $0.061 \pm 0.036$ . Minimalnu vrednost tokom eksperimenta, ASM je dostigao 5h nakon tretmana i ona je iznosila  $0.060 \pm 0.036$ , što je takođe visoko statistički značajno manje u poređenju sa kontrolom ( $p < 0.001$ ).

Teksturalni kontrast kontrole je iznosio  $175.4 \pm 43.2$  (slika 24). Nakon tretmana, ova vrednost se smanjila na  $167.6 \pm 45.6$ , da bi se 30 minuta nakon tretmana povećala na  $174.6 \pm 50.3$ . U oba slučaja promene nisu bile statistički značajne u poređenju sa kontrolom ( $p > 0.05$ ).



Slika 23. Angularni drugi momenat celih ćelija u različitim vremenskim tačkama.  
\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



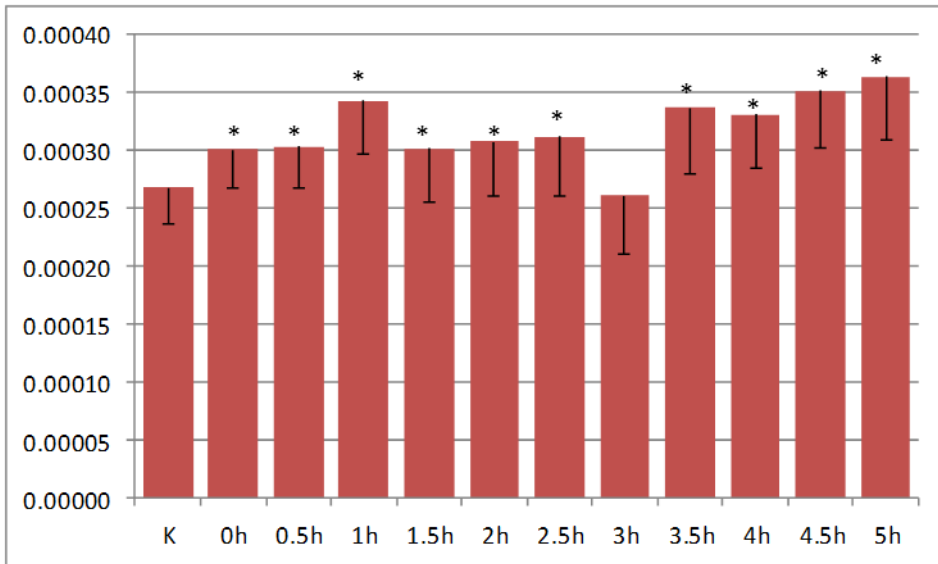
Slika 24. Teksturalni kontrast celih ćelija u različitim vremenskim tačkama

Vrednost teksturalnog kontrasta je nastavila da varira tokom narednih časova da bi na kraju eksperimenta iznosila  $149.4 \pm 27.8$ . Ni u jednoj vremenskoj tački nije zabeležena statistički značajna promena ovog parametra u odnosu na ćelije pre tretmana ( $p > 0.05$ , slika 24).

Teksturalna korelacija celih ćelija u kontrolnoj grupi iznosila je  $0.00027 \pm 0.00003$ . Neposredno nakon tretmana UV zracima, vrednost korelacije je porasla na  $0.00030 \pm 0.00003$  što je bilo statistički značajno u poređenju sa kontrolom ( $p < 0.05$ ). Vrednosti korelacije su ostale povišene u svim ostalim vremenskim tačkama (1h:  $0.00034 \pm 0.00005$ ; 2h:  $0.00031 \pm 0.00005$ ; 4h:  $0.00033 \pm 0.00005$ ,  $p < 0.05$ ) izuzev 3 časa nakon tretmana ( $0.00026 \pm 0.00005$ ), gde nije detektovana statistički značajna promena ( $p > 0.05$ ). Maksimalnu vrednost, teksturalna korelacija je dostigla 5 časova nakon UV tretmana ( $0.00036 \pm 0.00006$ ,  $p < 0.01$ , slika 25).

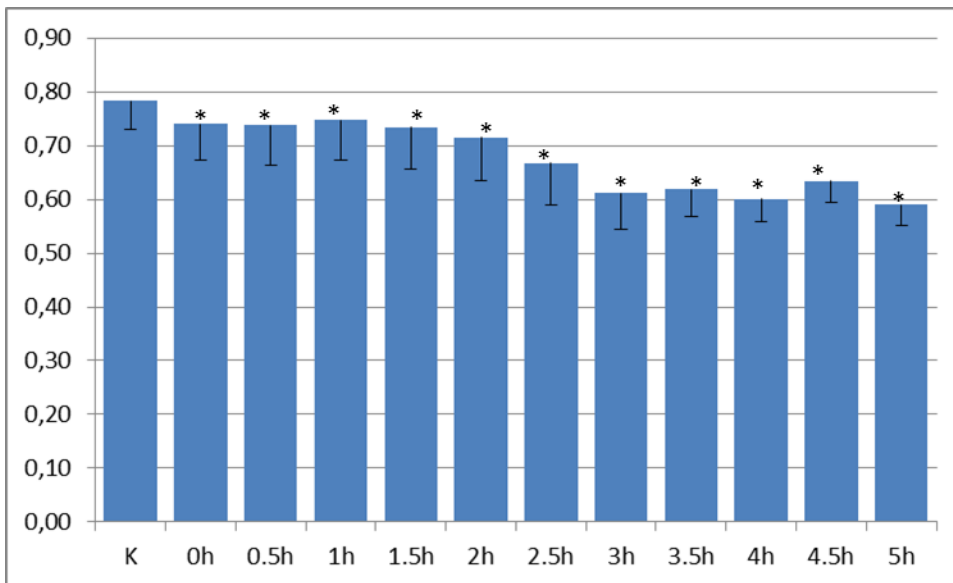
Inverzni momenat razlike celih ćelija pre tretmana iznosio je  $0.78 \pm 0.05$ , a neposredno nakon tretmana  $0.74 \pm 0.07$ , što je predstavljalo statistički značajno smanjenje ( $p < 0.05$ ). U narednim vremenskim tačkama, IDM vrednost je ostala smanjena (1h:  $0.75 \pm 0.07$ ; 2h:  $0.71 \pm 0.08$ ; 3h:  $0.61 \pm 0.07$ ,  $p < 0.05$ ). Inverzni momenat razlike je dostigao svoju minimalnu vrednost  $0.59 \pm 0.04$  na kraju eksperimenta, 5 časova nakon tretmana ( $p < 0.01$ , slika 26).

Teksturalna entropija celih ćelija pre tretmana iznosila je  $3.03 \pm 0.60$ , a neposredno nakon tretmana  $3.49 \pm 0.68$ , što je predstavljalo statistički značajno povećanje ( $p < 0.05$ ). 30 minuta nakon tretmana, to povećanje je postalo statistički visoko signifikantno ( $3.53 \pm 0.74$ ;  $p < 0.01$ , slika 27).



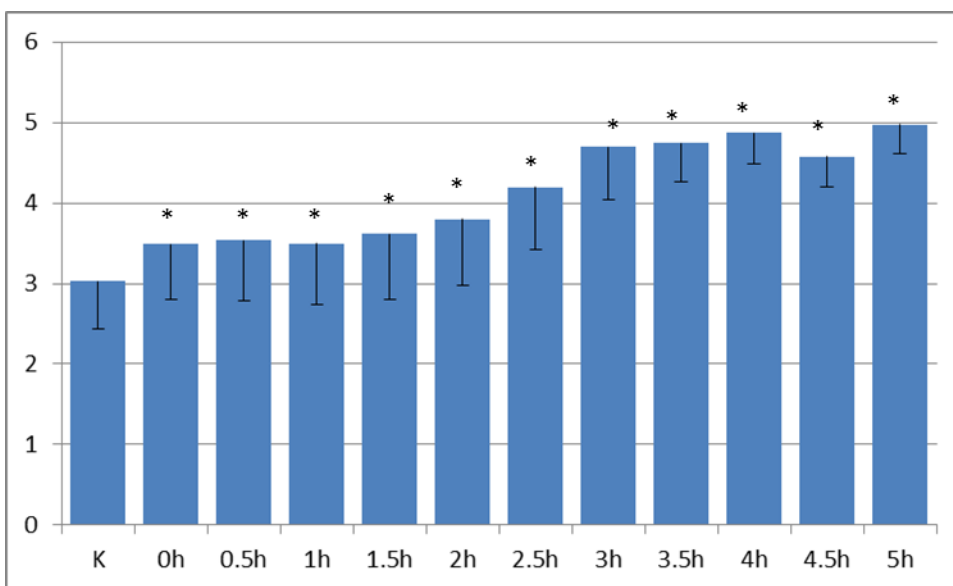
Slika 25. Teksturalna korelacija celih ćelija u različitim vremenskim tačkama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



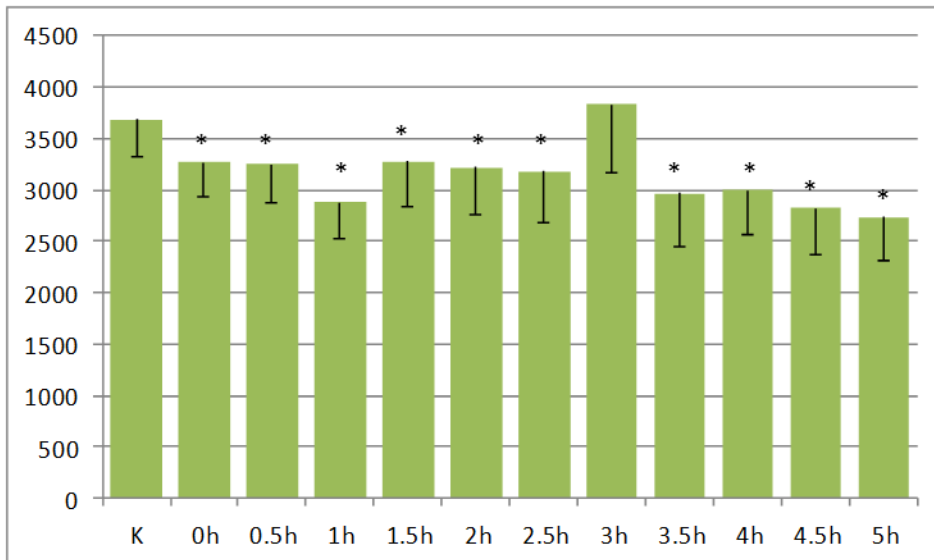
Slika 26. Inverzni momenat razlike celih ćelija u različitim vremenskim tačkama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



Slika 27. Teksturalna entropija celih ćelija u različitim vremenskim tačkama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



Slika 28. Teksturalna varijansa celih ćelija u različitim vremenskim tačkama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



U narednim vremenskim tačkama, entropija je nastavila da raste (1h:  $3.50 \pm 0.75$ ; 2h:  $3.80 \pm 0.82$ ; 3h:  $4.70 \pm 0.65$ ; 4h:  $4.87 \pm 0.39$ ,  $p < 0.01$ ), da bi 5 časova nakon tretmana entropija dostigla maksimalnu vrednost od  $4.97 \pm 0.36$  ( $p < 0.01$ , slika 27).

Teksturalna varijansa na početku eksperimenta iznosila je  $3684.7 \pm 364.2$ , a neposredno nakon tretmana uočen je statistički visoko značajan pad njene vrednosti ( $3269.1 \pm 331.3$ ;  $p < 0.01$ ). Varijansa je tokom eksperimenta nastavila da pada sa izuzetkom u vremenskoj tački 3h nakon tretmana (1h:  $2878.2 \pm 353.1$ ; 2h:  $3217.8 \pm 462.4$ ; 3h:  $3835.9 \pm 669.9$ ; 4h:  $2998.7 \pm 440.7$ ). Minimalna vrednost teksturalne varijanse zabeležena je 5 časova nakon tretmana ( $2734.6 \pm 430.4$ ,  $p < 0.01$ , slika 28).

### *3.1.3.2. Rezultati teksturalne analize jedarne strukture*

Angularni drugi momenat jedra u ćelijama pre tretmana iznosio je  $0.058 \pm 0.024$ . Neposredno nakon tretmana njegova vrednost se nije statistički značajno promenila i iznosila je  $0.058 \pm 0.029$ . Svoju maksimalnu vrednost, angularni drugi momenat dostigao je 1.5h nakon tretmana ( $0.066 \pm 0.039$ ), a minimalnu 4.5h nakon tretmana ( $0.045 \pm 0.018$ ). Nijedna od detektovanih promena ni u jednoj vremenskoj tački nije bila statistički značajna u poređenju sa kontrolom ( $p > 0.05$ , slika 29).

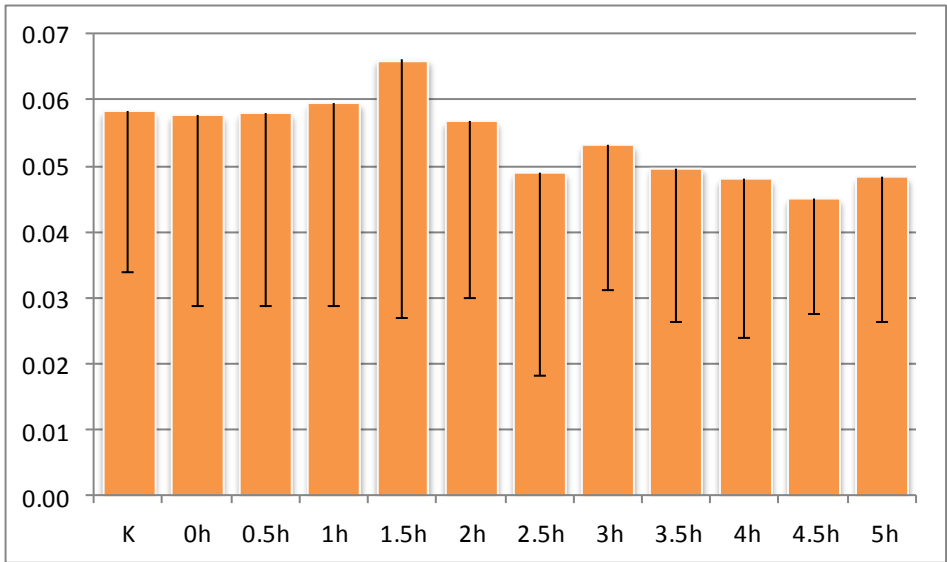
Teksturalni kontrast jedra u kontrolnoj grupi je iznosio  $260.6 \pm 80.8$ . Nakon tretmana, vrednost kontrasta se smanjila ( $237.6 \pm 59.5$ ), ali promena nije bila statistički značajna ( $p > 0.05$ ). 90 minuta nakon tretmana uočeno je naglo povećanje kontrasta

(288.3±71.2) koje se u većoj ili manjoj meri održalo sve do kraja eksperimenta, ali je dostiglo statistički značajne vrednosti tek 3h nakon tretmana (344.3±110.3,  $p<0.01$ ). Statistički značajni skok teksturalnog kontrasta detektovan je i 4h i 4.5h nakon tretmana (334.6±102.2, odnosno 332.9±93.1,  $p<0.01$ , slika 30).

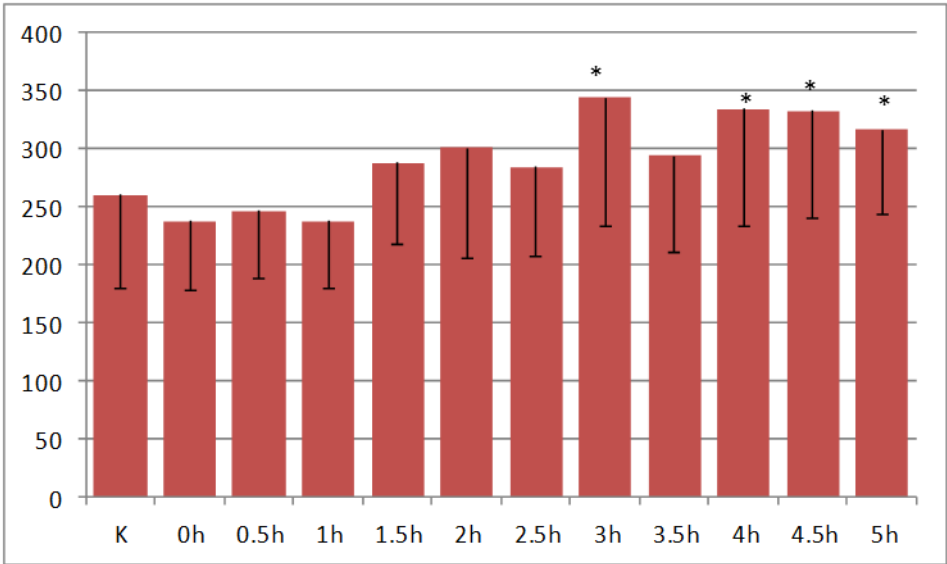
Vrednost teksturalne korelacije jedra pre tretmana iznosila je 0.00036±0.00007. Neposredno nakon tretmana uočen je statistički visoko značajan rast korelacije na nivo od 0.00041±0.00007 ( $p<0.01$ ), a visoke vrednosti su izmerene 30 minuta (0.00042±0.00006,  $p<0.01$ ) i jedan čas nakon tretmana kada je dostignut maksimum (0.00047±0.00007,  $p<0.01$ ). Minimalna vrednost teksturalne korelacije jedra izmerena je 3 časa nakon tretmana: 0.00029 ± 0.00003 (slika 31).

Inverzni momenat razlike jedra u kontrolnoj vremenskoj tački iznosio je 0.605±0.034, neposredno nakon tretmana 0.578±0.043 ( $p>0.05$ ), 30 minuta nakon tretmana 0.593±0.037 ( $p>0.05$ ), a 1 čas nakon tretmana 0.625±0.034 ( $p>0.05$ ). Vrednosti inverznog momenta razlike zabeležile su statistički značajan pad 2.5h nakon tretmana (0.566±0.065  $p<0.01$ ), i taj pad se održao sve do kraja eksperimenta (3h: 0.504±0.060; 4h: 0.476±0.053; 5h: 0.461±0.046;  $p<0.01$  za sve tri vremenske tačke, slika 32).

Entropija jedra ćelija pre tretmana je iznosila 4.65±0.28, neposredno nakon tretmana 4.88±0.32, a 30 minuta nakon tretmana 4.74±0.29. Ove promene nisu bile statistički značajne ( $p>0.05$ ). Vrednosti nuklearne entropije su zabeležile statistički značajan rast 2.5h nakon tretmana (4.95±0.52,  $p<0.01$ ), i ostale su visoke do kraja eksperimenta 3h: 5.41±0.47; 4h: 5.54±0.35; 5h: 5.62 ±0.31;  $p<0.01$  za sve tri vremenske tačke, slika 33).

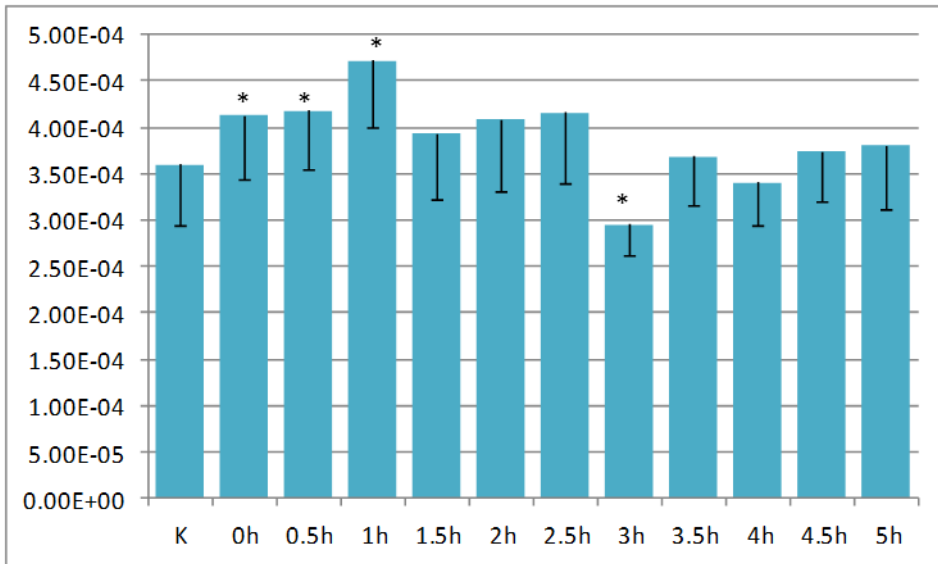


Slika 29. Angularni drugi momenat jedra u različitim vremenskim tačkama



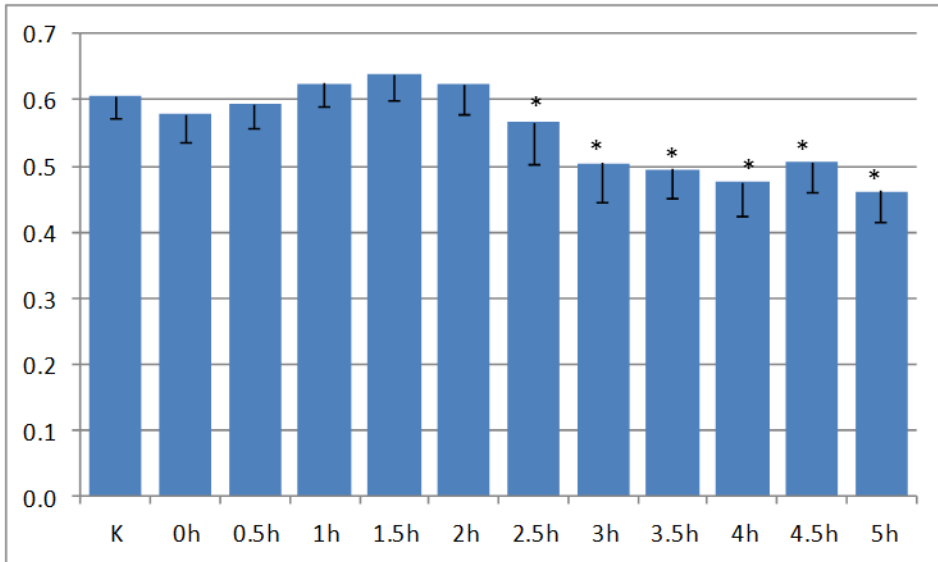
Slika 30. Teksturalni kontrast jedra u različitim vremenskim tačkama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



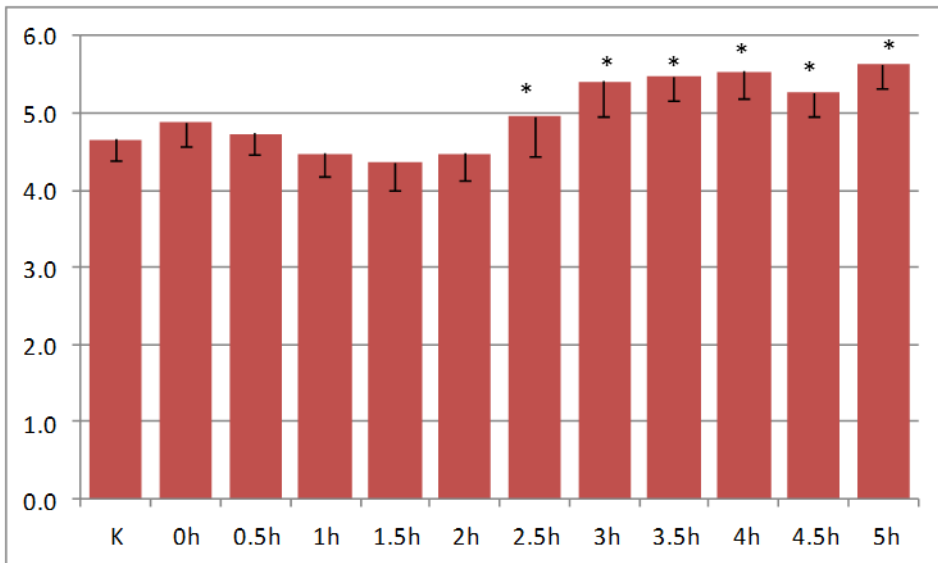
Slika 31. Teksturalna korelacija jedra u različitim vremenskim tačkama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



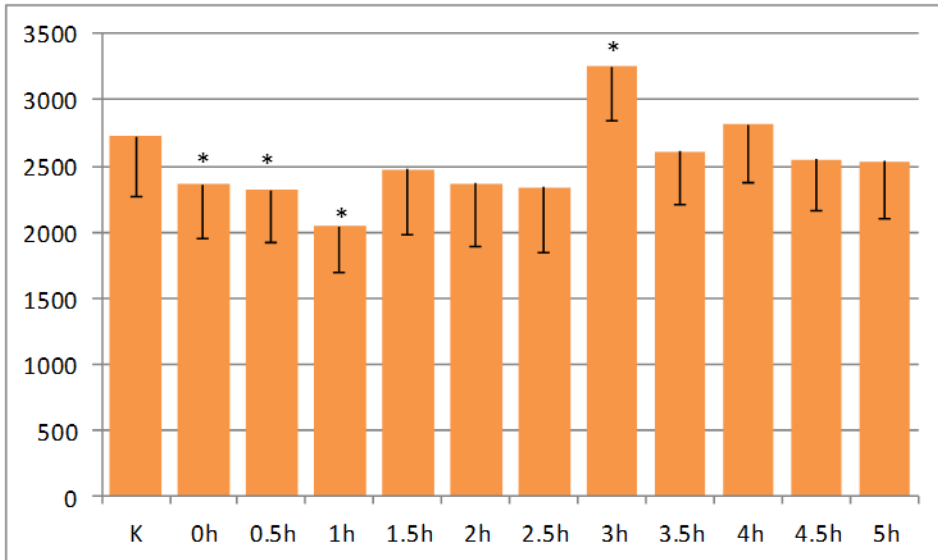
Slika 32. Inverzni momenat razlike jedra u različitim vremenskim tačkama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



Slika 33. Entropija jedra u različitim vremenskim tačkama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



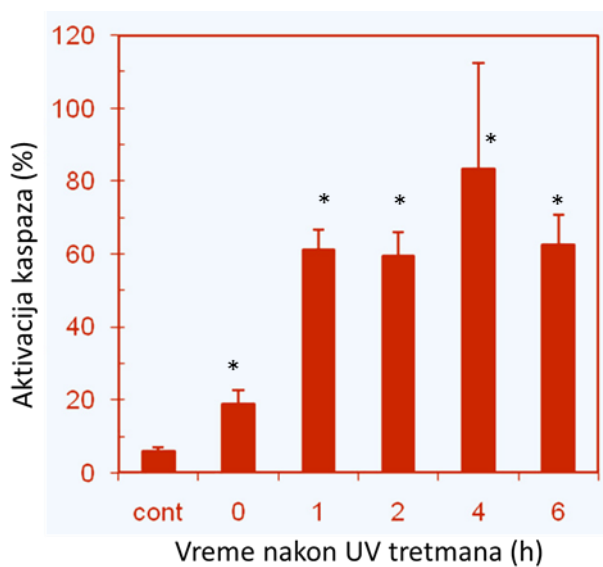
Slika 34. Teksturalna varijansa jedra u različitim vremenskim tačkama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom

Teksturalna varijansa jedra u kontrolnoj vremenskoj tački iznosila je  $2723 \pm 460$ . Neposredno nakon tretmana zabeležen je statistički visoko značajan pad varijanse ( $2361 \pm 418$ ,  $p < 0.01$ ), a niske vrednosti su zabeležene i 30 minuta ( $2314 \pm 388$ ,  $p < 0.01$ ), i 1h ( $2047 \pm 361$ ,  $p < 0.01$ ) nakon tretmana. Nakon toga, vrednosti varijanse su počele da rastu da bi dostigle svoj maksimum 3h nakon tretmana ( $3250 \pm 410$ ,  $p < 0.01$ ). Kao što se vidi sa slike 34, vrednosti varijanse su se nakon pada u prvom delu eksperimenta vratile na nivo sličan kontrolnoj vremenskoj tački.

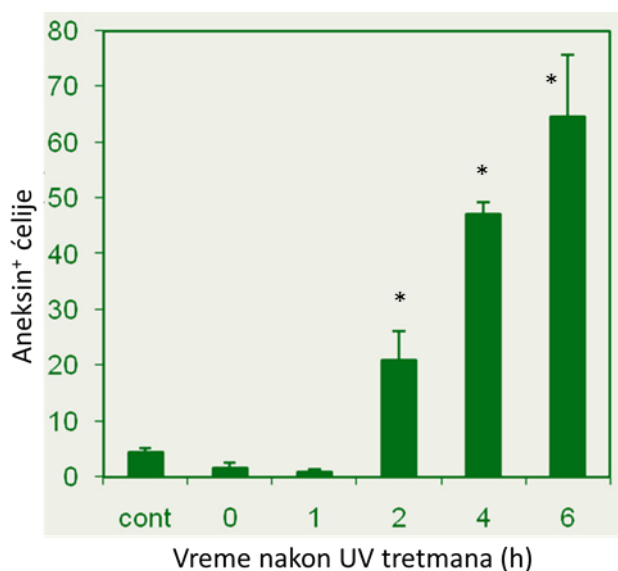
#### *3.1.4. Citofluorometrijski parametri apoptoze*

Na slici 35, 36, i 37 prikazani su aktivnost kaspaza, procenat aneksin<sup>+</sup> ćelija, odnosno fragmentacija DNK u ćelijskoj kulturi pre tretmana UV zracima, neposredno nakon tretmana, kao i 1h, 2h, 4h i 6h nakon tretmana. Aktivnost kaspaza se značajno povećala neposredno nakon zračenja, i ostala je visoka u svim narednim vremenskim tačkama. Sa druge strane, procenat aneksin<sup>+</sup> ćelija i fragmentacija DNK kao parametri apoptoze u ćelijskoj kulturi su se značajno povećali tek 2 časa nakon tretmana. Drugim rečima, nakon indukcije DNK oštećenja *in vitro*, u ćelijskoj kulturi, promene u pojedinim fraktalnim i teksturalnim parametrima, nastupile su znatno pre povećanja procenta aneksin<sup>+</sup> ćelija i fragmentacije DNK. Ovaj rezultat ukazuje na potencijalno veliku senzitivnost fraktalne i teksturalne analize u detekciji ranog stadijuma apoptoze u ćelijskoj kulturi.



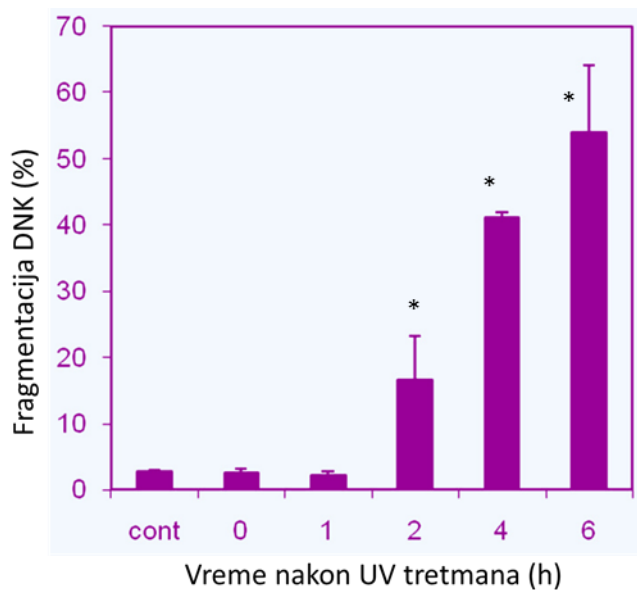
Slika 35. Aktivnost kaspaza u kulturi ćelija pre UV tretmana (cont) i u pojedinim vremenskim tačkama nakon tretmana

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



Slika 36. Aneksin+ ćelije u kulturi pre UV tretmana (cont) i u pojedinim vremenskim tačkama nakon tretmana

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom



Slika 37. Fragmentacija DNK u kulturi pre UV tretmana (cont) i u pojedinim vremenskim tačkama nakon tretmana.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolom

### 3.2. Rezultati preliminarnog eksperimenta na oglednim životinjama

Kao što je ranije navedeno, pilot eksperiment je urađen na grupi od 16 životinja of kojih je prva bila novorođena (0 dana starosti), a svaka sledeća je bila 30 dana starija od prethodne (najstariji miš u eksperimentu je bio star 390 dana).

Rezultati ukazuju na generalizovano smanjenje tkivne fraktalne dimenzije u većini ispitivanih mikrografa, kao i smanjenje hromatinske fraktalne dimenzije na ćelijskim populacijama kortikalnih limfocita u timusu, epitelnih ćelija proksimalnih tubula u bubregu, i hepatocita u jetri.



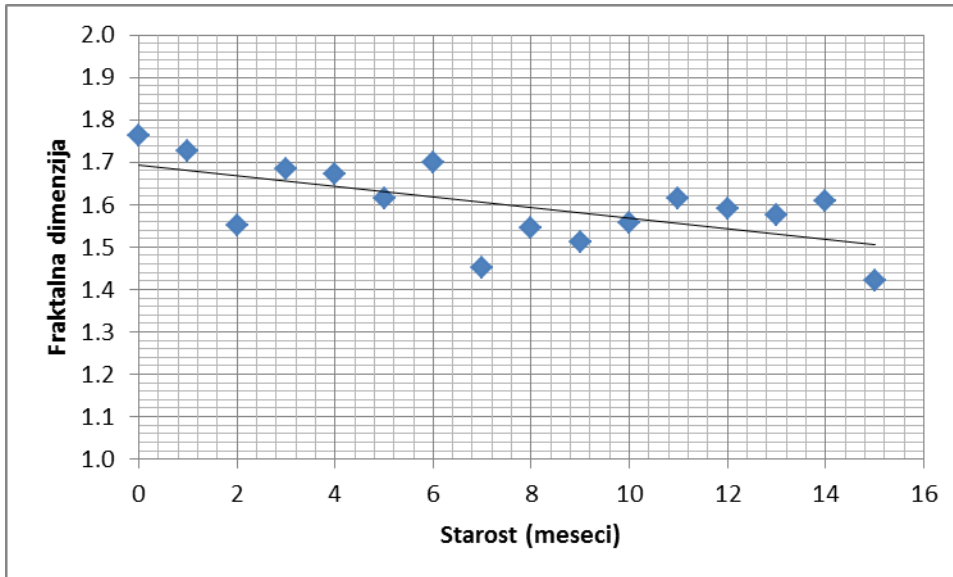
U timusu je detektovana negativna korelacija između fraktalne dimenzije tkiva korteksa i starosti životinje na bojenju hematoksilin-eozin, Gimza i toluidin plavo ( $p < 0.01$ ). Na slici 38 je prikazan primer plotovanih vrednosti starosti životinje (x osa) i fraktalne dimenzije tkiva korteksa. Slična, negativna korelacija između tkivne kompleksnosti i životne dobi nađena je i u tkivu timusne medule ( $p < 0.01$ , slika 39). U hromatinskoj strukturi i kortikalnih i medularnih limfocita, fraktalna dimenzija je takođe bila u negativnoj korelaciji sa starošću životinje ( $p < 0.01$ ).

Analizom mikrografa korteksa bubrega, utvrđena je statistički signifikantna negativna korelacija ( $p < 0.01$ ) između tkivne fraktalne dimenzije i starosti životinje nakon bojenja hematoksilin-eozin i toluidin plavo tehnikama (slika 40 i 41), a slične korelacije postojale su i u bubrežnoj meduli. Na mikrografima korteksa i medule obojenih AZAN tehnikom, nije detektovana statistički značajna povezanost ( $p > 0.05$ ). Kad je u pitanju analiza hromatinske kompleksnosti, postojala je značajna negativna korelacija između fraktalne dimenzije hromatina ćelija proksimalnih tubula i starosti životinje ( $p < 0.01$ , slika 42).

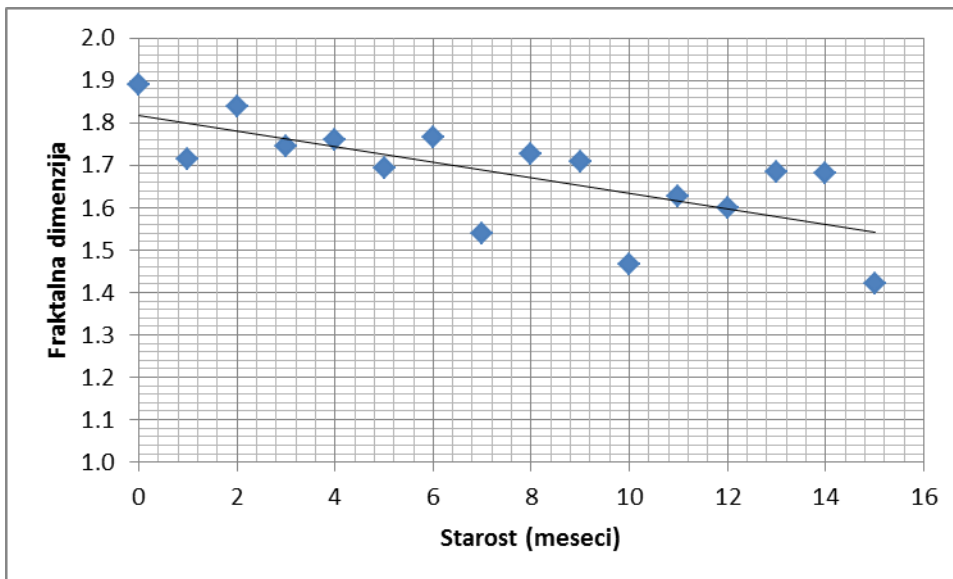
Detektovana je statistički značajna negativna korelacija između fraktalne dimenzije tkiva jetre bojenog hematoksilin-eozin i toluidin plavo tehnikama sa jedne strane i starosti životinje sa druge ( $p < 0.01$ , slike 43 i 44). Slična korelacija je utvrđena i između hromatinske fraktalne dimenzije hepatocita i starosti ( $p < 0.01$ , slika 45).

U hematopoeznom tkivu slezine obojenom tehnikama hematoksilin eozin i toluidin plavo, takođe je detektovana negativna korelacija između tkivne fraktalne dimenzije i starenja ( $p < 0.01$ , slika 46). U hromatinskoj strukturi eritroidnih prekurzorskih ćelija nije bilo

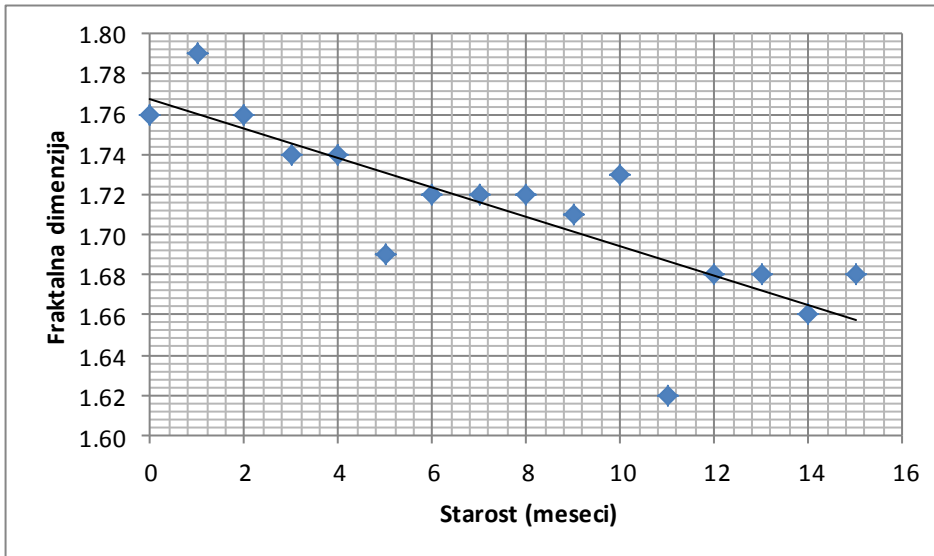
značajne promene fraktalne dimenzije, međutim detektovano je statistički značajno povećanje teksturalne entropije ( $p < 0.01$ , slika 47).



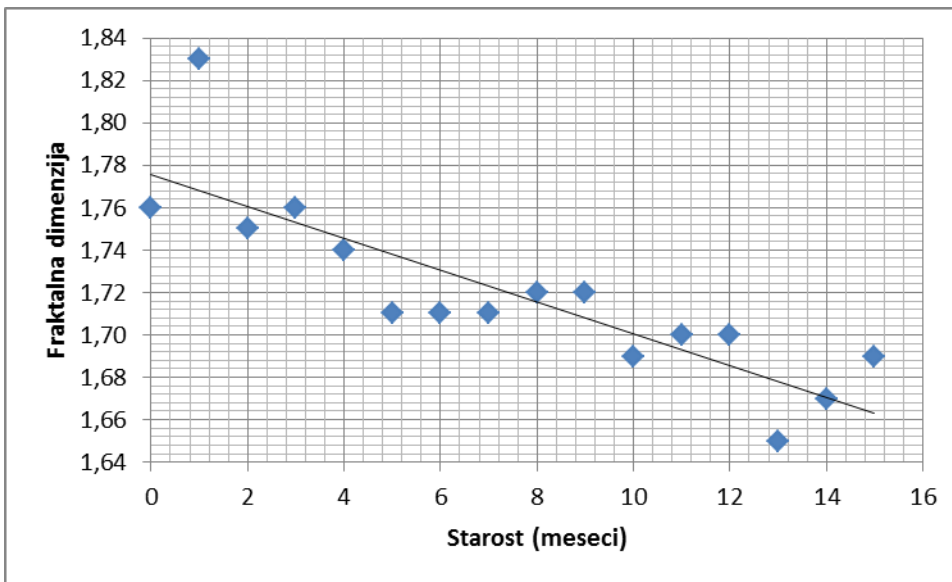
Slika 38. Fraktalna dimenzija korteksa timusa (pilot eksperiment, hematoksilin/eozin bojenje).



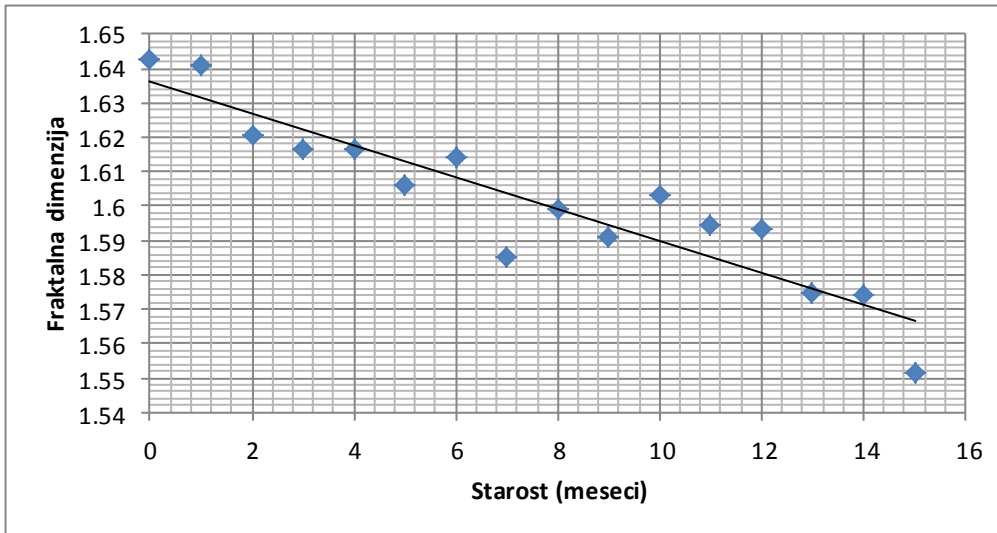
Slika 39. Fraktalna dimenzija medule timusa (pilot eksperiment, hematoksilin/eozin bojenje).



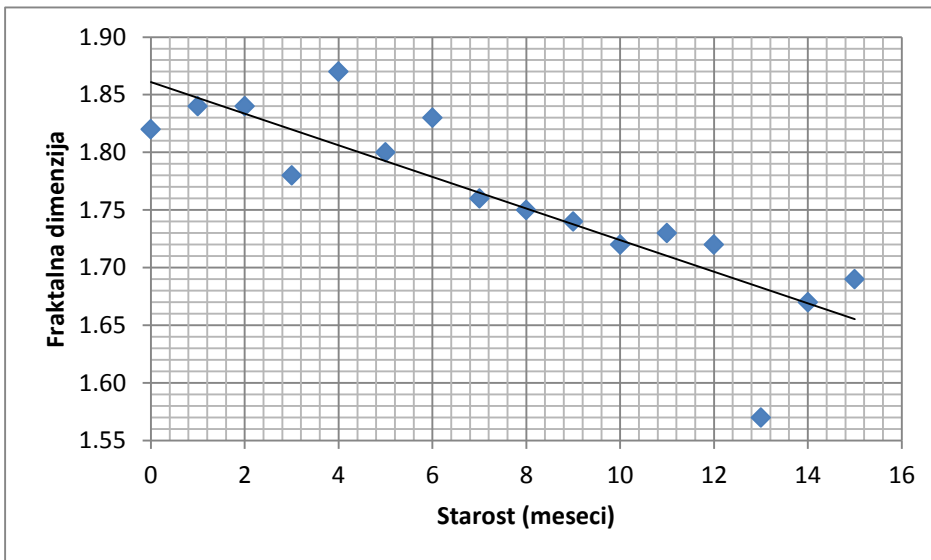
Slika 40. Fraktalna dimenzija korteksa bubrega u životinja različite starosti (pilot eksperiment, hematoksilin /eozin bojenje).



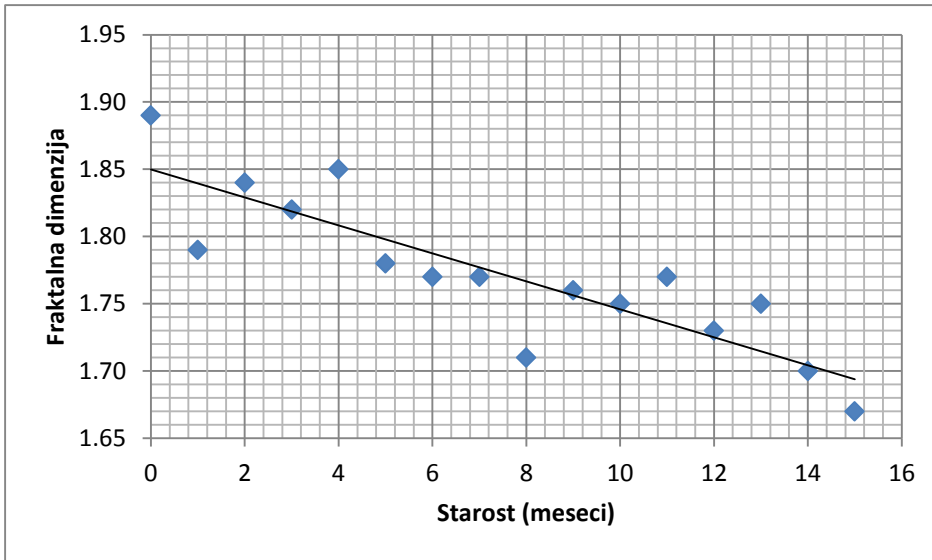
Slika 41. Fraktalna dimenzija korteksa bubrega u životinja različite starosti (pilot eksperiment, toluidin plavo bojenje).



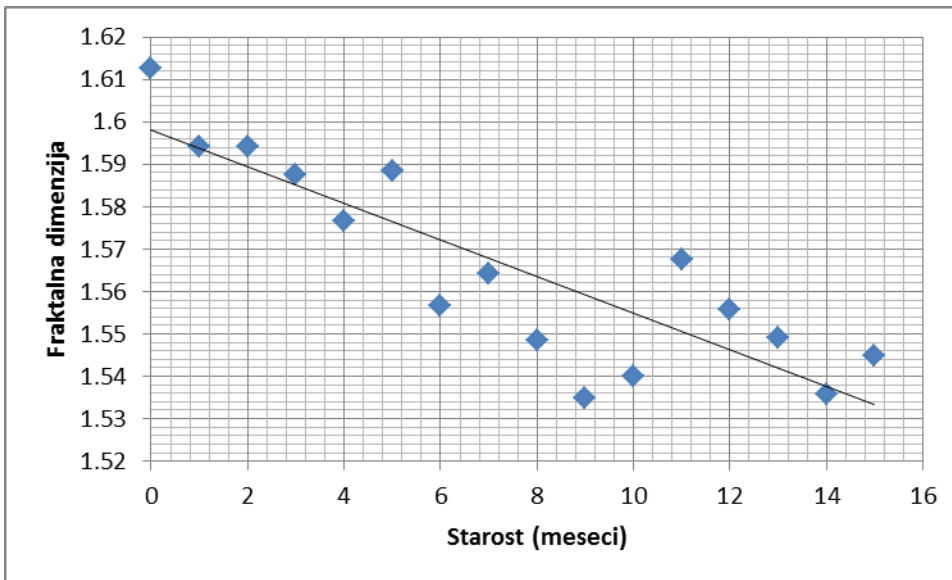
Slika 42. Fraktalna dimenzija hromatina ćelija proksimalnih tubula u životinja različite starosti (pilot eksperiment).



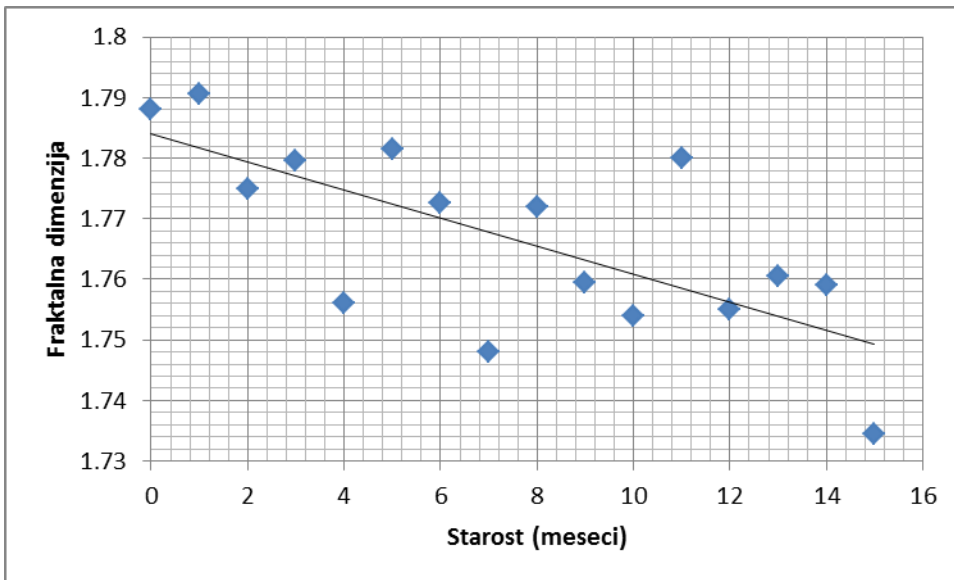
Slika 43. Fraktalna dimenzija tkiva jetre u životinja različite starosti (pilot eksperiment, hematoksilin/eozin bojenje).



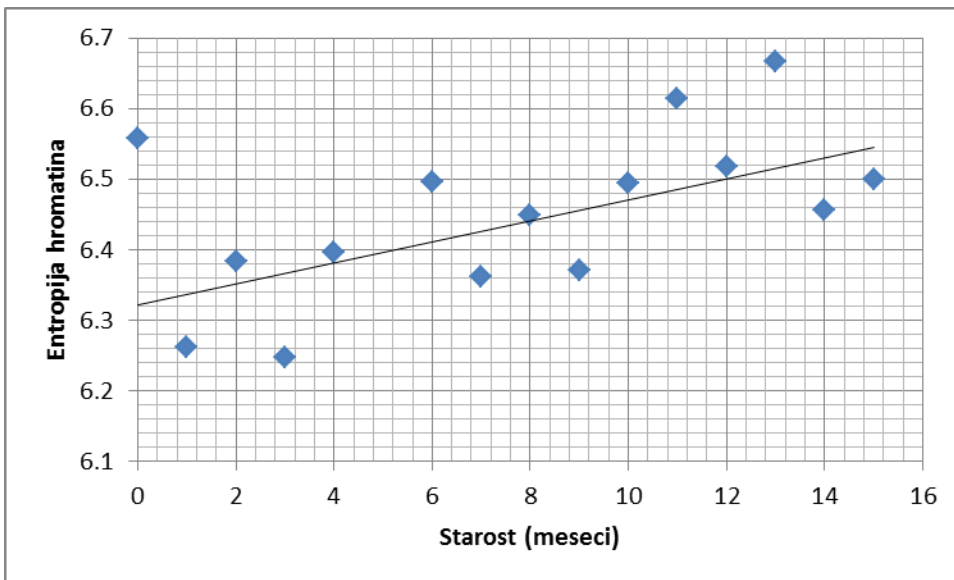
Slika 44. Fraktalna dimenzija tkiva jetre u životinja različite starosti (pilot eksperiment, toluidin plavo bojenje).



Slika 45. Fraktalna dimenzija hromatina hepatocita u životinja različite starosti (pilot eksperiment).



Slika 46. Fraktalna dimenzija hematopoeznog tkiva slezine (pilot eksperiment, hematoksilin/eozin bojenje).



Slika 47. Odnos entropije hromatina eritroidnih prekuzora i starosti životinje (pilot eksperiment).

U folikulima bele pulpe slezine, kao i u hromatinu folikularnih ćelija nije bilo statistički značajnih promena ni u fraktalnim ni u teksturalnim parametrima.

### **3.3. Rezultati glavnog eksperimenta na oglednim životinjama**

#### *3.3.1. Promene u tkivnoj kompleksnosti*

U skladu sa rezultatima pilot eksperimenta, detektovano je statistički značajno smanjenje fraktalne dimenzije tkiva korteksa i medule timusa, korteksa i medule bubrega, hematopoeznog tkiva slezine i lobulusa jetre.

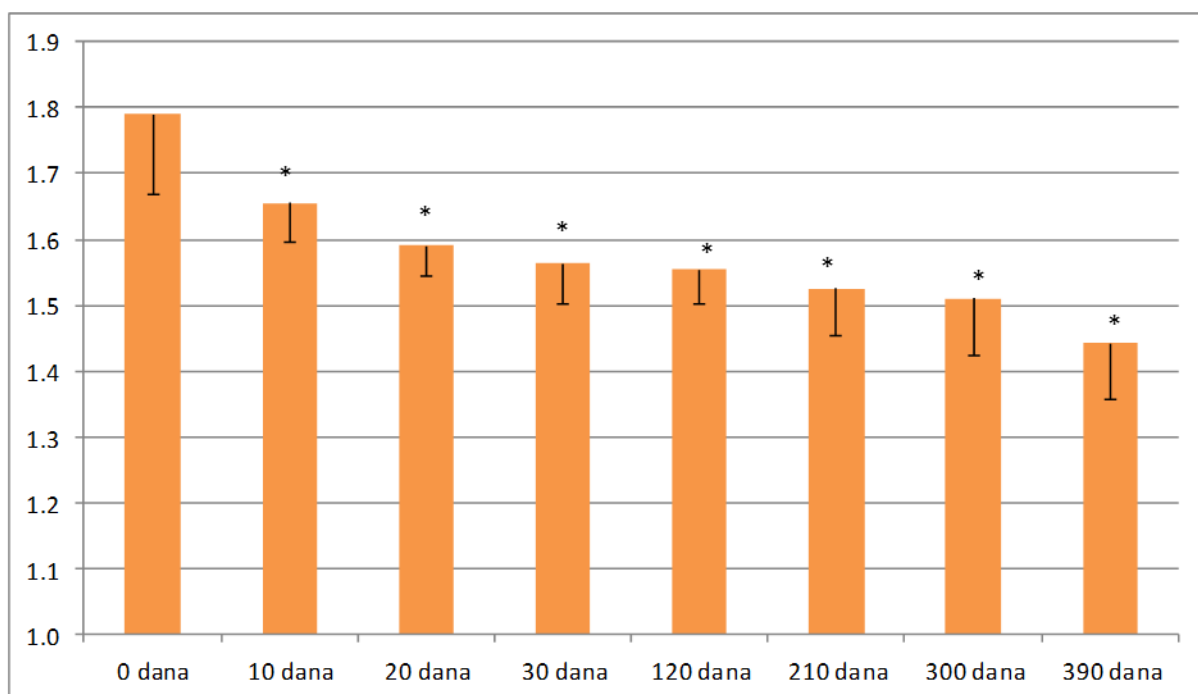
U korteksu i meduli timusa je smanjenje kompleksnosti registrovano na preparatima obojenim tehnikama hematoksilin/eozin (slika 48 i 49), toluidin plavo i Gimza. U tkivu korteksa i medule bubrega, fraktalna dimenzija se sa starošću smanjila na preparatima obojenim tehnikama hematoksilin/eozin (slika 50 i 51) i toluidin plavo (slika 52 i slika 53), a slični rezultati su dobijeni fraktalnom analizom lobulusa jetre (slika 54 i 55). Na mikrografima subkapsularnog hematopoeznog tkiva slezine obojenog tehnikama hematoksilin / eozin, i toluidin plavo takođe je detektovano starosno-zavisno smanjenje fraktalne dimenzije.

U folikulima bele pulpe slezine nie bilo razlike u fraktalnoj dimenziji između ispitivanih grupa. Teksturalni GLCM parametri se nisu značajno menjali ni u jednom ispitivanom tkivu.

### 3.3.2. Stromalne ćelije timusa

Fraktalna dimenzija hromatina timusnih stromalnih ćelija u novorođenih miševa iznosila je  $1.437 \pm 0.038$ . Maksimalna vrednost zabeležena je kod životinja starih 30 dana ( $1.441 \pm 0.031$ ), a minimalna vrednost u starosnoj grupi od 300 dana ( $1.419 \pm 0.039$ ). Nije postojala statistički značajna razlika između starosnih grupa ( $F=0.27$ ,  $p>0.05$ , slika 56).

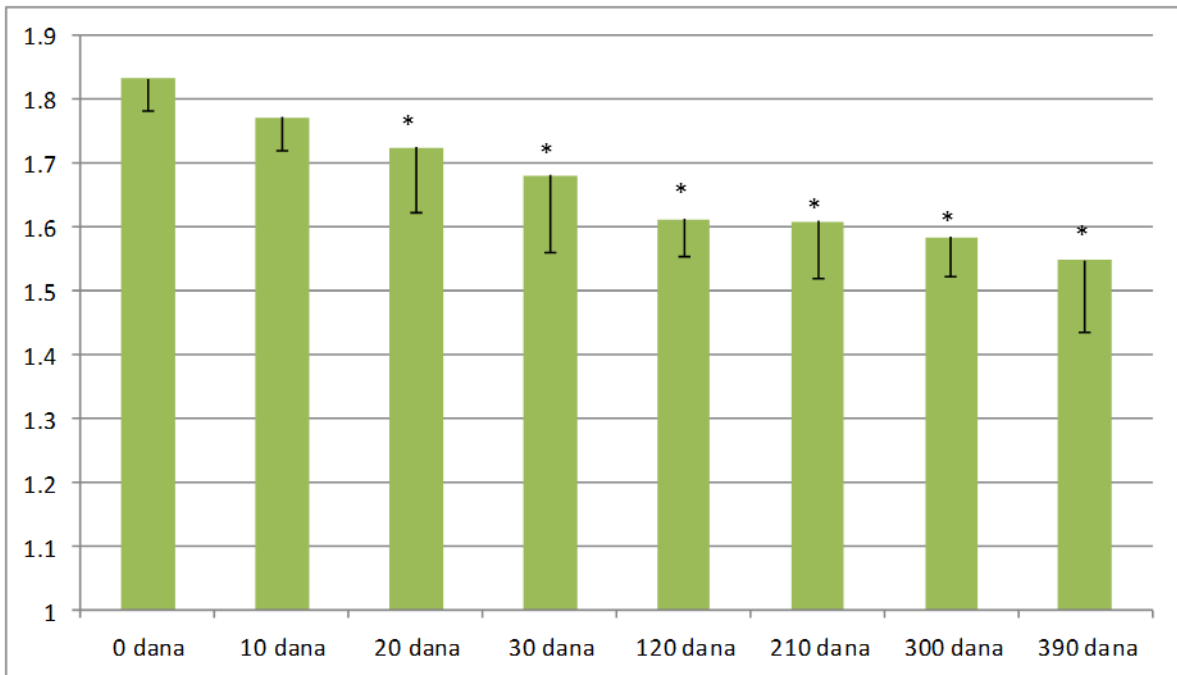
Slično vrednostima fraktalne dimenzije, lakunarnost hromatina stromalnih ćelija nije se značajno razlikovala između starosnih grupa ( $F=0.426$ ,  $p>0.05$ , slika 57). U novorođenih miševa iznosila je  $1.439 \pm 0.055$ , u starosnoj grupi 30 dana  $1.468 \pm 0.027$ , a u najstarijih miševa (390 dana) srednja lakunarnost je bila  $1.454 \pm 0.037$ .



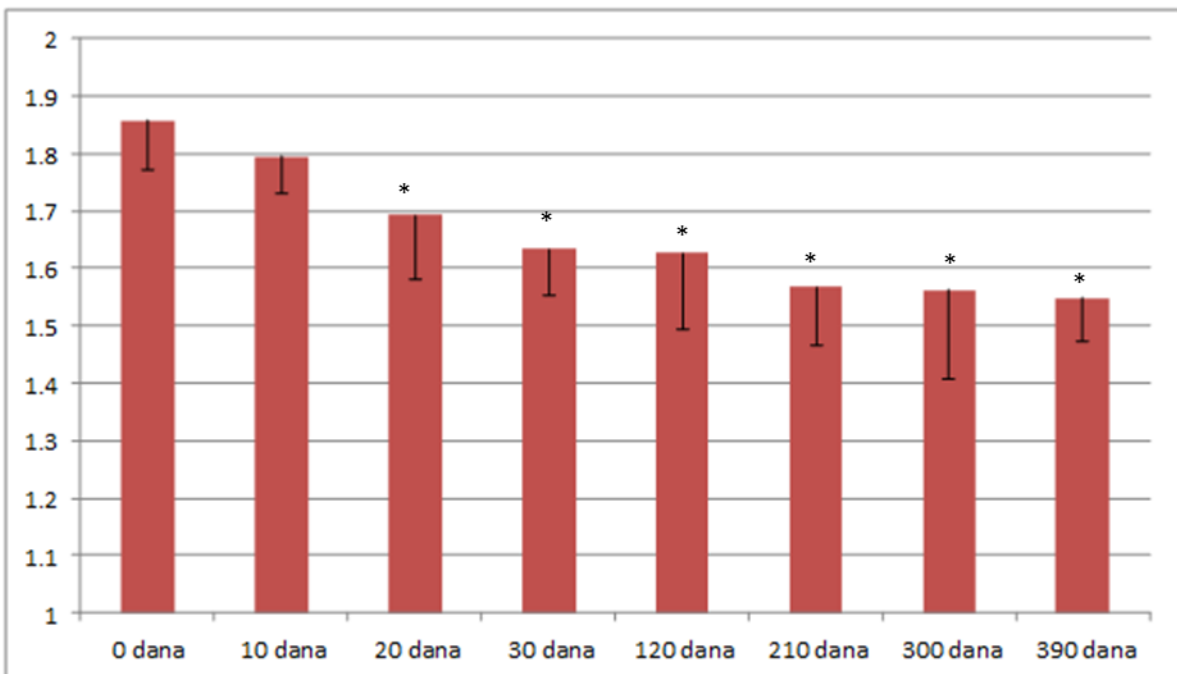
Slika 48. Fraktalna dimenzija tkiva korteksa timusa (hematoksilin/eozin).

\* $p<0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



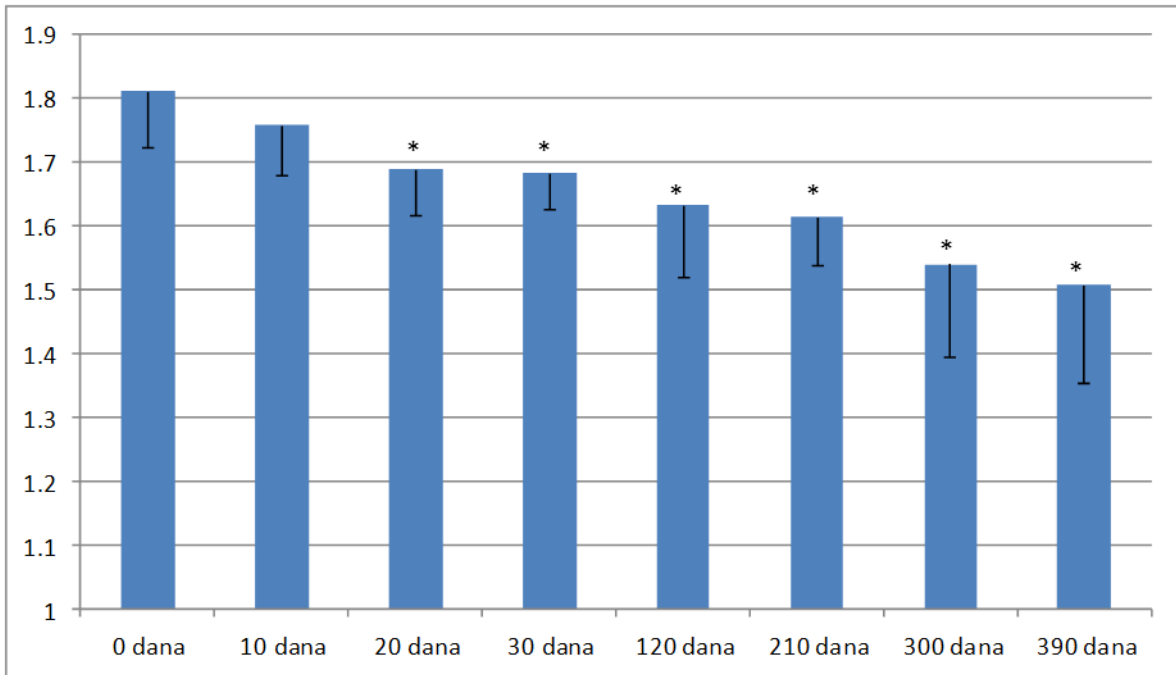


Slika 49. Fraktalna dimenzija tkiva medule timusa (hematoksilin/eozin).



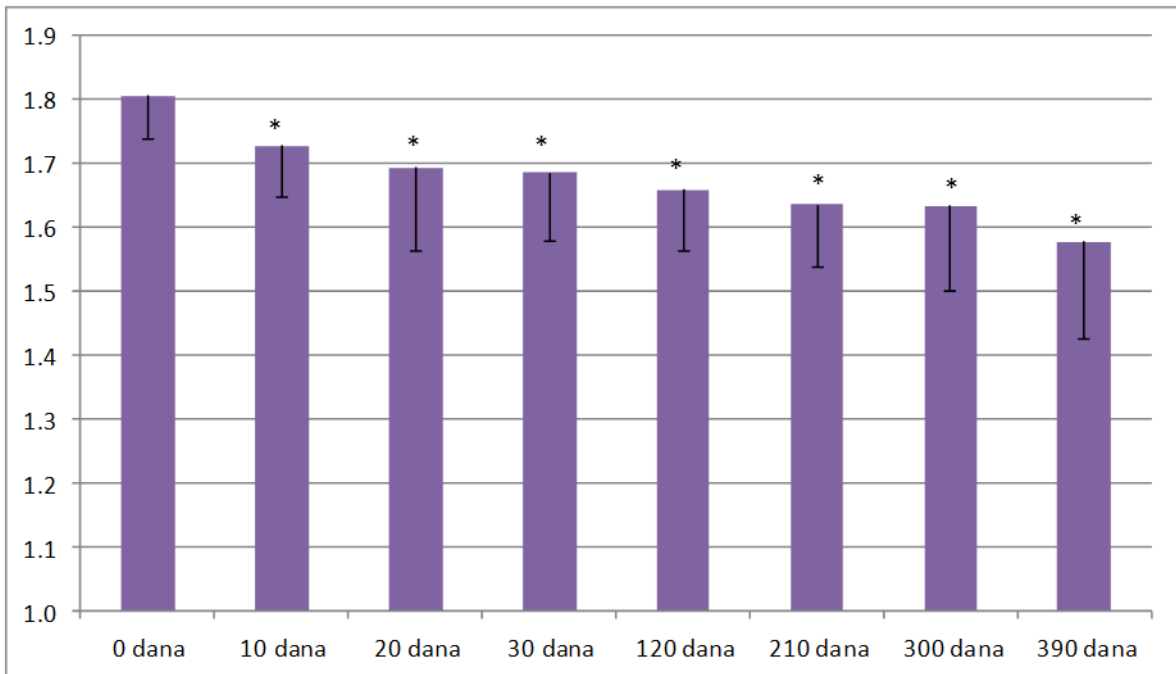
Slika 50. Fraktalna dimenzija tkiva korteksa bubrega (hematoksilin/eozin).

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



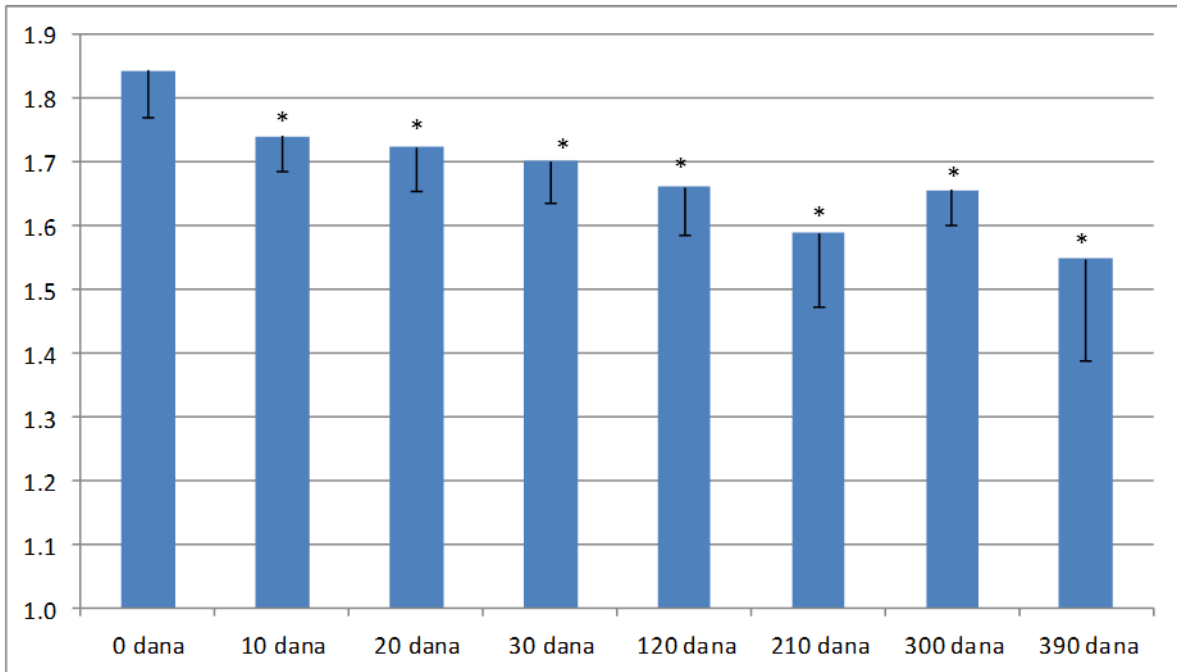
Slika 51. Fraktalna dimenzija tkiva kortiksa bubrega (Toluidun plavo).

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



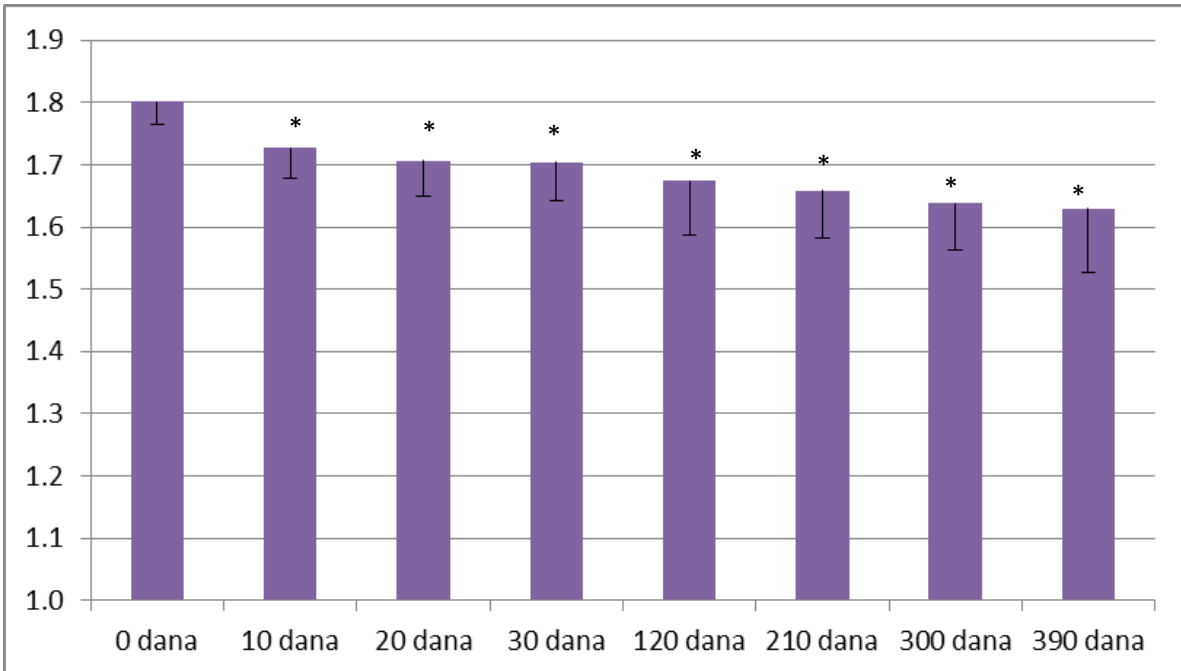
Slika 52. Fraktalna dimenzija tkiva medule bubrega (hematoksilin/eozin).

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



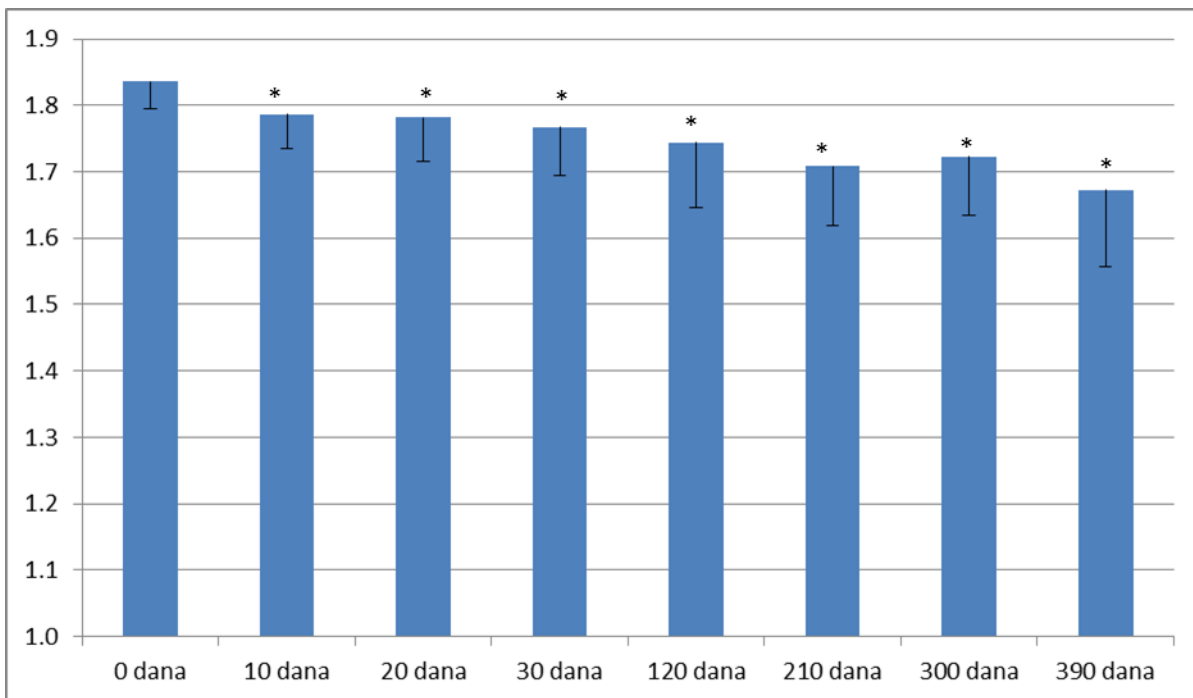
Slika 53. Fraktalna dimenzija tkiva medule bubrega (Toluidun plavo).

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



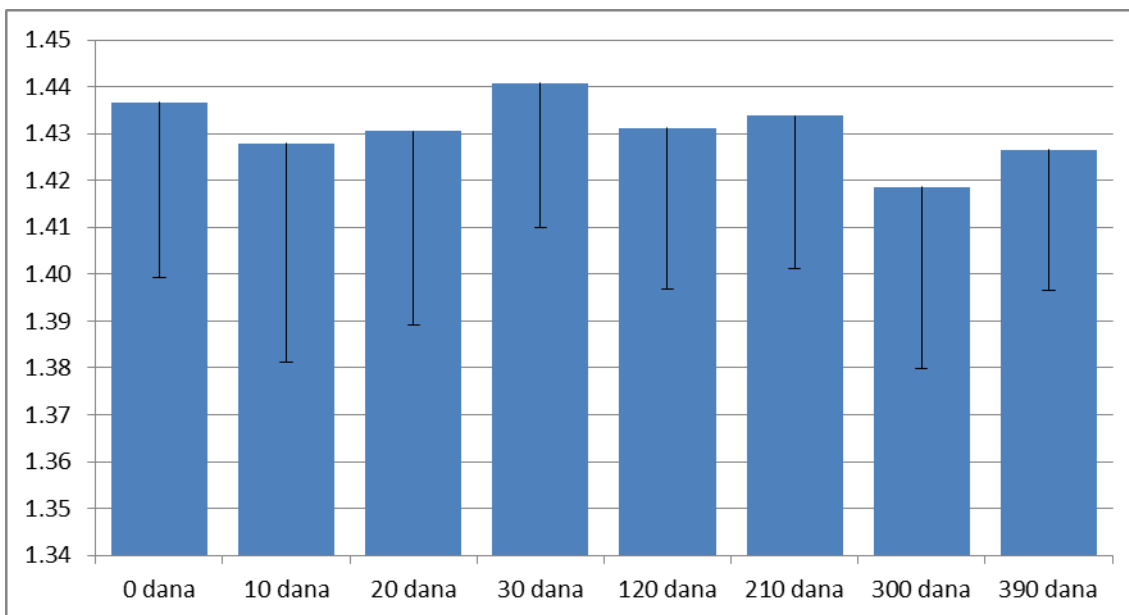
Slika 54. Fraktalna dimenzija tkiva jetre (hematoksilin/eozin).

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja

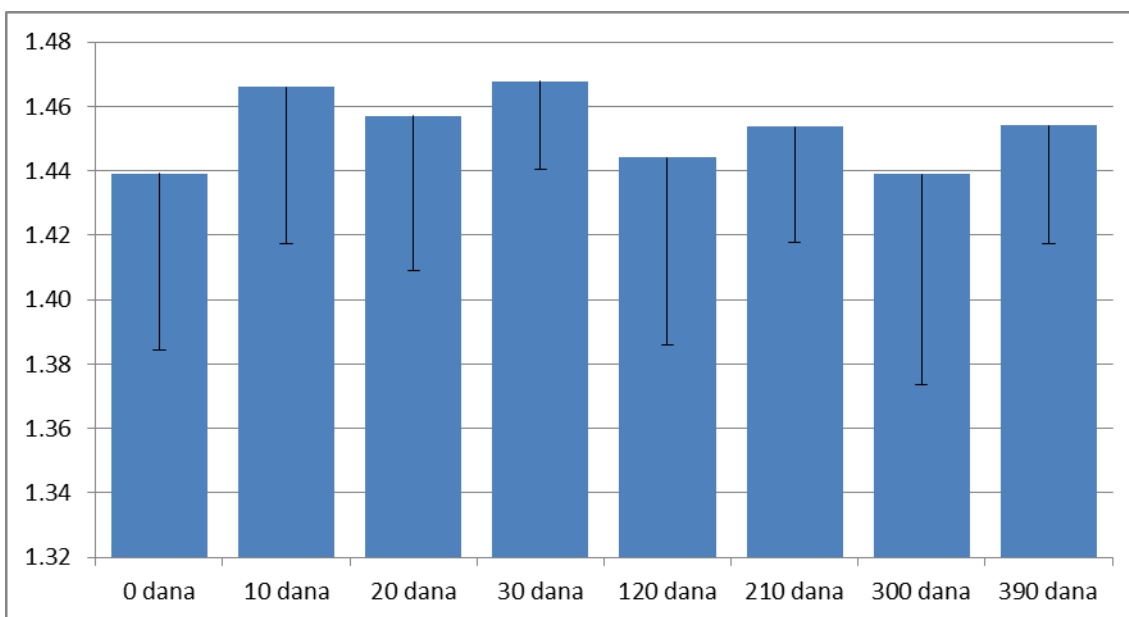


Slika 55. Fraktalna dimenzija tkiva jetre (Toluidun plavo).

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



Slika 56. Fraktalna dimenzija hromatina stromalnih ćelija.



Slika 57. Lakunarnost hromatina stromalnih ćelija.

Tabela 3. Srednje vrednosti i standardne devijacije GLCM parametara hromatina stromalnih ćelija.

Starost	ASM		KONTRAST		KORELACIJA		IDM		ENTROPIJA		VARIJANSA	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0 dana	0.036	0.005	533.8	63.5	0.00030	0.00004	0.43	0.03	5.60	0.10	3413	349
10 dana	0.035	0.005	554.4	57.9	0.00029	0.00003	0.41	0.02	5.70	0.10	3663	339
20 dana	0.033	0.008	508.2	73.3	0.00032	0.00005	0.40	0.02	5.75	0.13	3313	378
30 dana	0.037	0.005	519.7	54.1	0.00029	0.00004	0.40	0.02	5.70	0.09	3468	323
120 dana	0.035	0.007	580.6	25.3	0.00028	0.00002	0.41	0.03	5.70	0.10	3713	266
210 dana	0.035	0.004	505.8	74.4	0.00030	0.00003	0.41	0.03	5.71	0.10	3500	343
300 dana	0.035	0.008	542.0	107.5	0.00032	0.00006	0.41	0.03	5.69	0.19	3374	430
390 dana	0.034	0.006	542.3	77.1	0.00032	0.00006	0.42	0.03	5.68	0.15	3396	405

Vrednosti GLCM teksturalnih parametara hromatina stromalnih ćelija se takođe nisu značajno menjali u starosnim grupama. Srednje vrednosti i standardne devijacije GLCM parametara hromatina prikazane su u tabeli 3.

Nije postojala statistički značajna korelacija između fraktalnih i GLCM parametara hromatina stromalnih ćelija sa jedne strane i odgovarajućih tkivnih fraktalnih odnosno teksturalnih parametara korteksa odnosno medule sa druge strane ( $p>0.05$ ). Ovo ukazuje da strukturalne karakteristike hromatina stromalnih ćelija ne utiču značajno na sveukupnu kompleksnost tkiva timusa.

### *3.3.3. Kortikalni limfociti timusa*

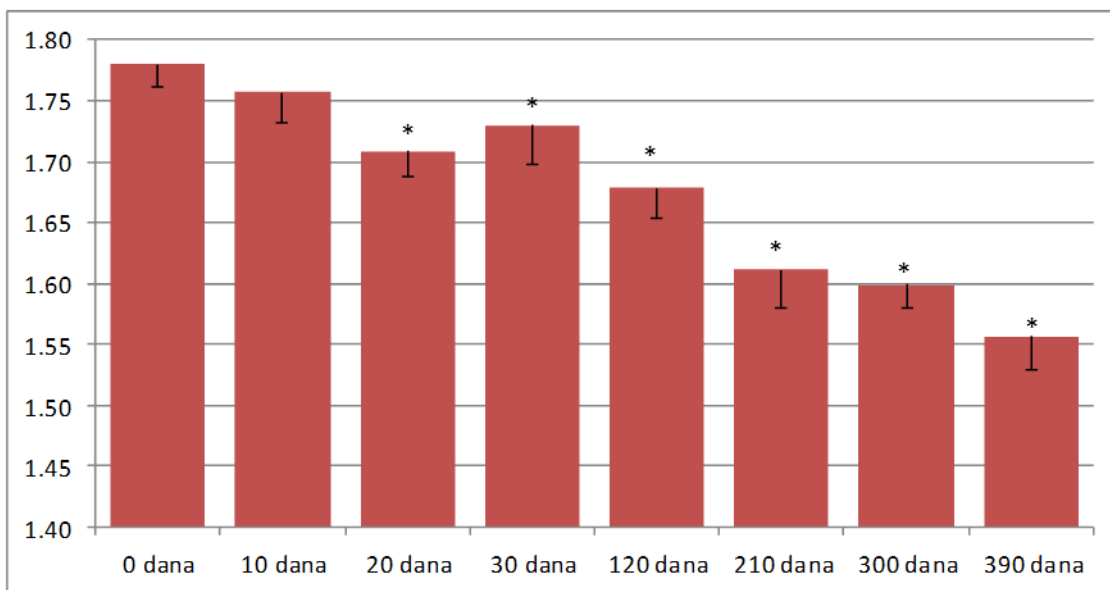
U populaciji kortikalnih limfocita detektovano je statistički značajno smanjenje kompleksnosti merene fraktalnom dimenzijom. U novorođenih životinja, srednja vrednost fraktalne dimenzije iznosilo je  $1.779\pm 0.018$ , a u životinja starih 10 dana  $1.756\pm 0.025$  ( $p>0.05$ ). U grupi miševa starosti 20 dana detektovano je statistički značajno smanjenje ( $1.708\pm 0.020$ ,  $p<0.01$ , slika 58) Fraktalna dimenzija hromatina je dostigla minimum u grupi najstarijih životinja (390 dana,  $1.556\pm 0.027$ ,  $p<0.001$ ). Uočena je statistički visoko značajna pozitivna korelacija između fraktalne dimenzije tkiva korteksa timusa i fraktalne dimenzije hromatina kortikalnih limfocita ( $p<0.01$ , slika 59).

Lakunarnost hromatina kortikalnih limfocita timusa se nije značajno menjala sa starenjem (slika 60). Takođe, nije bilo statistički

značajne razlike u GLCM parametrima teksture hromatina između starosnih grupa (tabela 4).

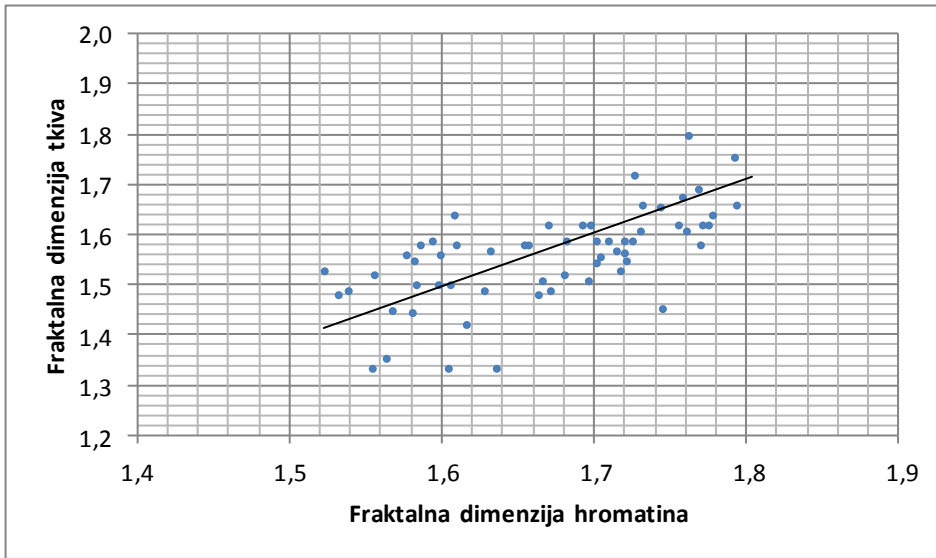
Tabela 4. Vrednosti GLCM parametara hromatina kortikalnih limfocita timusa u različitim starosnim grupama

Starost	ASM		KONTRAST		KORELACIJA		IDM		ENTROPIJA		VARIJANSA	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0 dana	0.0020	0.0001	47.2	6.1	0.006	0.001	0.19	0.01	6.45	0.07	167	27
10 dana	0.0020	0.0001	44.5	5.6	0.006	0.001	0.20	0.01	6.43	0.05	157	23
20 dana	0.0019	0.0001	41.1	3.8	0.006	0.001	0.19	0.01	6.47	0.05	165	19
30 dana	0.0020	0.0001	43.9	7.3	0.007	0.001	0.19	0.01	6.43	0.05	148	13
120 dana	0.0020	0.0001	43.3	4.0	0.006	0.001	0.19	0.01	6.44	0.05	163	17
210 dana	0.0020	0.0001	45.2	10.5	0.007	0.001	0.19	0.01	6.44	0.06	158	18
300 dana	0.0020	0.0002	48.0	8.4	0.006	0.001	0.19	0.01	6.47	0.08	179	22
390 dana	0.0020	0.0001	42.9	7.3	0.006	0.001	0.20	0.01	6.44	0.07	170	19

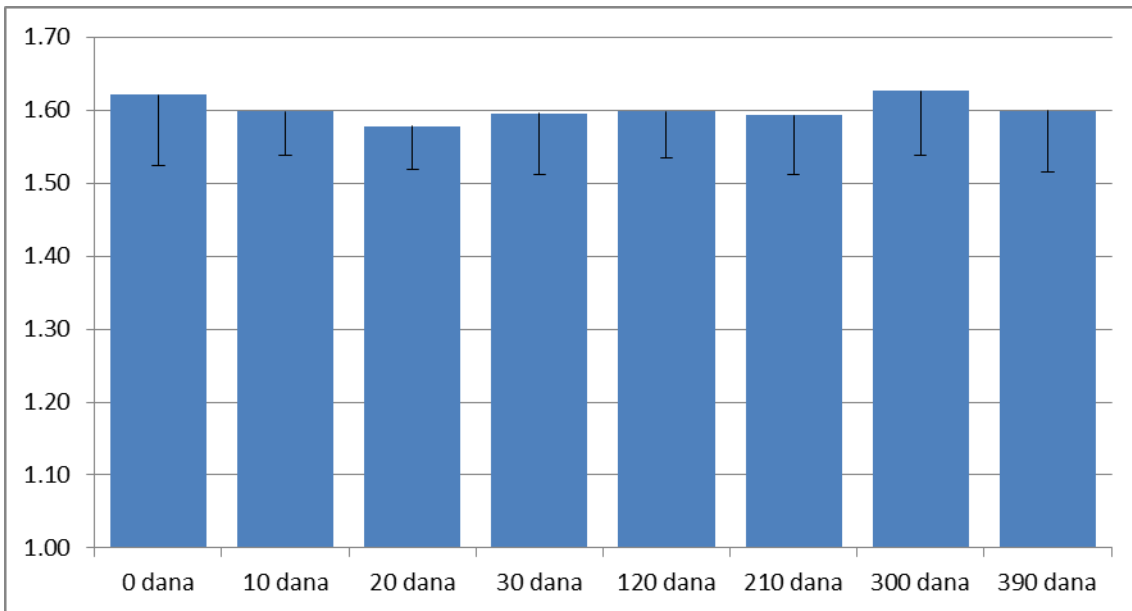


Slika 58. Vrednosti fraktalne dimenzije hromatina kortikalnih limfocita timusa u različitim starosnim grupama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



Sika 59. Odnos fraktalne dimenzije tkiva korteksa timusa i fraktalne dimenzije hromatina kortikalnih limfocita



Slika 60. Lakunarnost hromatina kortikalnih limfocita timusa u različitim starosnim grupama.

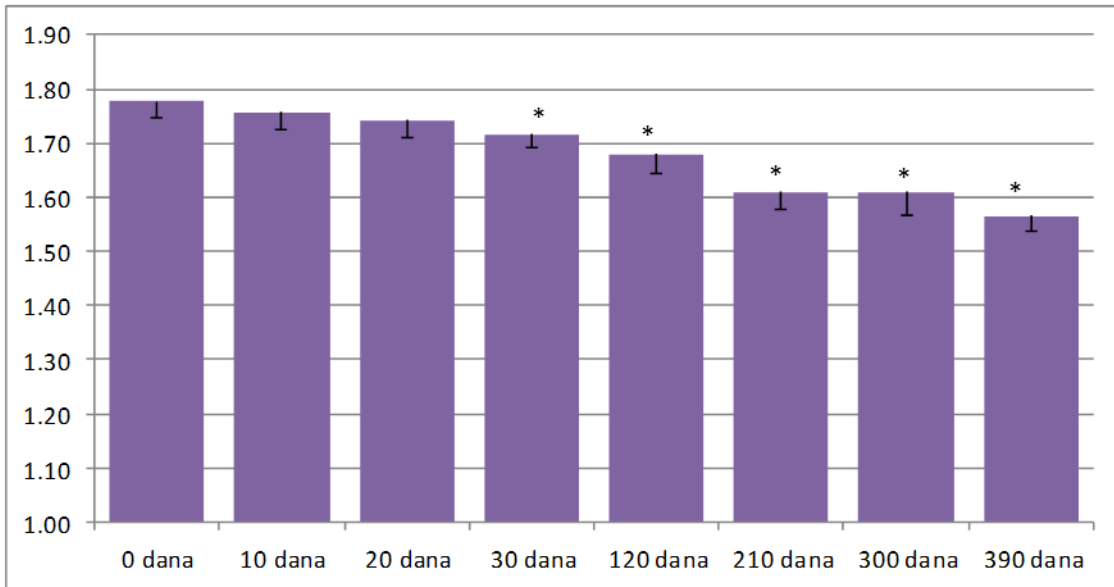


#### 3.3.4. Medularni limfociti timusa

Slično kao kod kortikalnih limfocita timusa, i u medularnim limfocitima je uočeno značajno smanjenje hromatinske fraktalne dimenzije sa starenjem. Maksimalna vrednost zabeležena je u novorođenih životinja ( $1.777 \pm 0.029$ ), a minimalna u najstarijih životinja ( $1.566 \pm 0.031$ , slika 61). Smanjenje fraktalne dimenzije je postalo statistički značajno u grupi životinja starih 30 dana ( $1.717 \pm 0.025$ ,  $p < 0.01$ ). Uočena je statistički visoko značajna pozitivna korelacija između fraktalne dimenzije tkiva medule timusa i fraktalne dimenzije hromatina medularnih limfocita ( $p < 0.01$ , slika 62).

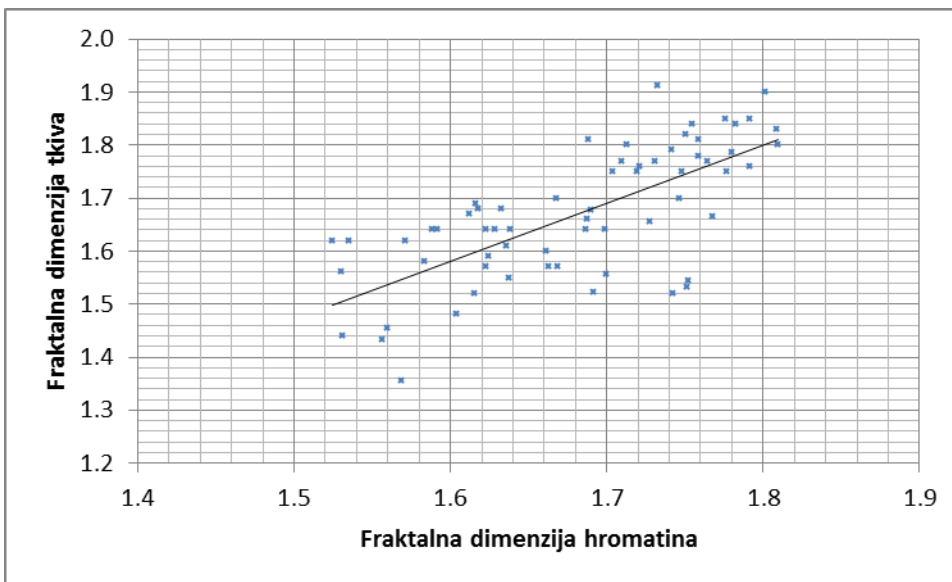
Lakunarnost hromatina medularnih limfocita (slika 63), kao ni GLCM parametri (tabela 5) se nisu značajno promenili sa starenjem.

Između kortikalnih i medularnih limfocita detektovana je statistički značajna razlika u pojedinim GLCM parametrima teksture hromatina. Medularni limfociti su imali značajno veću vrednost entropije (slika 64,  $p < 0.001$ ) i varijanse (slika 65,  $p < 0.001$ ), i manju vrednost angularnog drugog momenta ( $p < 0.001$ ), nego kortikalni limfociti. Ovi rezultati ukazuju da je GLCM analiza potencijalno osetljiv metod u razlikovanju ove dve ćelijske populacije.

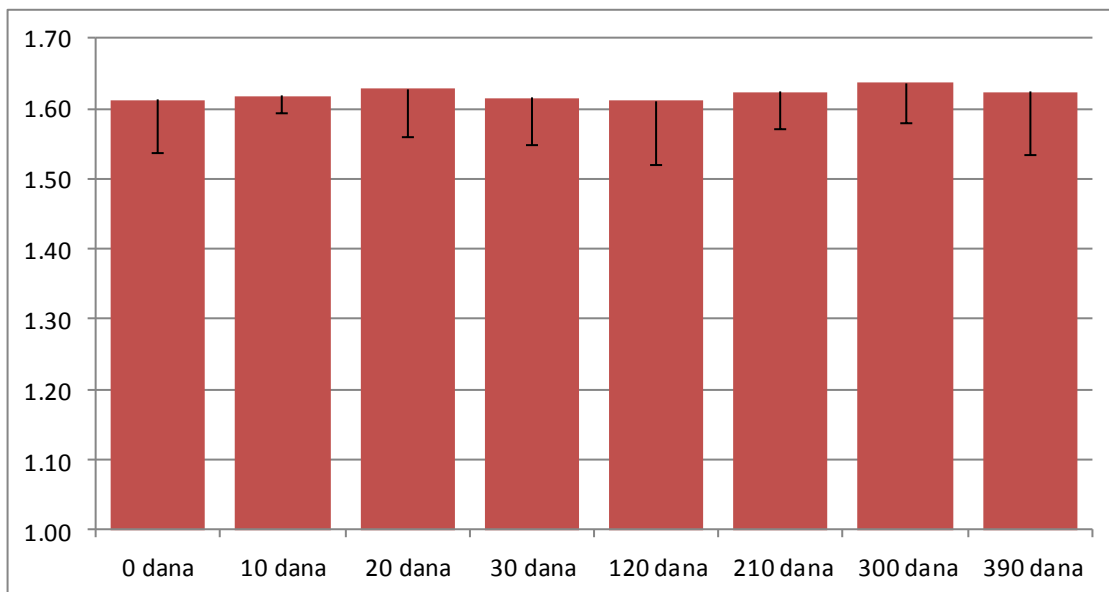


Slika 61. Vrednosti fraktalne dimenzije hromatina medularnih limfocita timusa u različitim starosnim grupama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



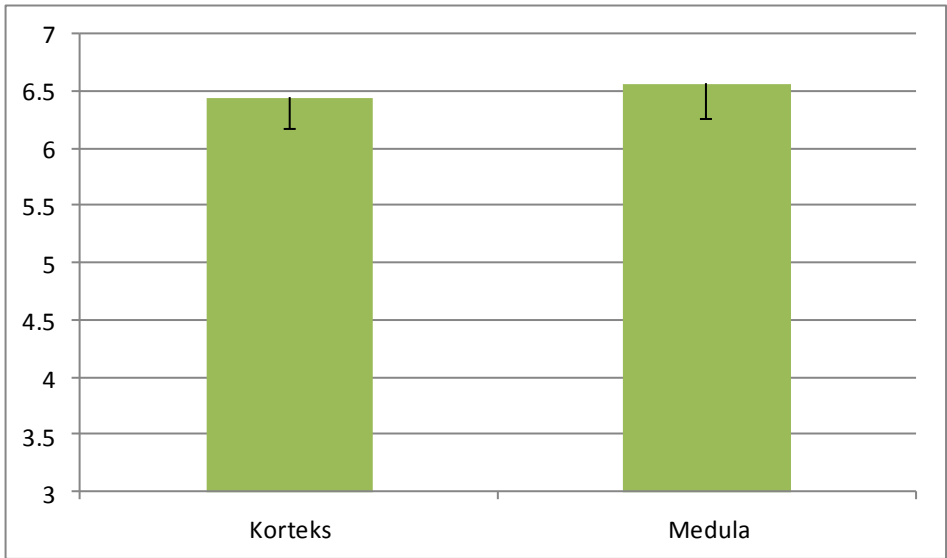
Slika 62. Odnos fraktalne dimenzije tkiva medule timusa i fraktalne dimenzije hromatina medularnih limfocita



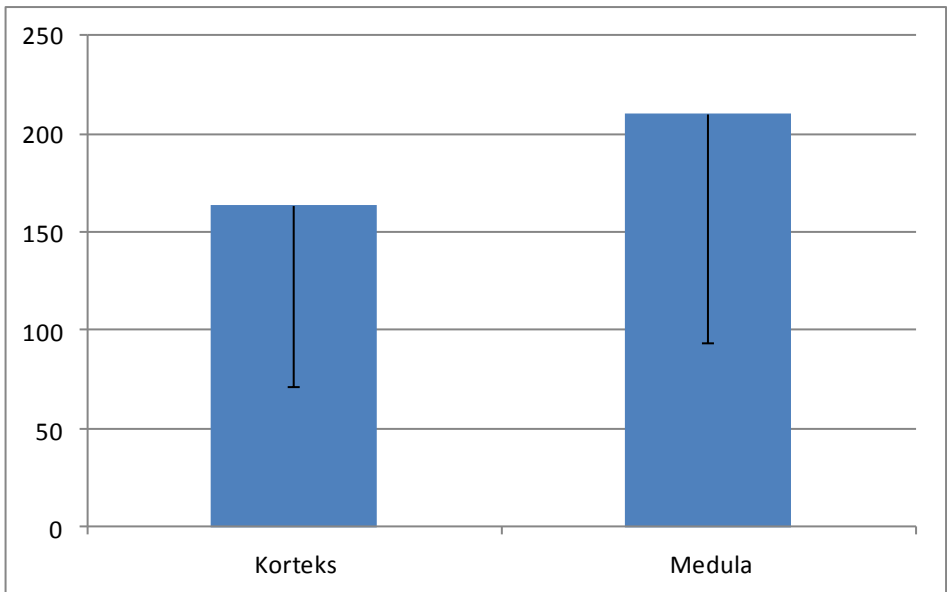
Slika 63. Lakunarnost hromatina medularnih limfocita timusa u različitim starosnim grupama

Tabela 5. Vrednosti GLCM parametara hromatina medularnih limfocita timusa u različitim starosnim grupama

Starost	ASM		KONTRAST		KORELACIJA		IDM		ENTROPIJA		VARIJANSA	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0 dana	0.0019	0.0003	48.7	10.7	0.006	0.002	0.19	0.02	6.54	0.10	208	16
10 dana	0.0018	0.0002	50.7	9.5	0.006	0.001	0.19	0.01	6.56	0.07	205	24
20 dana	0.0017	0.0001	50.8	5.9	0.005	0.000	0.19	0.01	6.60	0.05	215	18
30 dana	0.0019	0.0002	49.0	10.2	0.006	0.001	0.19	0.01	6.53	0.07	188	23
120 dana	0.0018	0.0002	51.0	6.0	0.005	0.001	0.19	0.01	6.58	0.06	221	38
210 dana	0.0018	0.0002	47.6	6.7	0.005	0.001	0.19	0.01	6.57	0.07	220	25
300 dana	0.0017	0.0001	51.9	8.9	0.005	0.001	0.18	0.01	6.60	0.06	219	35
390 dana	0.0018	0.0002	49.3	5.3	0.006	0.001	0.19	0.01	6.54	0.08	204	26



Slika 64. Srednja vrednost entropije hromatina limfocita u korteksu i meduli

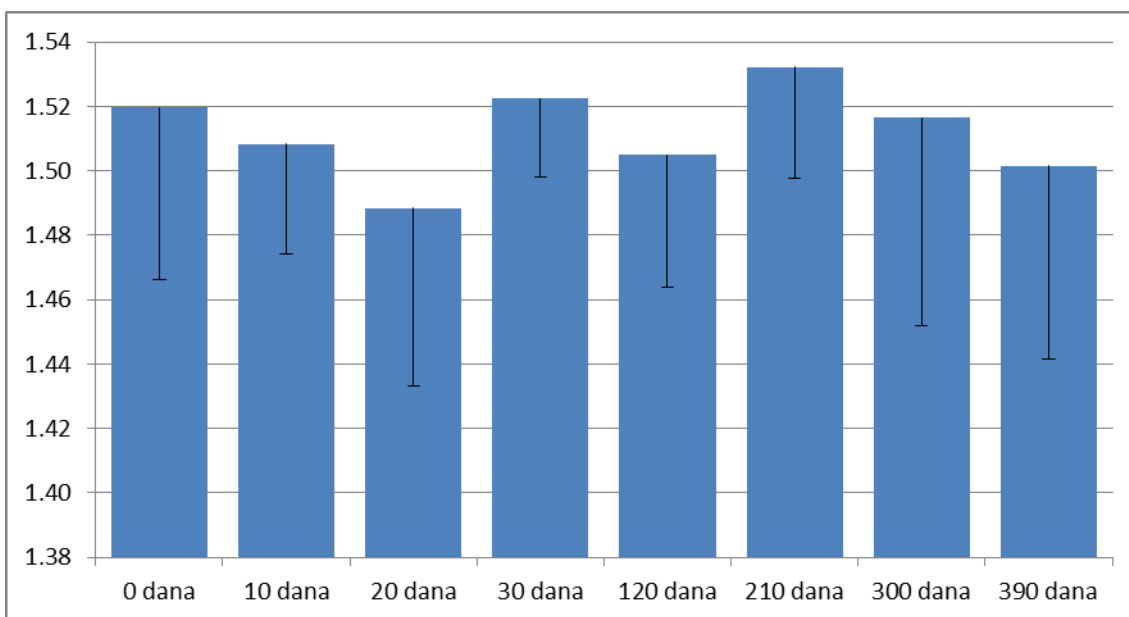


Slika 65. Srednja vrednost teksturalne varijanse hromatina limfocita u korteksu i meduli

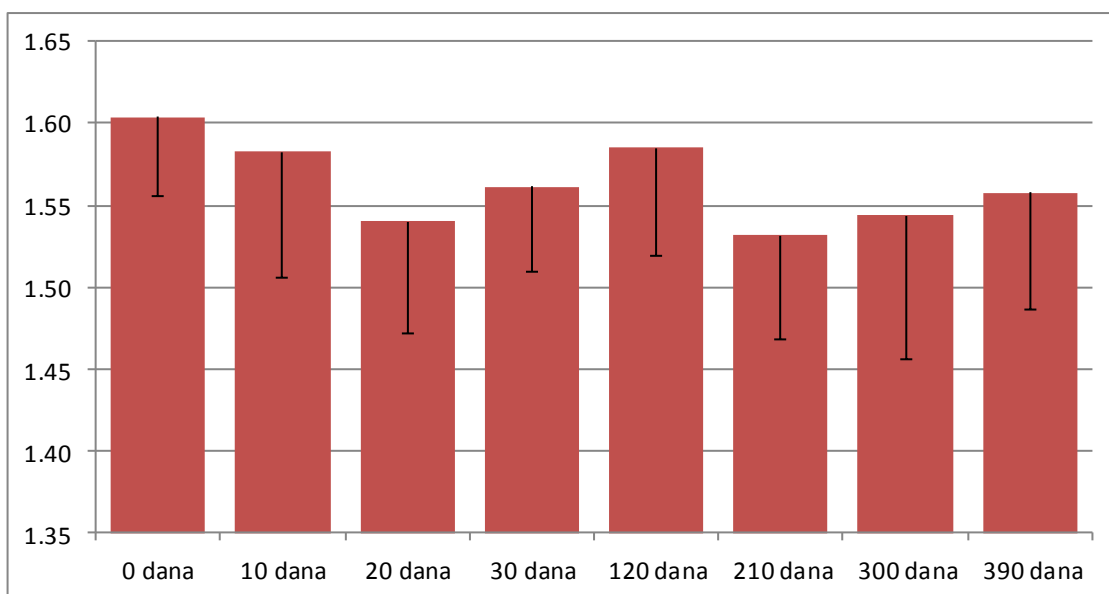
### 3.3.5. Folikularne ćelije u beloj pulpi slezine

Fraktalna dimenzija hromatina folikularnih ćelija u beloj pulpi slezine u novorođenih životinja iznosila je  $1.520 \pm 0.054$ , a u miševa starih 10 dana  $1.508 \pm 0.034$ . Minimalna vrednost fraktalne dimenzije zabeležena je u starosnoj grupi 20 dana ( $1.488 \pm 0.055$ ), a maksimalna u starosnoj grupi od 210 dana ( $1.532 \pm 0.034$ ). Kod najstarijih životinja, srednja hromatinska fraktalna dimenzija iznosila je  $1.502 \pm 0.060$ . Nije bilo statistički značajne razlike između grupa ( $F=0.659$ ,  $p>0.05$ , slika 66).

Lakunarnost hromatinske strukture folikularnih ćelija je bila maksimalna u novorođenih životinja ( $1.604 \pm 0.048$ ). Vrednosti hromatinske lakunarnosti u miševa starih 10 i 20 dana bile su manje ( $1.583 \pm 0.077$ , odnosno  $1.540 \pm 0.068$ ), ali ove promene nisu bile statistički signifikantne. Sličan rezultat je dobijen poređenjem srednjih vrednosti lakunarnosti ostalih starosnih grupa ( $F=1.113$ ,  $p>0.05$ , slika 67).



Slika 66. Fraktalna dimenzija hromatina folikularnih ćelija bele pulpe slezine



Slika 67. Lakunarnost hromatina folikularnih ćelija bele pulpe slezine

Tabela 6. GLCM parametri hromatinske teksture folikularnih ćelija slezine

Starost	ASM		KONTRAST		KORELACIJA		IDM		ENTROPIJA		VARIJANSA	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0 dana	0.021	0.002	1370.9	160.9	0.00030	0.00004	0.30	0.03	5.888	0.100	2941	335
10 dana	0.025	0.005	1332.2	157.7	0.00027	0.00003	0.31	0.03	5.872	0.240	3134	294
20 dana	0.021	0.004	1427.1	155.5	0.00031	0.00008	0.29	0.03	5.954	0.142	2999	127
30 dana	0.025	0.005	1465.8	269.6	0.00027	0.00003	0.31	0.03	5.824	0.128	3207	148
120 dana	0.021	0.002	1411.8	144.2	0.00027	0.00002	0.29	0.02	5.943	0.108	3013	188
210 dana	0.021	0.003	1444.5	196.4	0.00027	0.00002	0.29	0.02	5.940	0.096	3097	285
300 dana	0.020	0.005	1526.7	178.7	0.00029	0.00003	0.31	0.02	5.876	0.112	3000	400
390 dana	0.023	0.002	1322.5	197.0	0.00030	0.00007	0.30	0.02	5.850	0.155	2936	308

GLCM parametri teksture hromatina folikularnih ćelija se takođe nisu značajno menjali u eksperimentu. U tabeli 6, prikazane su srednje vrednosti i standardne devijacije teksturalne entropije, korelacije, varijanse, kontrasta, kao i angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike.

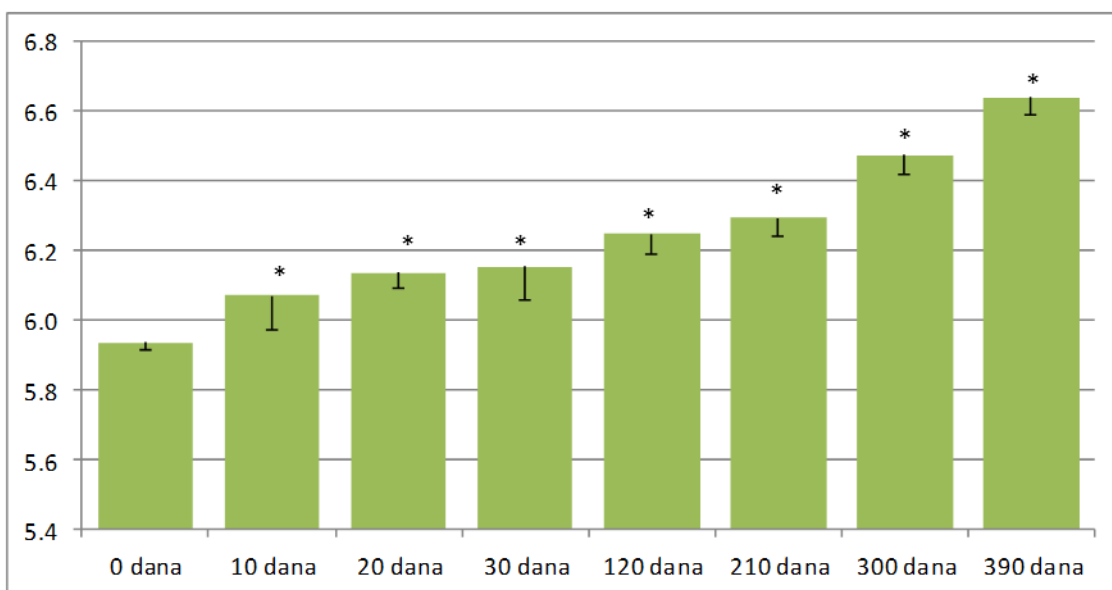
### 3.3.6. Eritroidne prekurzorske ćelije slezine

U eritroidnim prekurzorskim ćelijama hematopoeznog tkiva slezine sa starenjem je došlo do povećanja GLCM entropije hromatina. U novorođenih životinja srednja vrednost hromatinske entropije iznosila je  $5.936 \pm 0.021$ . Već u grupi životinja starosti 10 dana, došlo je do statistički značajnog povećanja ( $6.070 \pm 0.096$ ,  $p < 0.01$ ). Vrednosti entropije kod starijih životinja su nastavile da rastu (30 dana:  $6.154 \pm 0.095$ ; 120 dana:  $6.250 \pm 0.061$ ; 210 dana:  $6.293 \pm 0.052$ ,  $p < 0.001$ , u poređenju sa grupom novorođenih miševa), da bi svoj maksimum

dostigle u grupi životinja starih 390 dana ( $6.640 \pm 0.052$ ,  $p < 0.001$ , slika 68).

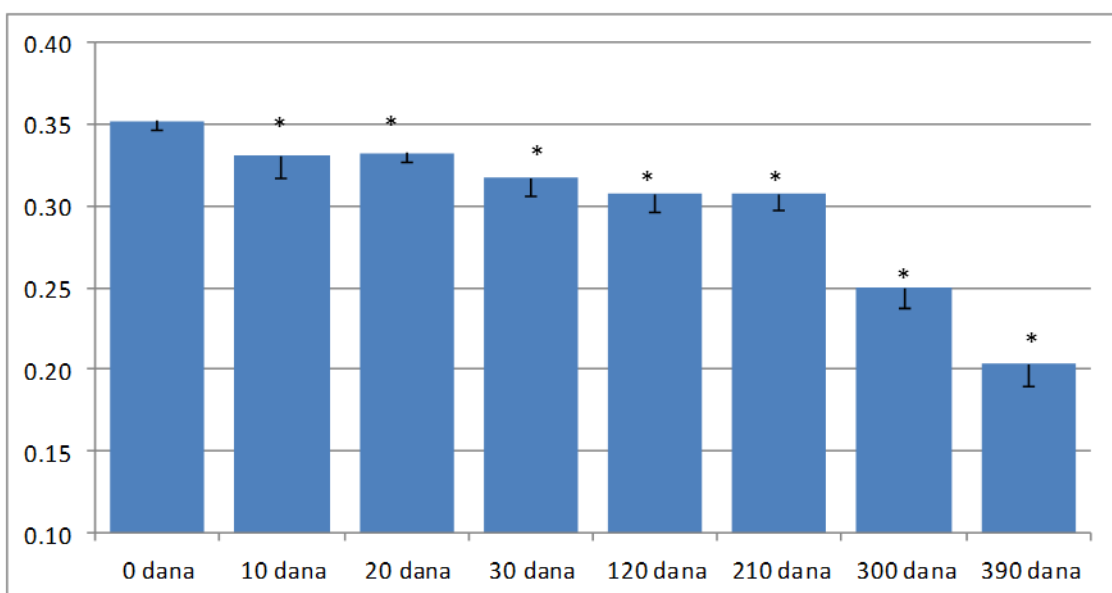
Suprotno od entropije, homogenost hromatina eritroidnih prekurzora, merena vrednostima inverznog momenta razlike se smanjivala sa starošću. Maksimalna homogenost je zabeležena u grupi novorođenih životinja ( $0.352 \pm 0.005$ ), a minimalna u najstarijih miševa ( $0.204 \pm 0.014$ ). Statistički značajno smanjenje inverznog momenta razlike zabeleženo je već u grupi životinja starih 10 dana ( $0.331 \pm 0.013$ ,  $p < 0.05$ , slika 69).





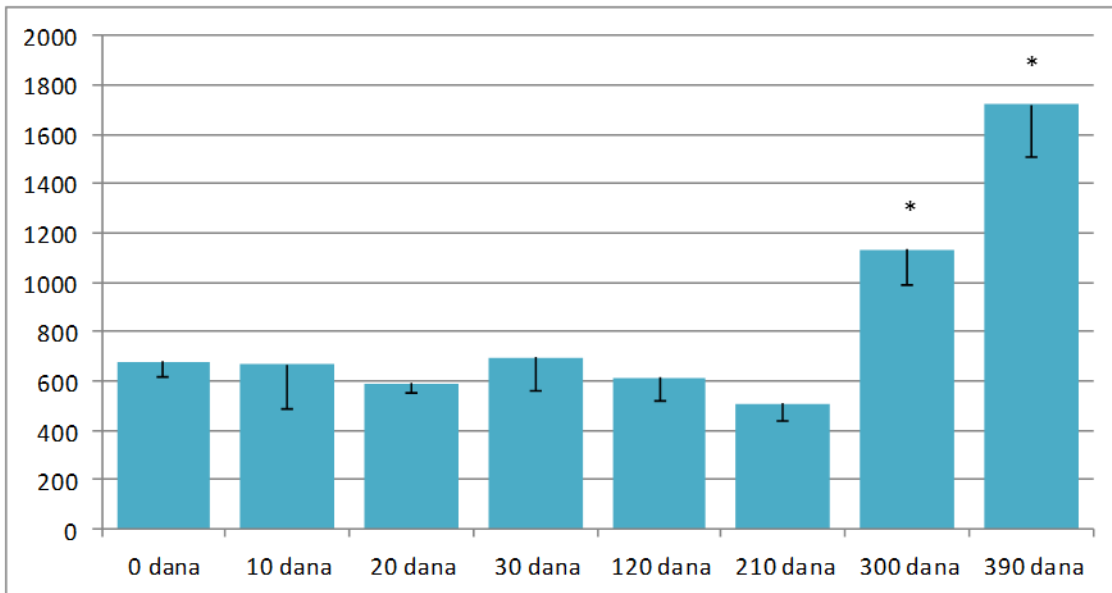
Slika 68. Teksturalna entropija hromatina eritroidnih prekurzorskih ćelija slezine u različitim starosnim grupama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja

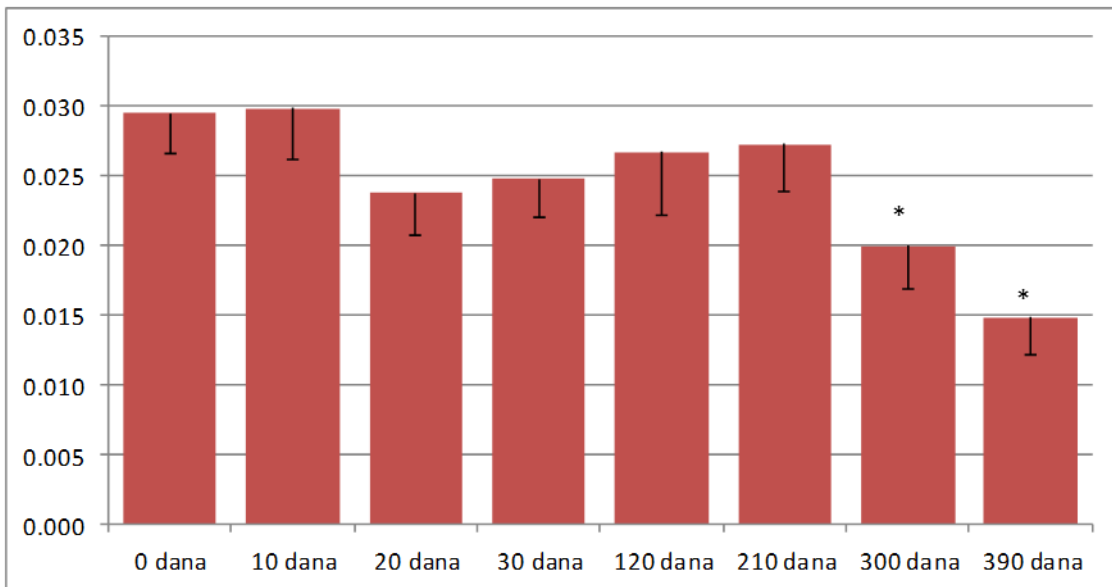


Slika 69. Inverzni momenat razlike hromatina eritroidnih prekurzorskih ćelija slezine u različitim starosnim grupama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja

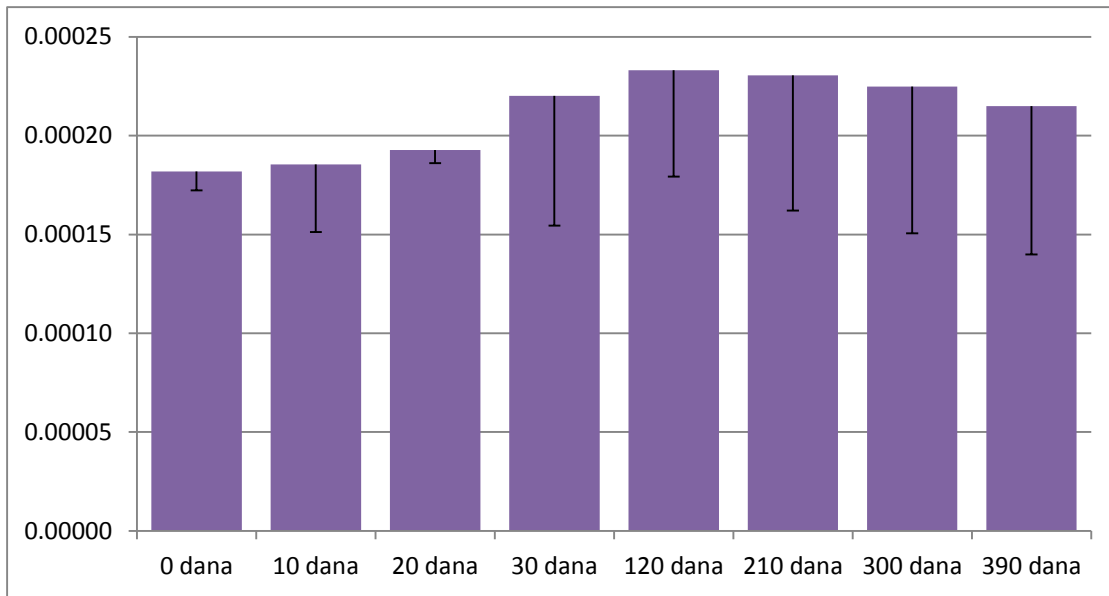


Slika 70. Teksturalni kontrast hromatina eritroidnih prekurzorskih ćelija slezine u različitim starosnim grupama. \* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja

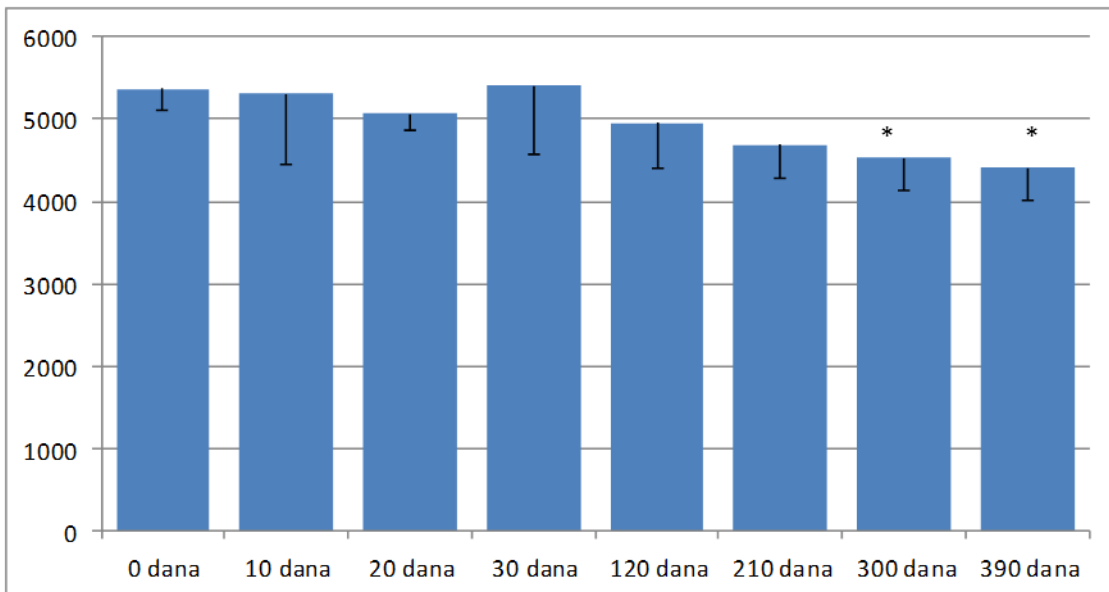


Slika 71. Angularni drugi momenat hromatina eritroidnih prekurzorskih ćelija slezine u različitim starosnim grupama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



Slika 72. Teksturalna korelacija hromatina eritroidnih prekurzorskih ćelija slezine u različitim starosnim grupama



Slika 73. Teksturalna varijansa hromatina eritroidnih prekurzorskih ćelija slezine u različitim starosnim grupama.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja

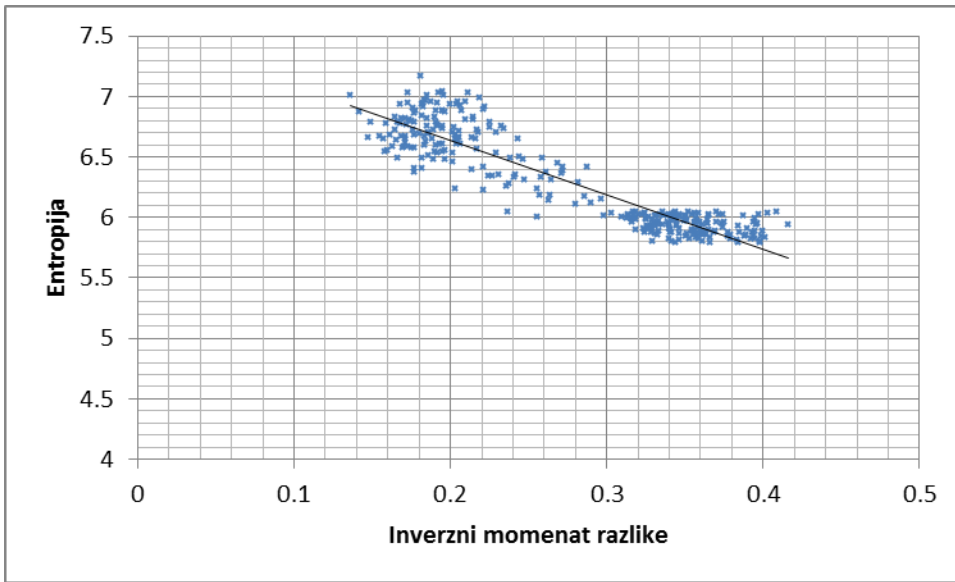
Vrednosti teksturalnog kontrasta se nisu značajno menjale u postnatalnom razvoju. Statistički značajno povećanje kontrasta je zabeleženo samo u grupama životinja starih 300 dana ( $1135 \pm 147$  prema  $678 \pm 63$  kod novorođenih miševa,  $p < 0.01$ ), i 390 dana ( $1719 \pm 210$ ,  $p < 0.01$ , slika 70).

Angularni drugi momenat hromatina eritroidnih prekurzora u novorođenih miševa iznosio je  $0.029 \pm 0.003$ , i nije se značajno menjao u postnatalnom razvoju i starenju sa izuzetkom u životinja starosti 300 dana ( $0.020 \pm 0.003$ ) i 390 dana ( $0.015 \pm 0.003$ ) gde je bio statistički značajno manji nego u ostalim grupama ( $p < 0.01$ , slika 71).

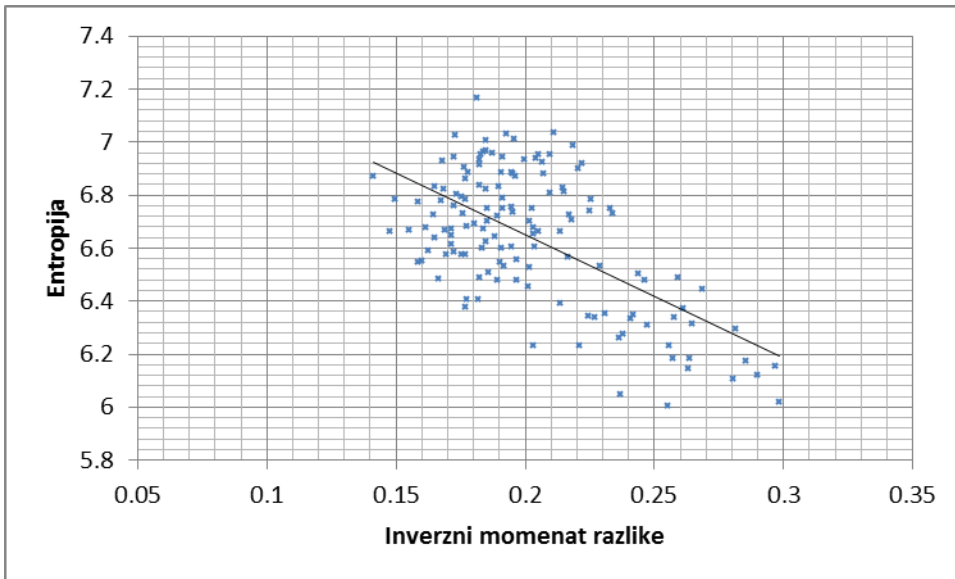
Teksturalna korelacija hromatina je varirala između vrednosti  $1.82 \cdot 10^{-4} \pm 9.59 \cdot 10^{-6}$ , koliko je zabeleženo u novorođenih miševa do  $2.33 \cdot 10^{-4} \pm 5.39 \cdot 10^{-6}$ , koliko je zabeleženo u grupi miševa starih 120 dana. Nije bilo statistički značajne razlike između grupa ( $p > 0.05$ , slika 72).

Teksturalna varijansa hromatina je u novorođenih životinja iznosila  $5371 \pm 259$ . Nije bilo značajne razlike između grupa sa izuzetkom u grupama miševa starosti 300 dana ( $4525 \pm 395$ ) i 390 dana ( $4405 \pm 385$ ) gde je detektovano statistički značajno smanjenje ( $p < 0.05$ , slika 73).

Detektovana je statistički visoko značajna negativna korelacija između hromatinske entropije i inverznog momenta razlike u svim grupama. Drugim rečima, što je entropija hromatina bila veća - to je hromatinska homogenost bila manja. Primeri plotovanih vrednosti entropije i inverznog momenta razlike za grupu novorođenih i najstarijih životinja prikazane su na slikama 74 i 75.



Slika 74. Primer plotovanih vrednosti entropije i inverznog momenta razlike hromatina eritroidnih prekursora za grupu novorođenih životinja



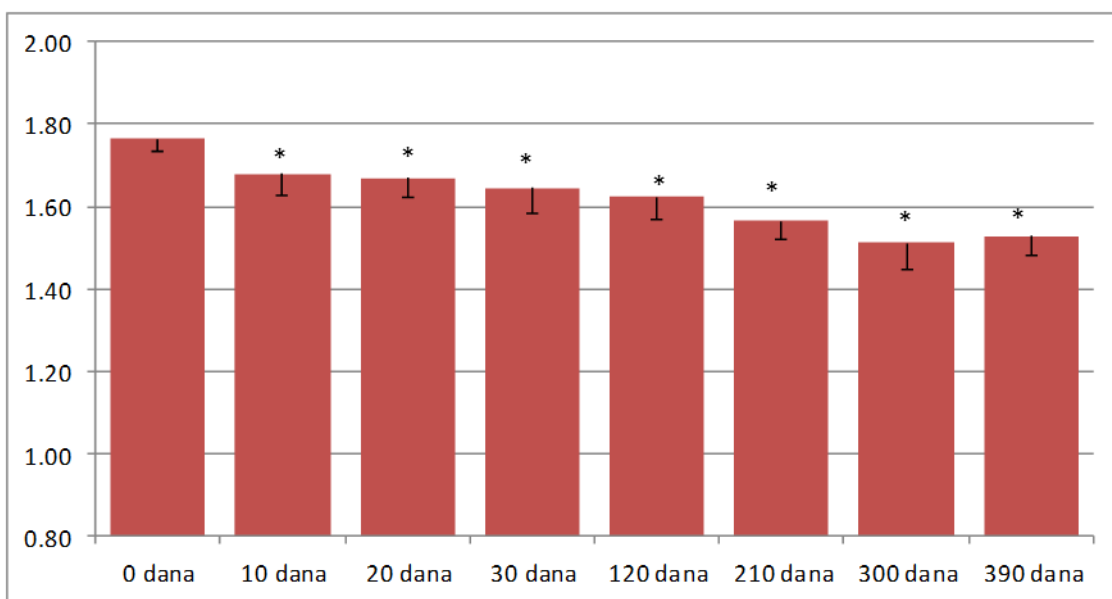
Slika 75. Primer plotovanih vrednosti entropije i inverznog momenta razlike hromatina eritroidnih prekursora za grupu životinja starosti 390 dana

Fraktalna dimenzija i lakunarnost hromatina u eritroidnim prekurzorskim ćelijama se nisu značajno razlikovale između starosnih grupa ( $p>0.05$ ).

### *3.3.7. Epitelne ćelije proksimalnih tubula bubrega*

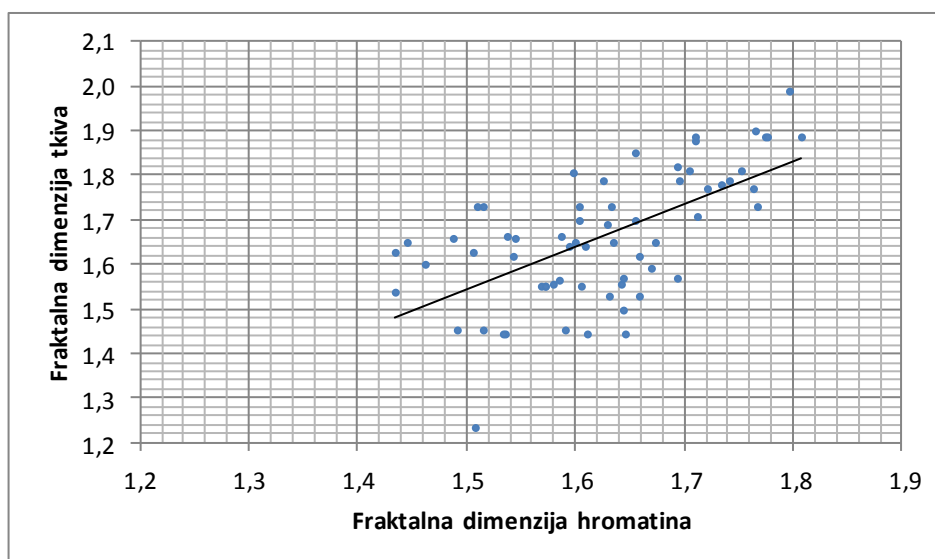
Srednja vrednost fraktalne dimenzije hromatina epitelnih ćelija proksimalnih tubula u novorođenih životinja iznosila je  $1.765\pm 0.030$ . U životinja starih 10 dana, fraktalna dimenzija je bila statistički značajno manja i iznosila je  $1.679\pm 0.054$ . U starijih životinja, ove vrednosti su nastavile da padaju i u poređenju sa grupom novorođenih miševa, razlika je u svim slučajevima bila statistički visoko signifikantna ( $p<0.01$ , slika 76). Uočena je statistički visoko značajna pozitivna korelacija između fraktalne dimenzije tkiva korteksa bubrega i fraktalne dimenzije hromatina epitelnih ćelija proksimalnih tubula ( $p<0.01$ , slika 77).

Lakunarnost hromatina u proksimalnim tubulima se sa druge strane povećavala sa starenjem. Minimalna vrednost zabeležena je u grupi novorođenih životinja ( $1.227\pm 0.100$ ), dok je u miševa starih deset dana srednja hromatinska lakunarnost iznosila  $1.346\pm 0.072$ , što je bilo statistički značajno povećanje. U starosnoj grupi miševa od 20 dana lakunarnost je nastavila da raste ( $1.449\pm 0.083$ ), a razlika u odnosu na prvu grupu je postala statistički visoko signifikantna ( $p<0.01$ , slika 78).

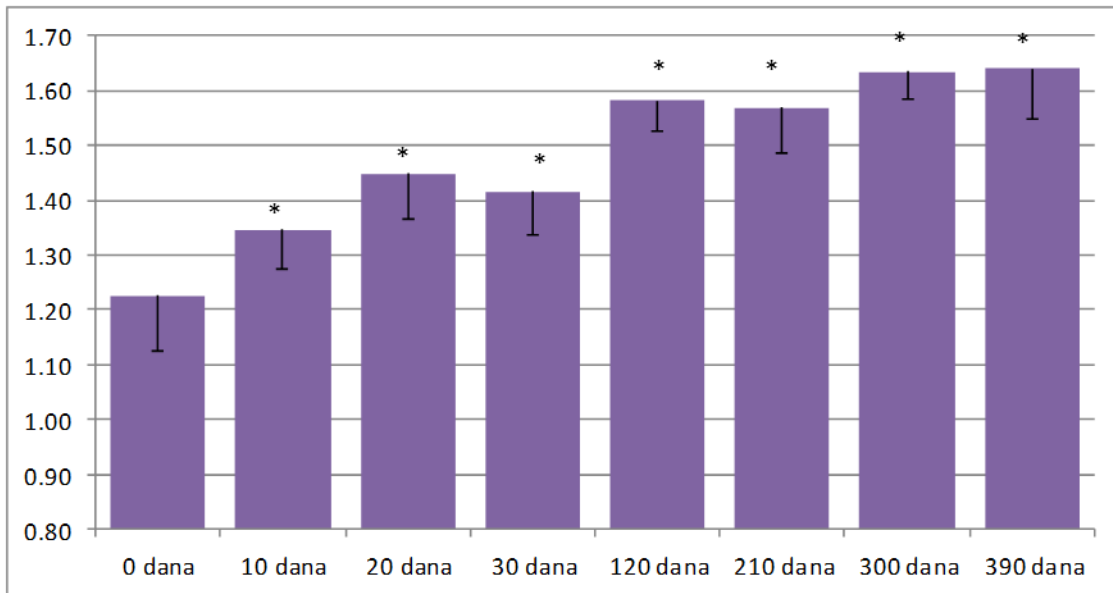


Slika 76. Fraktalna dimenzija hromatina u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



Slika 77. Odnos fraktalne dimenzije tkiva korteksa bubrega i fraktalne dimenzije hromatina epitelnih ćelija proksimalnih tubula.



Slika 78. Lakunarnost hromatina u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula.

Lakunarnost je u starijih miševa ostala visoka da bi maksimalnu vrednost dostigla u poslednjoj (390 dana) grupi ( $1.640 \pm 0.091$ ,  $p < 0.01$ , slika 78).

Za razliku od fraktalne dimenzije i lakunarnosti, teksturalni pokazatelji hromatinske strukture se nisu značajno menjali sa starenjem. Kao što se vidi iz tabele 7, nije bilo statistički značajne razlike između starosnih grupa.



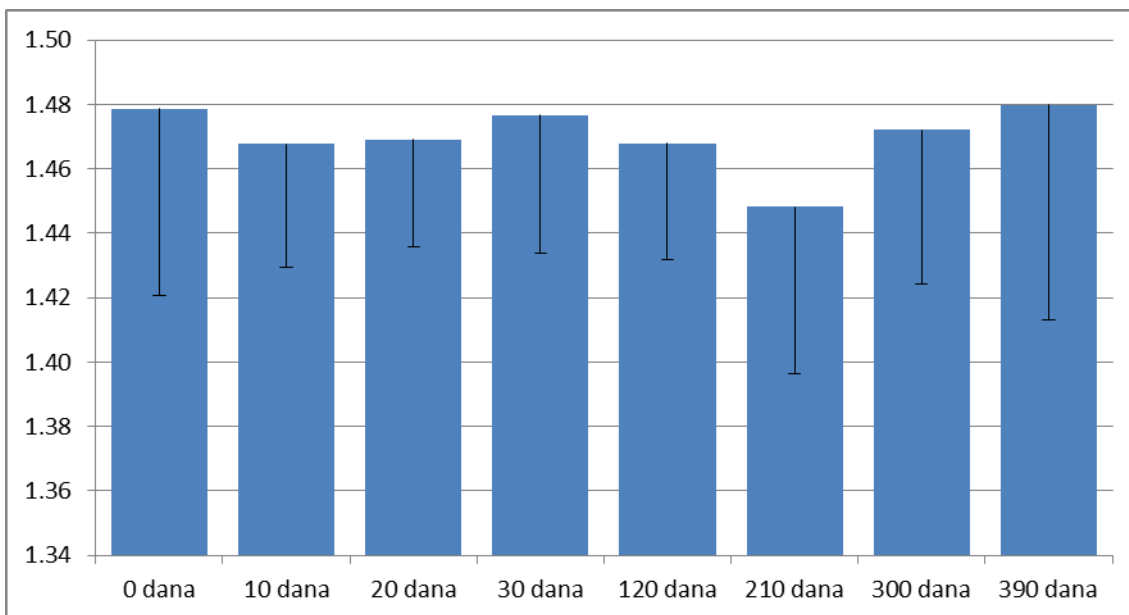
Tabela 7. GLCM parametri teksture hromatina u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula

Starost	ASM		KONTRAST		KORELACIJA		IDM		ENTROPIJA		VARIJANSA	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0 dana	0.038	0.007	1128.0	96.4	0.00025	0.00003	0.32	0.02	6.26	0.13	3981	561
10 dana	0.039	0.008	1138.1	159.1	0.00026	0.00005	0.32	0.02	6.29	0.15	4064	457
20 dana	0.037	0.008	1190.1	140.4	0.00024	0.00003	0.31	0.03	6.32	0.15	4158	487
30 dana	0.039	0.007	1093.6	162.8	0.00025	0.00004	0.32	0.02	6.23	0.12	4027	676
120 dana	0.034	0.006	1085.4	113.8	0.00026	0.00004	0.31	0.02	6.34	0.12	3812	500
210 dana	0.037	0.004	1258.7	199.7	0.00024	0.00004	0.32	0.01	6.28	0.13	4136	539
300 dana	0.039	0.008	1084.5	124.1	0.00025	0.00005	0.32	0.02	6.25	0.13	3998	647
390 dana	0.041	0.005	1074.9	197.8	0.00026	0.00003	0.32	0.01	6.31	0.10	4046	312

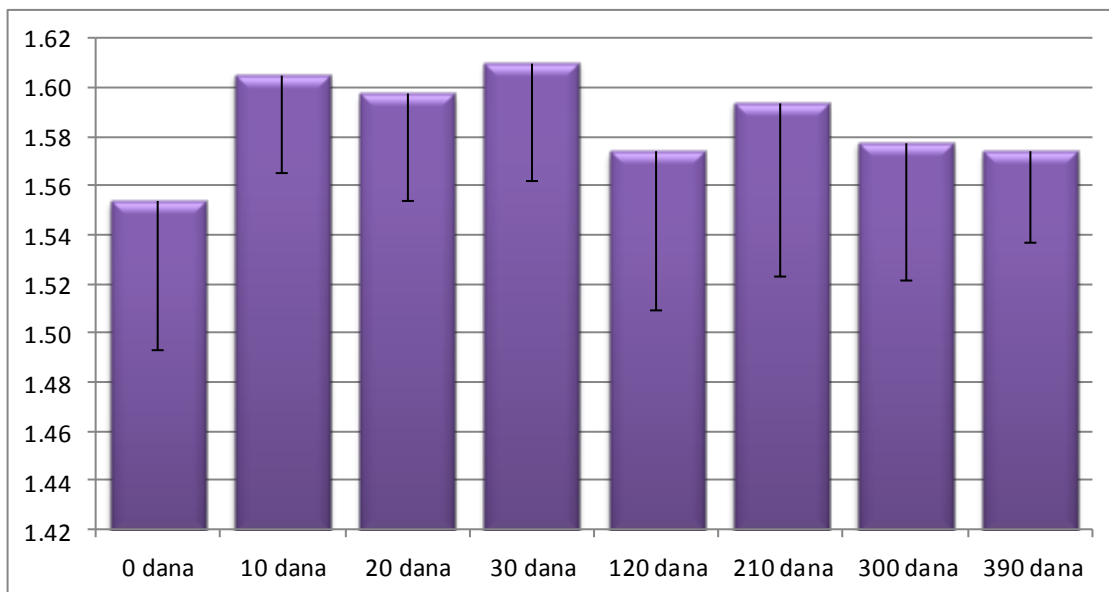
### 3.3.8. Epitelne ćelije distalnih tubula bubrega

Srednja vrednost fraktalne dimenzije hromatina epitelnih ćelija distalnih tubula bila je  $1.479 \pm 0.058$  u novorođenih životinja,  $1.468 \pm 0.038$  u miševa starih 10 dana, i  $1.469 \pm 0.033$  u miševa starih 20 dana. Srednje vrednosti sa standardnim devijacijama su prikazane na slici 79. Kao što se vidi iz slike, u grupi životinja starosti 210 dana postoji vidljiv pad fraktalne dimenzije ( $1.448 \pm 0.052$  u poređenju sa  $1.468 \pm 0.036$  u prethodnoj grupi), međutim ova promena nije bila statistički značajna. Ni između ostalih grupa nije detektovana značajna razlika ( $p > 0.05$ ,  $F = 0.349$ ).

Lakunarnost hromatina u novorođenih životinja iznosila je  $1.554 \pm 0.061$ , a u životinja starih 10 dana  $1.605 \pm 0.040$ . U svim narednim starosnim grupama, lakunarnosti je bila viša u poređenju sa novorođenim miševima (20 dana:  $1.598 \pm 0.043$ ; 30 dana:  $1.610 \pm 0.048$ ; 390 dana:  $1.574 \pm 0.037$ ), ali ovo povećanje nije bilo statistički signifikantno ( $F=0.898$ ,  $p>0.05$ , slika 80).



Slika 79. Fraktalna dimenzija hromatina u epitelnim ćelijama distalnih tubula.



Slika 80. Lakunarnost hromatina u epitelnim ćelijama distalnih tubula

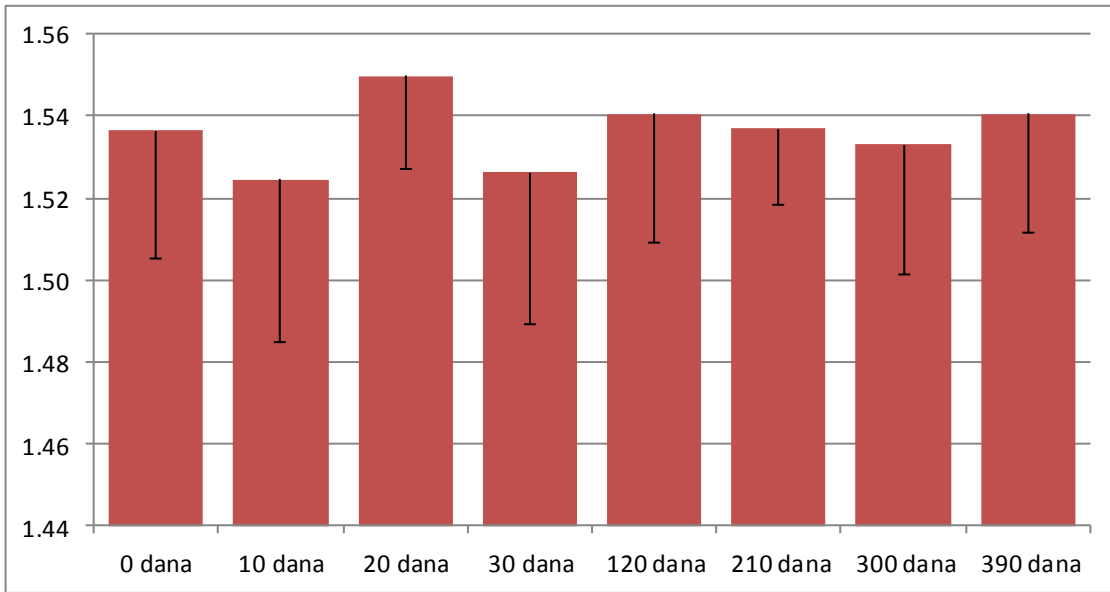
Kao u slučaju fraktalnih parametara, ni GLCM parametri teksture hromatina ćelija distalnih tubula nisu se značajno menjali ( $p>0.05$ ). Srednje vrednosti GLCM parametara sa standardnim devijacijama prikazane su u tabeli 8. Nije detektovana značajna korelacija između hromatinskih i tkivnih fraktalnih, odnosno GLCM parametara.

Tabela 8. GLCM parametri teksture hromatina u epitelnim ćelijama distalnih tubula.

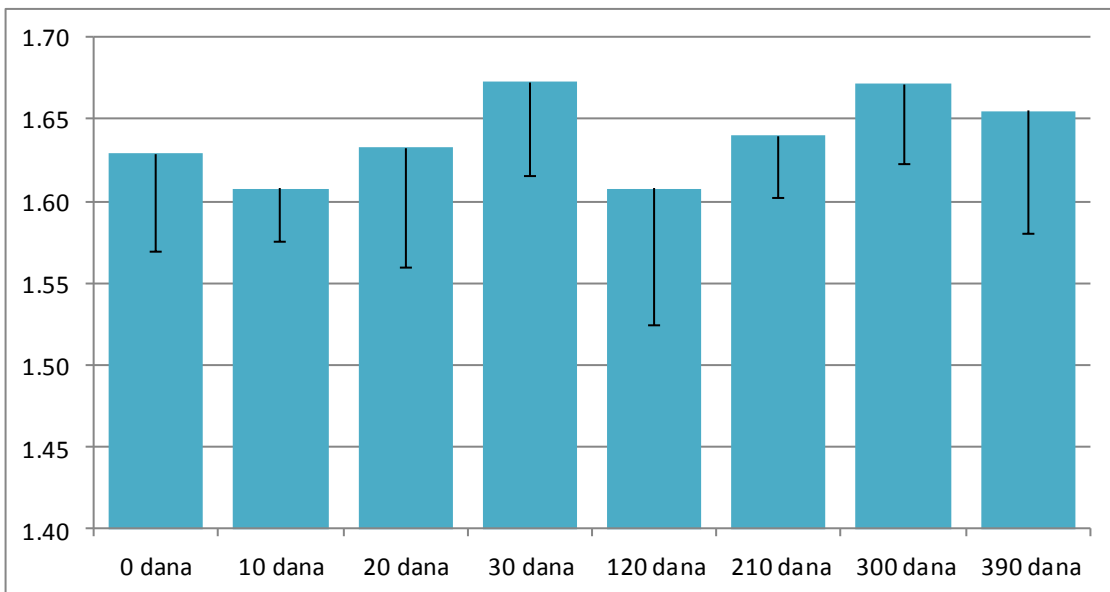
Starost	ASM		KONTRAST		KORELACIJA		IDM		ENTROPIJA		VARIJANSA	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0 dana	0.021	0.005	1562.8	148.9	0.00032	0.00002	0.28	0.04	5.96	0.15	3033	245
10 dana	0.019	0.003	1459.7	148.1	0.00031	0.00002	0.28	0.01	5.95	0.09	3092	302
20 dana	0.021	0.003	1540.5	201.7	0.00030	0.00009	0.28	0.02	5.90	0.10	3210	470
30 dana	0.020	0.006	1570.1	167.6	0.00029	0.00003	0.28	0.03	5.97	0.10	3144	210
120 dana	0.023	0.003	1551.2	229.5	0.00030	0.00005	0.30	0.02	5.87	0.13	3090	385
210 dana	0.023	0.005	1512.8	172.0	0.00032	0.00002	0.28	0.02	5.95	0.13	3157	263
300 dana	0.019	0.003	1487.0	139.8	0.00031	0.00003	0.26	0.02	6.05	0.09	2943	283
390 dana	0.021	0.002	1511.2	132.9	0.00030	0.00002	0.28	0.02	5.94	0.14	3056	172

### 3.3.9. Epitelne ćelije sabirnih kanalića bubrega

Fraktalna dimenzija hromatina epitelnih ćelija sabirnih kanalića u novorođenih životinja iznosila je  $1.537 \pm 0.031$ , a u miševa starih 10 dana  $1.525 \pm 0.040$ . Ovo smanjenje nije bilo statistički značajno ( $p>0.05$ ). Maksimalna vrednost fraktalne dimenzije hromatina zabeležena je u životinja starih 20 dana:  $1.550 \pm 0.023$ . Između starosnih grupa nije uočena statistički značajna razlika ( $F=0.785$ ,  $p>0.05$ , slika 81).



Slika 81. Fraktalna dimenzija hromatina u epitelnim ćelijama sabirnih kanalića



Slika 82. Lakunarnost hromatina u epitelnim ćelijama sabirnih kanalića

Tabela 9. GLCM parametri teksture hromatina u epitelnim ćelijama sabirnih kanalića

Starost	ASM		KONTRAST		KORELACIJA		IDM		ENTROPIJA		VARIJANSA	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0 dana	0.026	0.004	993.7	106.3	0.00031	0.00005	0.35	0.02	5.78	0.09	3039	319
10 dana	0.026	0.003	1022.6	80.1	0.00029	0.00001	0.34	0.02	5.73	0.12	3115	121
20 dana	0.028	0.005	1066.9	128.6	0.00030	0.00004	0.36	0.03	5.72	0.20	3229	403
30 dana	0.027	0.004	1053.0	121.4	0.00029	0.00002	0.35	0.02	5.76	0.13	3206	277
120 dana	0.026	0.003	980.8	137.2	0.00032	0.00004	0.36	0.02	5.71	0.13	2994	317
210 dana	0.026	0.004	1011.2	93.9	0.00030	0.00001	0.35	0.02	5.73	0.12	3111	203
300 dana	0.028	0.004	1041.2	78.2	0.00028	0.00002	0.35	0.03	5.78	0.15	3343	243
390 dana	0.031	0.008	1033.0	74.8	0.00029	0.00003	0.36	0.03	5.68	0.15	3263	342

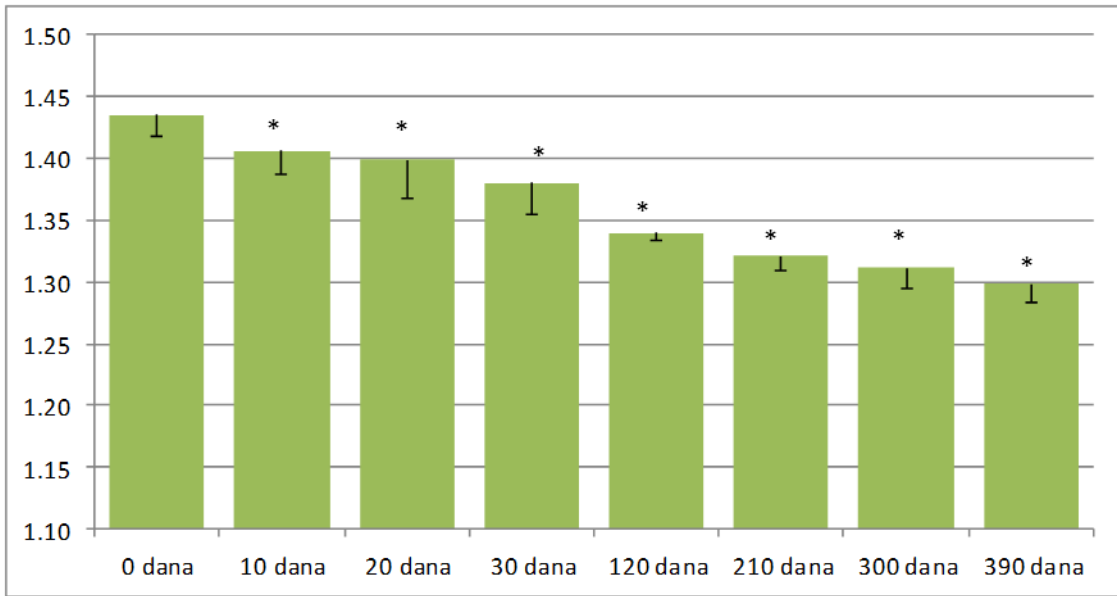
Lakunarnost hromatina epitelnih ćelija sabirnih kanalića u novorođenih životinja iznosila je  $1.629 \pm 0.060$ . Maksimalna vrednost lakunarnosti zabeležena je u starosnoj grupi 30 dana ( $1.673 \pm 0.058$ ), a minimalna vrednost u starosnoj grupi od 10 dana ( $1.608 \pm 0.033$ ). Kao i kod fraktalne dimenzije hromatina, ni kod hromatinske lakunarnosti nije bilo statistički značajne razlike između grupa ( $F=0.251$ ,  $p>0.05$ , slika 82).

Ni u GLCM parametrima teksture hromatina nije zabeležena značajna razlika između grupa. Vrednosti entropije, angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, kontrasta, korelacije i varijanse prikazane su u tabeli 9.

### 3.3.10. Čelije macula densa strukture

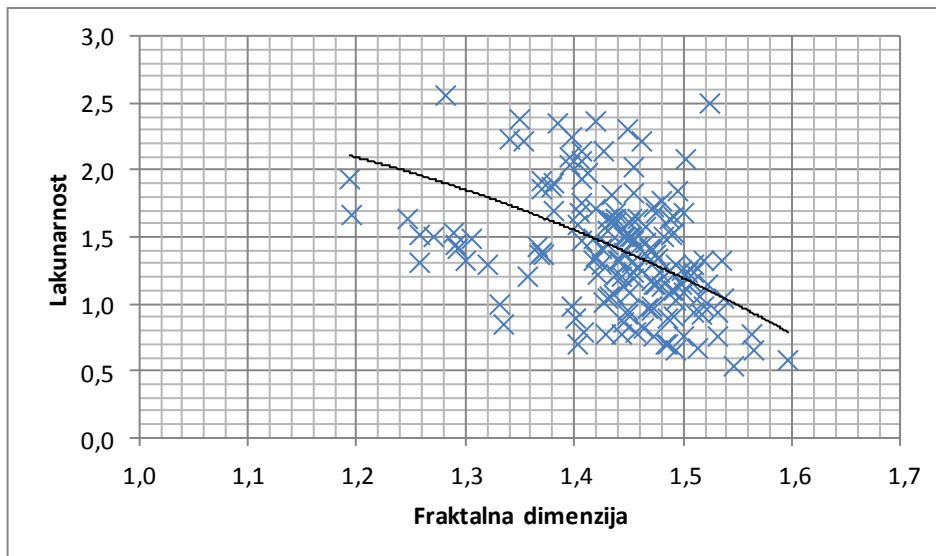
Fraktalna dimenzija hromatina u ćelijama makule denze iznosila je  $1.435 \pm 0.017$  u novorođenih životinja. Već u prvoj narednoj starosnoj grupi (10 dana) došlo je do statistički značajnog smanjenja ( $1.406 \pm 0.018$ ,  $p < 0.05$ ), da bi u životinja starih 20 dana smanjenje postalo visoko signifikantno ( $1.398 \pm 0.030$ ,  $p < 0.01$ ). Fraktalna dimenzija kod starijih životinja je nastavila da opada (30 dana:  $1.380 \pm 0.025$ , 120 dana:  $1.3399 \pm 0.017$ ; 300 dana:  $1.3112 \pm 0.016$ ,  $p < 0.001$ ), da bi minimum bio dostignut u poslednjoj (najstarijoj) grupi ( $1,2984 \pm 0,015$ ,  $p < 0.001$ , slika 83).

Lakunarnost hromatina u ćelijama makule denze u novorođenih životinja iznosila je  $1.416 \pm 0.145$  što je predstavljalo minimalnu vrednost. Razlika je postala statistički značajna u grupi od 120 dana ( $1.502 \pm 0.007$ ,  $p < 0.01$ ), a maksimalna vrednost lakunarnosti je detektovana u najstarijih životinja ( $1.553 \pm 0.005$ ,  $p < 0.001$ ).



Slika 83. Fraktalna dimenzija hromatina u ćelijama macula densa regiona.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



Slika 84. Odnos fraktalne dimenzije i lakunarnosti u ćelijama makule denze u grupi novorođenih miševa.



Tabela 10. GLCM parametri teksture hromatina u ćelijama makule denze

Starost	ASM		KONTRAST		KORELACIJA		IDM		ENTROPIJA		VARIJANSA	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0 dana	0,047	0,004	221,3	20,7	0,00035	0,00007	0,46	0,01	5,74	0,07	2972	439
10 dana	0,047	0,004	232,3	50,0	0,00034	0,00009	0,45	0,01	5,78	0,11	3176	690
20 dana	0,051	0,005	263,3	49,5	0,00029	0,00005	0,46	0,01	5,70	0,03	3651	619
30 dana	0,050	0,004	285,3	48,1	0,00026	0,00005	0,45	0,01	5,73	0,08	4107	754
120 dana	0,047	0,003	275,5	33,3	0,00030	0,00003	0,45	0,01	5,75	0,04	3553	299
210 dana	0,048	0,006	252,3	24,4	0,00031	0,00003	0,46	0,01	5,74	0,07	3454	220
300 dana	0,049	0,004	264,9	25,7	0,00032	0,00003	0,46	0,01	5,70	0,09	3420	251
390 dana	0,048	0,004	257,7	22,5	0,00031	0,00002	0,46	0,01	5,73	0,08	3442	231

Lakunarnost je u svim grupama bila u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa fraktalnom dimenzijom ( $p < 0.001$ ). Na slici 84 prezentovane su vrednosti fraktalne dimenzije i lakunarnosti za hromatinske strukture u grupi novorođenih životinja. Korelacije između ova dva parametra slične jačine i smera su detektovane i u ostalim starosnim grupama.

Teksturalni parametri hromatina su prikazani u tabeli 10. Nije detektovana značajna razlika između starosnih grupa ni za jedan od GLCM parametara.

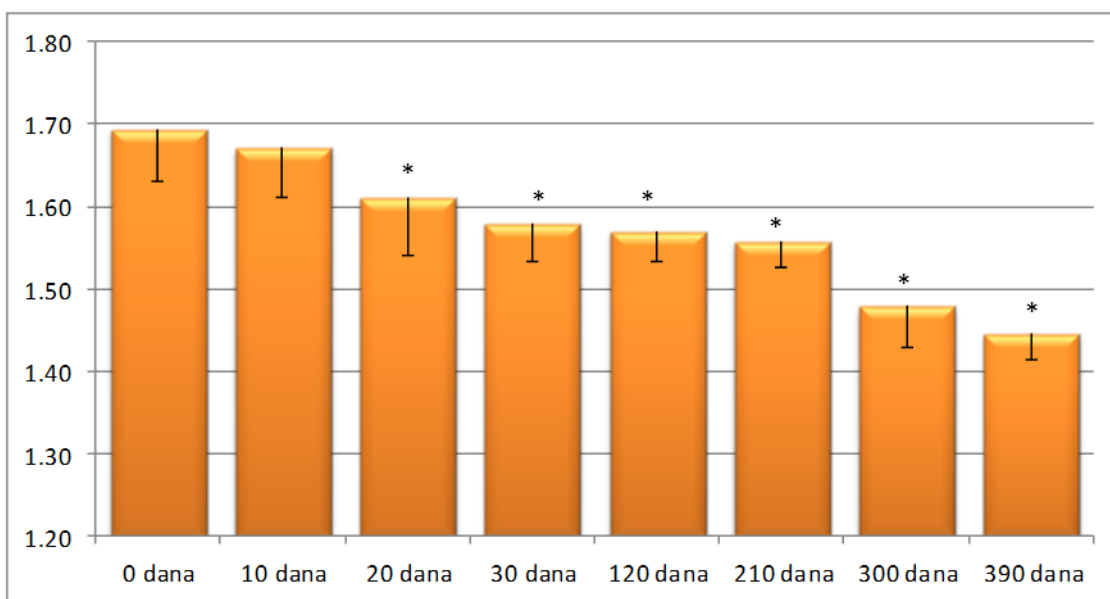
### 3.3.11. Hepatociti

Fraktalna dimenzija hromatina hepatocita bila je najveća u novorođenih životinja i iznosila je  $1.694 \pm 0.063$ . U miševa starih 10 dana detektovano je smanjenje fraktalne dimenzije ( $1.672 \pm 0.060$ ), međutim ono nije bilo statistički značajno. Fraktalna dimenzija u svim ostalim starosnim grupama bila je statistički značajno manja u

poređenju sa novorođenim životinjama i ta razlika se uvećavala kod svake sledeće ispitivane grupe (grupa 20 dana:  $1.612 \pm 0.071$ ;  $p=0.013$ ; grupa 30 dana:  $1.579 \pm 0.046$ ,  $p<0.01$ ). Minimalna vrednost fraktalne dimenzije zabeležena je u najstarijih životinja (390 dana,  $1.446 \pm 0.032$ ,  $p<0.001$ , slika 85). Uočena je statistički visoko značajna pozitivna korelacija između fraktalne dimenzije jetrinih lobulusa i fraktalne dimenzije hromatina hepatocita ( $p<0.01$ , slika 86).

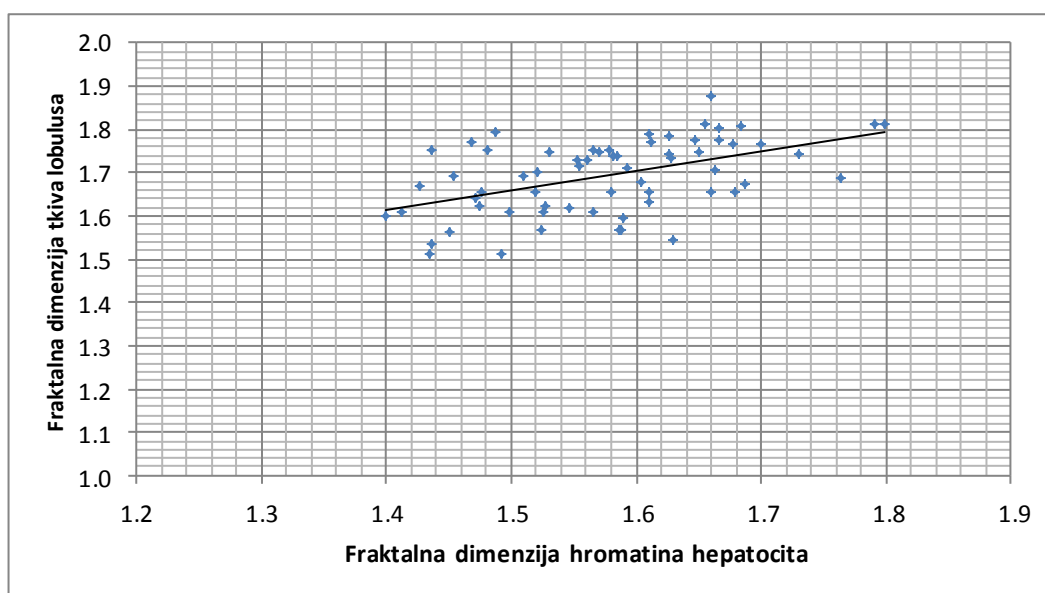
Za razliku od fraktalne dimenzije, lakunarnost hromatina hepatocita se povećala sa starenjem. Minimalna vrednost zabeležena je u novorođenih životinja ( $1.501 \pm 0.055$ ), a maksimalna u najstarijih životinja ( $1.897 \pm 0.083$ ). U životinja starih 10, 20 i 30 dana, iako je lakunarnost bila veća od prve grupe, ta razlika nije bila statistički značajna ( $p>0.05$ ). Tek u starosnoj grupi životinja starosti 120 dana, razlika je postala statistički značajna ( $p<0.01$ , slika 87) da bi se u starijih životinja, značajnost razlike još više povećala ( $p<0.001$ , slika 87).

Teksturalni parametri hromatina hepatocita se za razliku od fraktalnih nisu značajno menjali. U tabeli 11, prikazane su srednje vrednosti GLCM parametara sa standardnim varijacijama.

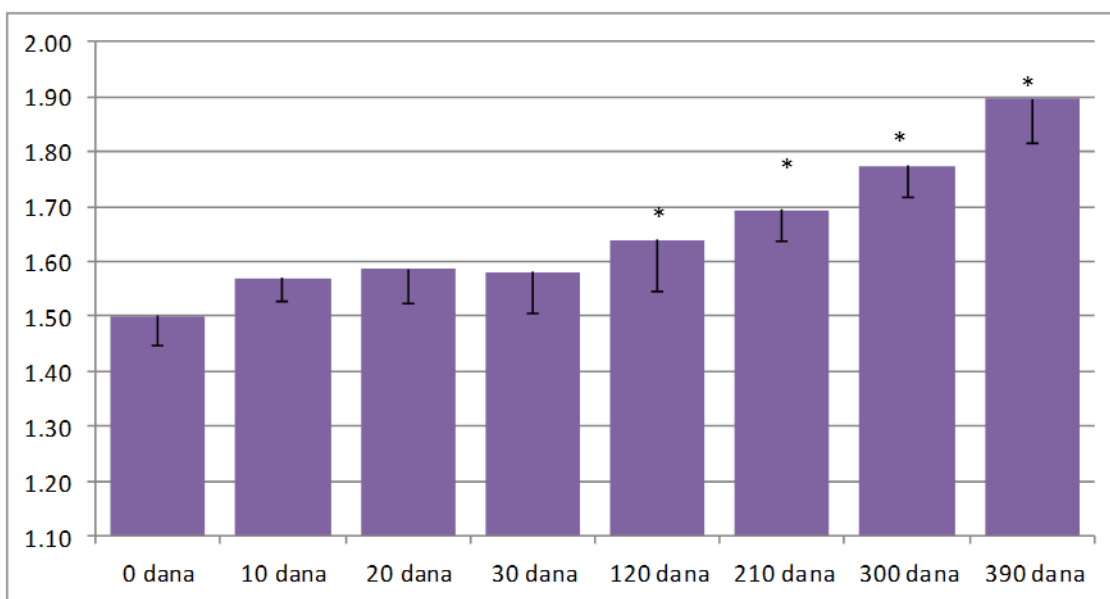


Slika 85. Fraktalna dimenzija hromatina hepatocita.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja



Slika 86. Odnos fraktalne dimenzije tkiva lobulusa u jetri (H/E bojenje) i fraktalne dimenzije hromatina hepatocita.



Slika 87. Lakunarnost hromatina hepatocita.

\* $p < 0.05$  u poređenju sa grupom novorođenih životinja

Tabela 11. GLCM parametri hromatina hepatocita.

Starost	ASM		KONTRAST		KORELACIJA		IDM		ENTROPIJA		VARIJANSA	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
0 dana	0.015	0.004	1904.2	217.6	0.00025	0.00002	0.22	0.02	6.15	0.16	2935	359
10 dana	0.015	0.002	1797.9	137.7	0.00026	0.00002	0.24	0.03	6.14	0.12	2790	211
20 dana	0.017	0.005	1936.6	92.5	0.00024	0.00002	0.23	0.02	6.16	0.08	3110	304
30 dana	0.017	0.004	1942.7	282.7	0.00024	0.00003	0.23	0.02	6.13	0.15	3055	432
120 dana	0.015	0.003	1933.4	254.8	0.00026	0.00003	0.23	0.03	6.15	0.11	2868	318
210 dana	0.017	0.005	1978.8	205.7	0.00025	0.00003	0.23	0.02	6.13	0.10	3017	287
300 dana	0.018	0.003	2163.3	316.5	0.00026	0.00008	0.24	0.02	5.99	0.14	3203	502
390 dana	0.016	0.004	1938.4	211.9	0.00026	0.00003	0.23	0.03	6.08	0.19	3013	414

## **4. DISKUSIJA**

### **4.1. Fraktalna analiza u eksperimentalnoj i kliničkoj fiziologiji**

Fraktalna analiza predstavlja savremenu i egzaktnu metodu sa širokom primenom kako u molekularnoj i celularnoj fiziologiji, tako i u kliničkim naukama (Hotta et al. 2005; Di Ieva et al. 2012; Silva et al. 2012). Koristi se za merenje kompleksnosti bioloških struktura kao što su tkiva i individualne ćelije i njihove organele. Na tkivnom nivou, uz pomoć ove metode je moguće kvantifikovati potencijalne promene u tkivnoj arhitekturi koje nastaju bilo pod uticajem nekog fiziološkog mehanizma, bilo kao posledica patološkog procesa (Lin, 2012). Na celularnom nivou, fraktalna analiza se koristi za procenu finih strukturnih promena u ćelijskoj organizaciji koje se ne mogu detektovati standardnom optičkom ili elektronskom mikroskopijom (Silva et al. 2012; Losa & Casteli 2005).

U osnovi, fraktalna analiza se koristi za opisivanje i kvantifikovanje onih struktura i pojava na koje se standardna pravila klasične, Euklidske geometrije teško mogu primeniti (Loh et al. 2012a; Loh et al, 2012b; Losa & Casteli 2005; Silva et al. 2012; Lin, 2012; Tan et al. 2009). Na primer, prosti geometrijski oblici kao što su krug, kvadrat i pravougaonik se lako mogu opisati merenjem, odnosno računanjem veličina kao što su dužina, širina, obim, površina itd. Sa druge strane, mnoge biološke strukture kao što su tkivo i ćelija, se odlikuju suviše velikim stepenom kompleksnosti da bi klasične mere Euklidske geometrije bile dovoljne za adekvatnu morfološku i citološku analizu.

Postoji nekoliko tipova, odnosno nivoa fraktalne analize: određivanje fraktalne dimenzije, analiza lakunarnosti i multifraktalna analiza. Fraktalna dimenzija je najznačajnija mera strukturne kompleksnosti sa širokom primenom u skoro svim biološkim i medicinskim disciplinama (Losa & Casteli 2005; Silva et al. 2012; Lin, 2012; Tan et al. 2009; Monti et al. 2010).

U kliničkoj praksi, fraktalna dimenzija je do sada uspešno primenjena za kvantifikovanje i analizu varijabilnosti srčanog ritma (Tan CO et al. 2009), za dijagnostiku određenih oftalmoloških oboljenja (Karperien A et al. 2008a), za in vitro detektovanje i opisivanje kancerskih ćelija (Kam Y, 2009), i u neuronaukama za analizu glijalnih ćelija kod Alchajmerove bolesti, šizofrenije i afektivnog poremećaja (Karperien A et al. 2008b).

Postoji nekoliko metoda određivanja fraktalne dimenzije: Box-counting metoda, diferencijalna Box-counting metoda, "Extended counting", metoda korišćenjem frakcionalno Brovnianog kretanja, variogramaska metoda, Isarithm metoda i Triangular prism metoda. Box-counting metoda, koja je upotrebljena i u našoj studiji, se danas najčešće koristi jer je pokazala najveći stepen senzitivnosti i specifičnosti, barem kada je u pitanju analiza digitalnih mikrografa i ostalih dvodimenzionalnih površina (Losa & Casteli 2005; Silva et al. 2012; Lin, 2012; Tan et al. 2009; Monti et al. 2010).

Box-counting metoda je prvi put uvedena od strane Russel i saradnika 1980. godine. Njena osnovna karakteristika, a istovremeno i nedostatak je to što zahteva binarizaciju ulaznog signala (Russel et al. 1980). Kada je u pitanju analiza digitalnih migrografa, što je u osnovi našeg rada, to u praksi znači da svaka slika pre fraktalne obrade treba da bude konvertovana u binarni format. Tehnički, binarno

konvertovanje je jednostavna operacija koja je integrisana u većinu savremenih programa za obradu slike (kao što je ImageJ Nacionalnog instituta za zdravlje); međutim, tokom samog procesa konvertovanja slike bioloških struktura kao što je hromatin, uvek postoji opasnost da bitni detalji slike izmene u tolikoj meri da to kasnije utiče na vrednost fraktalne dimenzije.

Diferencijalna box-counting metoda predstavlja adaptaciju standardne box-counting metode u kojoj je izbegnuta binarizacija signala, već se celokupna analiza obavlja na crno-belim (gray scale) slikama. Predložena je od strane Chaudhuri i Sarkara 1995. godine (Chaudhuri and Sarkar, 1995). Iako ova modifikacija otklanja značajne nedostatke binarizacije, neki autori (Asvestas et al. 1998) veruju da je ona numerički manje stabilna i da su vrednosti fraktalne dimenzije dobijene na ovaj način manje od realnih.

U našoj studiji, vrednosti fraktalne dimenzije su uz pomoć FracLac potprograma u okviru ImageJ dobijene standardnom box-counting metodom kod svih bioloških struktura (hromatin i tkivo) koje su bile obojene nekom od histoloških boja (Hematoksilin-Eozin, toluidin plavo, Gimza i AZAN bojenje). Diferencijalna box-counting metoda je korišćena samo kod nativnih mikrografa u in vitro eksperimentu, imajući u vidu je binarizacija neobojenog jedra nepraktična i da se ovim procesom gubi veliki deo (preko 90%) vidljive hromatinske strukture. Vrednosti hromatinske fraktalne dimenzije u ovom slučaju su očekivano bile manje nego kod obojenih preparata.

Tokom standardne obrade digitalnih mikrografa, fraktalna dimenzija u mnogome zavisi od količine detalja na analiziranoj slici (Chappard et al. 2001). Stoga je važno da svi mikrografi budu napravljeni u istoj rezoluciji i pod istim uslovima kao što su

osvetljenost, odnosno ekspozicija. Takođe, kod analize histoloških preparata, potrebno je da svi tkivni isečci budu iste debljine (u ovom radu su korišćeni isečci standardne debljine 5 mikrometara) i obojeni na isti način.

U našoj studiji, u zavisnosti od vrste tkiva korišćena su do četiri različite tehnike bojenja: Hematoksilin-Eozin, toluidin plavo, Gimza i AZAN bojenje. Različita bojenja korišćena su iz nekoliko razloga. Kao prvo, detektovano smanjenje tkivne kompleksnosti više od jednog bojenja potvrđuje validnost studije i čini dobijene rezultate naučno više vrednim. Drugo, s obzirom da se pojedine tkivne strukture na jednom bojenju prikazuju bolje nego na drugom, logično se nameće zaključak da je detektovano smanjenje kompleksnosti na svim tehnikama bojenja posledica strukturalnih promena koje se dešavaju na više nivoa. Tipičan primer u našoj studiji je bubreg gde detektovano smanjenje kompleksnosti na tkivu obojenom toluidin plavo metodom, koje nije bilo prisutno na AZAN bojenju ukazuje da se strukturne promene vezane za starenje dešavaju više na celularnom, hromatinskom nivou (toluidin plavo tehnika je efikasna u bojenju nukleinskih kiselina u jedru nefrocita) nego u ekstracelularnim strukturama kao što je glomerularna bazalna membrana (AZAN bojenje posebno dobro prikazuje ekstracelularni matriks).

Pored fraktalne dimenzije, još jedan od značajnih pokazatelja strukturne kompleksnosti u biologiji i biofizici predstavlja lakunarnost (Torres-Mejía et al. 2005). Lakunarnost je indikator postojanja praznina (engl. "gappiness"), odnosno pokazatelj u kojoj meri određena struktura, odnosno fraktal ispunjava prostor. Lakunarnost je indirektni pokazatelj heterogenosti biološke strukture: što je tkivo, odnosno hromatin homogeniji - njegova lakunarnost je manja. U poređenju sa



fraktalnom dimenzijom, u ćelijskoj biologiji i histologiji, lakunarnost je mnogo manje istražen parametar i za sada ne postoji nijedna publikacija koja je ispitala potencijalne promene tkivne i celularne lakunarnosti tokom starenja.

Naši rezultati ukazuju da u nekim hromatinskim strukturama gde se fraktalna dimenzija smanjuje, lakunarnost se povećava i obrnuto. U mnogim ispitivanim jedrima poput onih u ćelijama makule denze, detektovana je statistički značajna negativna korelacija između ova dva parametra. Na osnovu ovoga možemo pretpostaviti da veličina i broj praznina u hromatinskoj strukturi značajno utiče na sveukupnu hromatinsku kompleksnost. Ova pretpostavka bi bila u saglasnosti sa nalazima drugih autora koji su takođe detektovali postojanje pomenute negativne korelacije (Yasar & Akgünlü, 2005)

U našoj studiji korišćen je još jedan indirektni pokazatelj heterogenosti: GLCM inverzni momenat razlike (inverese difference moment, IDM). Inverzni momenat razlike se često u stručnoj literaturi poistovećuje sa pojmom "teksturalna homogenost". IDM nije direktno povezan sa fraktalnim osobinama neke strukture, odnosno za sada nema dokumentovanih nalaza da je IDM u bilo kakvoj korelaciji bilo sa vrednostima fraktalne dimenzije, bilo lakunarnosti. Naši rezultati pokazuju da u svim strukturama u delu studije na oglednim životinjama gde se sa starenjem smanjivala vrednost fraktalne dimenzije, ili povećavala vrednost lakunarnosti, veličina inverznog momenta nije trpela statistički značajne promene.

## **4.2. Fraktalni parametri kao potencijalni indikatori strukturnih promena u hromatinu nakon UV tretmana**

U *in vitro* delu naše studije ispitivali smo strukturne promene u hromatinu ćelija nakon tretmana UV zračenjem. Ćelijska kultura kancerskih glijalnih ćelija linije U251 je bila izložena pulsu UVB zračenja, a nakon toga, uzorak od 32 ćelije (vezani uzorak) je praćen kroz seriju vremenskih tačaka (ukupno je bilo 12 vremena računajući kontrolnu tačku-pre tretmana). Naši rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje jedarne lakunarnosti već neposredno nakon tretmana. Sa druge strane fraktalna dimenzija je ostala približno ista, odnosno nije bilo statistički značajne razlike između pojedinačnih vremenskih tačaka. Prema našim podacima, ovo je prva studija u svetu koja je pored fraktalne dimenzije hromatina odredila i promene lakunarnosti nakon tretmana agensom koji indukuje apoptozu.

Losa i Casteli (2005) su u svom radu imali sličan pristup u smislu uvođenja kancerskih ćelija u programiranu ćelijsku smrt i računanja fraktalne dimenzije u različitim vremenskim tačkama tokom rane apoptoze (Losa & Castelli, 2005). Za razliku od naše studije, ovde su ćelije tretirane proapoptotskim hemijskim agensom kalcimicinom u dozi od 1  $\mu\text{M}$  koja izaziva apoptozu u roku od 72h što je znatno duži vremenski period nego u našem radu. Takođe, analiza hromatina ćelija je rađena uz pomoć elektronske mikroskopije i korišćenjem specijalnog bojenja, što je još jedna značajna razlika u odnosu na našu metodologiju. Autori su zaključili da postoji generalizovano i održivo smanjenje hromatinske fraktalne dimenzije koje nastupa pre nego što konvencionalne tehnike za detekciju apoptoze pokažu da je u ćelijskoj kulturi započet proces programirane ćelijske smrti. Kao tehnike zlatnog

standarda, korišćene su Annexin-V bojenje, TUNEL test (TdT-mediated dUTP nick end labelling assay), i analiza sub G faze ćelijskog ciklusa.

Postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja zašto u našoj studiji nije nađeno statistički značajno smanjenje fraktalne dimenzije jedarne strukture (za razliku od lakunarnosti). Prvo, moguće je da kod nativnih, nebojenih preparata i kultura koje se analiziraju invertnim mikroskopom, promene u hromatinu, zbog nedostatka odgovarajućeg bojenja nisu detektabilne određivanjem fraktalne dimenzije. Drugo, vrednosti fraktalne dimenzije ultrastrukture hromatina nakon elektronske mikroskopije ne moraju obavezno da koreliraju sa fraktalnom dimenzijom nakon optičke mikroskopije.

U nekoj budućoj studiji koja bi se bavila ispitivanjem uticaja UV zračenja na hromatinsku arhitekturu, bilo bi interesantno primeniti dve strategije. Prvo, pre i nakon UV iradijacije, od odgovarajućih uzoraka kancerskih ćelija mogli bi da se naprave obojeni preparati i analiziraju svetlosnim mikroskopom. Druga strategija bi podrazumevala ultrastrukturnu analizu elektronskim mikroskopom. Glavni nedostatak oba ova pristupa u poređenju sa našom studijom bio bi nemogućnost pravljenja vezanog uzorka (odnosno posmatranja iste grupe ćelija kroz vremenske intervale). Ovo bi se moglo prevazići pravljenjem više nezavisnih uzoraka od npr. nekoliko stotina ćelija i odgovarajućom statističkom analizom.

Detektovane promene lakunarnosti u našoj studiji predstavljaju značajan rezultat imajući u vidu da su one nastupile pre nego što su konvencionalne citofluorometrijske tehnike (DNK fragmentacija, aneksin-propidium jodid bojenje) detektovale početak apoptotskog procesa. Promena lakunarnosti je detektovana već neposredno nakon UV tretmana: registrovano je statistički značajno smanjenje

lakunarnosti. Ovo smanjenje postalo je statistički visoko značajno 30 minuta i jedan sat nakon tretmana. U poređenju sa tim, sve citofluorometrijske analize za procenu apoptoze sa izuzetkom analize aktivnosti kaspaza postale su pozitivne tek dva sata nakon iradijacije. Ovaj rezultat ukazuje da je lakunarnost jedra kao parametar potencijalno senzitivniji od postojećih metoda zlatnog standarda za detekciju apoptoze prouzrokovane UV zračenjem.

Fraktalna analiza u ćelijskoj biologiji kao metoda ima nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalne citofluorometrijske tehnike. Za određivanje vrednosti fraktalne dimenzije i lakunarnosti nije potrebno ni približno materijalnih i ljudskih resursa kao za protočnu citofluorometriju. U našoj studiji za digitalni mikrografi su napravljeni korišćenjem invertnog mikroskopa sa ugrađenom digitalnom kamerom visoke rezolucije. Fraktalna i teksturalna analiza obavljena je uz pomoć softvera Nacionalnog instituta za zdravlje (SAD) koji se nalazi na javnom internet domenu (public domain) i stoga je slobodno dostupan za preuzimanje. U poređenju sa resursima potrebnim za funkcionisanje protočnog citofluorometra, troškovi fraktalne analize su višestruko manji što je čini veoma atraktivnom metodom naročito za laboratorije koje se nalaze u zemljama u razvoju.

Da bi se potvrdila visoka senzitivnost fraktalne analize u detekciji apoptoze u poređenju sa konvencionalnim metodama u ćelijskoj biologiji, u budućnosti će biti potrebno sprovesti seriju eksperimenata na različitim ćelijskim kulturama. Takođe će biti neophodno tretirati ćelijske kulture i drugim proapoptotskim agensima, a ne samo UV zračenjem.

### 4.3. Teksturalna analiza u eksperimentalnoj i kliničkoj fiziologiji

Teksturalna analiza predstavlja skup metoda kojima se kvantifikuju parametri teksture nekog objekta. Počela je da se široko koristi krajem dvadesetog veka u raznim naučnim oblastima. U medicinskim naukama, teksturalna analiza je danas veoma značajan dodatak tzv. sistemima za kompjuterski potpomognutu dijagnostiku (Computer aided diagnostic systems-CAD). Ovi sistemi su posebno važni u savremenoj radiološkoj dijagnostici nakon analize kompjuterizovanom aksijalnom tomografijom (CT) i nuklearnom magnetnom rezonancom (NMR). Teksturalna analiza je do sada uspešno primenjena za razlikovanje benignih od malignih tumora, za određivanje granica između zdravog i patološki promenjenog tkiva, kao i u histologiji za procenu citoarhitektonike (Castellanos et al. 2011; Chen et al 2012; Linder et al. 2012; Joseph et al. 2011; Harrison et al. 2011; Baum 2012).

Bez obzira na primenjenu tehniku za dobijanje teksturalnih parametara, teksturalna analiza predstavlja važan dodatak fraktalnoj analizi. Parametar kao što je fraktalna dimenzija, iako veoma važan za razumevanje i opisivanje složenih objekata, ipak je u osnovi samo kvantifikacija kompleksnosti posmatranog fizičkog ili biološkog sistema (u našem radu digitalnog mikrografa). Teksturalni GLCM parametri kao što su entropija, inverzni momenat razlike i kontrast u nekim slučajevima mogu da daju još preciznije informacije o tome na koji način se kompleksnost sistema povećava ili smanjuje. U tom pogledu posebno važan parametar je entropija koja je mera neuređenosti sistema, odnosno jedinica rezolucije (piksela) kod digitalnih mikrografa.

Kod GLCM metode, potrebno je imati u vidu da postoje određene razlike između koncepta GLCM (teksturalne) entropije sa jedne strane i koncepta termodinamske entropije sa druge strane. Termodinamska entropija je u osnovi logaritamska mera tzv. gustine stanja (engl. Density of states) i računa se uz pomoć Bolcmanove jednačine:

$$S = k \log W$$

Gde je  $k$  Bolcmanova konstanta ( $1.380062 \times 10^{-23}$  J/kelvin) a  $W$  predstavlja broj mikrostanja sistema u određenom makrostanju. Drugim rečima, što je broj mikrostanja sistema veći, to će i entropija kao mera neuređenosti sistema biti veća. Ova formulacija važi za sve sisteme, bilo da su oni mehanički, hemijski ili biološki (Lai et al. 2012; Wang et al. 2012; Fritsche et al. 2012; Singharoy et al. 2012).

Teksturalna GLCM entropija se sa druge strane računa na sledeći način:

$$Entropy = - \sum_i \sum_j p(i,j) \log(p(i,j))$$

gde su  $i$  i  $j$  koordinate GLCM matriksa za određeni direkcioni ugao ( $0^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $90^\circ$  ili  $135^\circ$ ) i razmak između jedinica rezolucije. Primećujemo da su obe gore date jednačine zasnovane na logaritamskoj skali. Međutim, važna razlika između ova dva koncepta entropije je ta što GLCM

entropija meri neuređenost jedinica rezolucije (piksela) na digitalnim mikrografima (koji su prethodno konvertovani u 8-bitni format i obrađeni u GLCM matriksu) dok je termodinamska entropija mnogo širi pojam i odnosi se na neuređenost fizičkog sistema u smislu broja mikrostanja od kojih svako od mikrostanja ima jasno definisanu verovatnoću postojanja (Bai et al. 2008; Meirovitch et al. 2009; Fritsche et al. 2012).

Kad su u pitanju hromatin ili tkivo kao biofizički sistemi, njihova prava termodinamska entropija, iako postoji kao pojam, je nemoguća za merenje, odnosno, barem do sada ne postoji tehnologija (metoda) kojom bi se ona mogla kvantifikovati. Ipak, treba imati u vidu da svetlosna mikroskopija i digitalni mikrografi koji se uz pomoć nje prave daju relativno puno informacija o strukturnoj organizaciji (arhitekturi) posmatranog i analiziranog objekta, a pošto strukturalna organizacija bilo kog sistema značajno utiče na entropiju istog, možemo da pretpostavimo da je GLCM entropija u određenoj, a možda čak i jakoj pozitivnoj korelaciji sa Bolcmanovom entropijom. Ipak, ovo je samo pretpostavka čiju tačnost bi bilo potrebno ispitati u nekoj budućoj studiji, bilo na biološkom ili čisto fizičkom sistemu.

Još jedan od posebno važnih GLCM parametara je inverzni momenat razlike (inverse difference moment, IDM). U stručnoj literaturi često nazivan terminom "homogenost", ovaj parameter je mera koncentracije vrednosti jedinica rezolucije u odnosu na dijagonalu GLCM matriksa (Mayerhoefer et al. 2010; Pantic et al. 2012d). Inverzni momenat razlike je u jakoj negativnoj korelaciji sa GLCM kontrastom koji je pokazatelj razlike u sivim vrednostima dve susedne rezolucione jedinice. U *in vitro* delu naše studije detektovano je statistički značajno smanjenje kako celularnog, tako i nukleusnog IDM-a.

Procena inverznog momenta razlike tkiva ćelija ima potencijalno veliki naučni značaj, pošto određene strukturne promene tkiva vezane za starenje, kao što je atrofija i zamena funkcionalnog tkivnog parenhima fibroznim vezivnim tkivom mogu u pojedinim slučajevima značajno uticati na stepen homogenosti dobijenog mikrografa (Gaudio et al. 2005; Shamir et al. 2009; Pantic & Pantic, 2012). Na celularnom nivou, takođe, poznato je da početni stadijumi apoptoze (koja je u našem radu nastupila kao krajnja posledica UV tretmana na ćelijskoj kulturi) dovode do strukturnih promena u hromatinu koje se manifestuju kondenzacijom i marginalizacijom hromatina. U našem prethodno publikovanom radu na preparatima limfocita slezine obojenih Gimza tehnikom, sugerirali smo da se ove promene mogu odraziti kako na inverzni momenat razlike hromatina, tako i na angularni drugi momenat i entropiju. U tom svetlu, određivanje IDM-a GLCM metodom se može smatrati važnim i u smislu definisanja i testiranja alternativnih metoda za detekciju finih strukturnih promena na ćelijskom nivou tokom procesa starenja i apoptoze. Računanje IDM-a, kao uostalom i cela GLCM metoda je brzo izvodljivo sa velikim stepenom reproducibilnosti i ukoliko bi se pokazalo dovoljno senzitivnim i specifičnim u detektovanju određenih molekularnih procesa u ćeliji, postalo bi vredan dodatak a možda jednog dana i zamena za postojeće metode ćelijske biologije koje se primenjuju u ispitivanju promena na ćelijskim kulturama.

Haralick i saradnici (1973) su u svom radu o GLCM matriksu definisali ukupno 14 različitih parametara: angularni drugi momenat (Angular second moment), GLCM kontrast, GLCM korelaciju, varijansu, sumu varijanse (sum variance) sumu kvadrata varijanse (sum of squares variance), varijansu razlike (difference variance), entropiju, sumu entropije (sum entropy), entropiju razlike (difference entropy),



inverzni momenat razlike, informacione mere korelacije (information measures of correlation, dva parametra) i maksimalni koeficijent korelacije. Koje od navedenih parametara će istraživač koristiti u svojoj studiji zavisi u mnogome od karakteristika analiziranog objekta. Na primer u geološkim disciplinama, pri analizi topografije tla (Warnick et al. 2006) od posebne važnosti je ispitivanje GLCM varijanse i korelacije. U medicinskim i biološkim istraživanjima, pregledom literature ustanovili smo da su najčešće određivani parametri za procenu teksture biološkog materijala entropija, angularni drugi momenat, kontrast, korelacija, varijansa i inverzni momenat razlike (Castellanos et al. 2011; Chen et al. 2012; Linder et al. 2012; Joseph et al. 2011; Harrison et al. 2011; Baum 2012). Mi smo se u našoj studiji opredelili za određivanje upravo ovih šest pokazatelja teksture na svim analiziranim tkivima i hromatinskim strukturama.

#### **4.4. Potencijalna primena GLCM metode u kliničkim naukama**

Kao što je gore navedeno, do sada je uloženo mnogo napora u cilju integracije GLCM metode u kompjuterizovane sisteme za dijagnozu (CAD), kao dodatak postojećim tehnikama u radiologiji. Kod dijagnostike nuklearnom magnetnom rezonancom (NMR), pokazano je da teksturalna analiza NMR mapa relaksacije zasnovana na GLCM matriksu može da bude korisna u evaluaciji razvoja i napredovanja osteoartritisa (Carballido-Gamio et al. 2008; Li et al, 2009). U nedavnoj studiji objavljenoj 2011 godine, pokazano je da zdravi ispitanici sa povećanim rizikom za osteoartritis imaju značajno izmenjene GLCM parametre NMR snimaka, što ukazuje da ovaj metod nije primenjiv samo

u proceni napredovanja razvijenog osteoartritisa, već je potencijalno dragocena za procenu rizika nastanka reumatoloških bolesti kod zdrave populacije (Joseph et al. 2011).

U neurologiji, GLCM metoda je uspešno korišćena za analizu moždanih NMR snimaka pacijenata sa blagim oblikom Alchajmerove bolesti praćenog niskim stepenom kognitivnog oštećenja (De Oliveira et al. 2011). Teksturalni parametri moždanih struktura poput korpus kalozuma i talamusa bili su drugačiji u odnosu na kontrolnu grupu pacijenata (de Oliveira i sar. 2011). Ovi rezultati su pokazali potencijalni značaj teksturalne analize u skriningu Alchajmerove bolesti i evaluaciji efekata primenjene terapije.

NMR teksturalna analiza uz pomoć GLCM matriksa je takođe predložena kao vredan dodatak najčešće korišćenih metoda za rano otkrivanje multiple skleroze. Kombinovana upotreba svih funkcija teksturalne analize je pokazala odličan potencijal u diskriminaciji sklerotičnih lezija u beloju masi mozga (Zhang et al. 2008). Rezultati ove studije su podržani nalazima Harison et al. (2010) koji pokazuju da teksturalna analiza signala magnetne rezonance u multiploj sklerozi ima visoku senzitivnost i tačnost u diskriminaciji između zdravih i patološki izmenjenih delova moždanog parenhima (Harrison et al. 2010).

GLCM analiza je takođe uspešno primenjena u istraživanjima raka dojke, kao dodatak često korišćenim dijagnostičkim radiološkim tehnikama, kao što je digitalna mamografija. GLCM se danas smatra korisnim za klasifikaciju tkiva dojke (razlikovanje zdravog tkiva od kancerski izmenjenog) (Mascaro et al. 2009).

U studiji Mohd Khuzi i saradnika, specifičnosti GLCM teksture su korišćene da se razvije tzv. "Drvo odluka" (decision tree) u donošenju dijagnostičkih zaključaka što je dovelo do smanjenja vremena koje je potrebno da se otkrije postojanje tumorske mase u dojci. Po mišljenju autora, ovi rezultati bi mogli dovesti do dizajniranja automatizovanog dijagnostičkog sistema za otkrivanje raka dojke koji funkcionišu u realnom vremenu (Mohd Khuzi et al. 2009).

Pored mamografije, GLCM metoda je takođe uspešno integrisana u ultrazvučnim (Alvarenga et al. 2007; Čen et al. 2007) i NMR snimanjima tumora dojke. Alvarenga i saradnici su ukazali da je teksturalni GLCM kontrast najvrednija GLCM karakteristika koja može da razlikuje maligne od benignih tumora dojke u ultrazvučnim slikama (Alvarenga et al. 2007).

Međutim, GLCM kao metod za analizu teksture u kliničkoj radiologiji, u pojedinim slučajevima ima izvesna ograničenja. Kao što je ranije pomenuto, rezultati teksturalne analize često značajno zavise od smera (ugla) matrice, kao i rastojanja između dva piksela u analiziranim parovima rezolucionih jedinica. U nedavnom radu, Rangaiian i saradnici su analizirali naučnu vrednost GLCM tehnike na 111 uzoraka tumora dojke (65 benigna i 46 malignih tumora). Zaključeno je da rezultati mogu znatno da variraju u zavisnosti od rezolucije slike, kao i GLCM pravca i udaljenosti piksela (Rangaiian et al. 2010). Razumno je pretpostaviti da se ova ograničenja ne odnose samo na mamografiju, nego da postoje i drugim kliničkim i predkliničkim aplikacijama GLCM metode.

U pulmonarnoj radiologiji, predloženo je da se senke u plućima tipa "mlečno staklo" (ground-glass opacity GGO nodules) u kompjuterizovanoj tomografiji (čvorici koji su obično dovođeni u vezu

sa atipičnom adenomatoznom hiperplazijom, karcinomom bronha odnosno bronhioloalveolarnim adenokarcinomom), mogu efikasno otkriti računanjem GLCM teksturalne homogenosti suspektnih regiona (Park et al. 2011). Ako se ovi rezultati budu potvrdili u nekoj budućoj studiji, može se očekivati da će to dovesti do značajnih poboljšanja osetljivosti metoda koje se trenutno koriste za dizajniranje kliničkih protokola jer standardna tomografska analiza je za sada u velikoj meri neefikasna u otkrivanju GGO čvorića (Funama et al. 2009; Park et al. 2011).

Konačno, GLCM tehnika se takođe uspešno primenjuje u koštanom radiografskom snimanju. Huber i saradnici (2009) su nakon analize trabekularne kosti tokom radiografije proksimalnog femura zaključili da bi GLCM teksturalni parametri koštane strukture mogli biti dragoceni za predviđanje kvaliteta koštanog tkiva pre hirurške intervencije (Huber et al. 2009). Diederichs i saradnici su predložili da GLCM i druge metode teksturalne analize, kada se kombinuju sa parametrima koštane mineralne gustine (Bone Mineral Density) za procenu trabekularne kosti, mogu da poboljšaju procenu koštane snage i pomognu u predviđanju budućih preloma kostiju (Diederichs et al. 2009).

Osim pomenutih aplikacija, GLCM teksturalna analiza je intenzivno ispitivana u kardiovaskularnoj medicini (Vins et al. 2000), kao i vizuelizaciji kancerskog tkiva nakon snimanja pozitronskom emisionom tomografijom (PET) (Galavis et al. 2010). Ovi i drugi istraživački naponi su pokazali da GLCM metoda u budućnosti može postati sastavni deo mnogih kliničkih sistema kompjuterski potpomognute dijagnostike, odnosno da značajno poboljša njihove performanse. Međutim, uvek treba imati u vidu da je teksturalna

analiza relativno nova naučna oblast. Većina naučnih studija u vezi sa GLCM metodom opisanog u ovoj disertaciji je sprovedena i publikovana tokom poslednjih 5 godina. Zato pretpostavljamo da će dodatna istraživanja biti neophodna kako bi se istražila senzitivnost i specifičnost GLCM metode u poređenju sa trenutnim tehnikama zlatnog standarda koja se koriste u okviru sprovođenja kliničkih dijagnostičkih testova.

#### **4.5. Teksturalna analiza u fundamentalnim medicinskim istraživanjima za procenu strukturalne organizacije tkiva i ćelija**

Iako je do sada bilo relativno malo studija u vezi sa mogućom primenom GLCM metode ćelijskoj biologiji i histologiji, početni rezultati su obećavajući, i definitivno će podstaći dalja istraživanja u ovim oblastima.

Godine 2005, Losa i Castelli su iskoristili GLCM teksturalnu analizu za kvantifikovanje strukturne arhitekture i kompleksnosti hromatina u izolovanim ćelijama kancera dojke u toku apoptoze (programirane smrti ćelija). Ćelije koje su se nalazile u ranoj apoptozi (tretirani sa hemijskim proapoptotskim agensom) imale su statistički značajan porast vrednosti hromatinske entropije, GLCM korelacije, GLCM varijanse, zbira varijanse, i još nekih parametara vezanih za teksturalnu korelaciju (Losa & Castelli, 2005). Ovi rezultati ukazuju da GLCM kao metod može da detektuje i kvantifikuje strukturnu kao i ultrastrukturnu reorganizaciju nuklearnog hromatina (kondenzacija, marginalizacija, DNK fragmentacija itd) već 24 sata nakon indukovanja programirane ćelijske smrti.

Losa i Caselli su u svom radu takođe ukazali da bi GLCM metoda mogla da bude u nekim slučajevima i mnogo osetljivija od konvencionalnih metoda molekularne biologije (metoda zlatnog standarda) za otkrivanje i procenu apoptoze. Neke od ovih metoda, kao što su analiza G0/G1 podfaze ćelijskog ciklusa (cell cycle sub G0/G1 peak) i TUNEL metod (TdT-mediated dUTP nick end labelling assay) su u studiji uspele da detektuju apoptozu tek 48 časova nakon tretmana proapoptotskim agensom, dok su ostale tehnike, kao što su aneksin V bojenje bile u stanju da detektuju apoptozu tek nakon 72 časa (Losa & Castelli, 2005).

Potencijalna naučna vrednost gore navedenih rezultata je ogromna. Ne samo da je studija Lose i Caselija pokazala da GLCM metoda može biti senzitivnija od poznatih tehnika ćelijske biologije, već i sam dizajn ovog rada naglašava mogućnost jednostavnog i efikasnog načina da se pojedinačne ćelije i njihove organele prate u unapred određenom vremenskom periodu.

Na primer, u budućnosti bi mogla da se dizajnira studija tokom koje bi ćelijska kultura mogla biti kontinuirano praćena u tzv. realnom vremenu (real time) uz pomoć invertnog mikroskopa (uveličanje 400x) i digitalne kamere visoke rezolucije, a nakon tretmana određenom supstancom. Korišćenjem slobodno dostupnih kompjuterskih programa za obradu slike (kao što je softver NIH Image J), uz određene modifikacije, za svaku ćeliju u ispitivanom urozku (vezani uzorak) mogli bi se odrediti fraktalni i GLCM parametri, kao i mnogi standardni morfometrijski parametri. Rezultati dobijeni na ovaj način bi verno oslikavali dešavanja u ćeliji i njenim organelama ne samo u pojedinim vremenskim tačkama, već u svakom delu posmatranog perioda. Takođe,

jedna od glavnih prednosti ovog pristupa bi bila u tome što on ne bi zahtevao značajne materijalne resurse.

Još jedna potencijalno važna primena GLCM metode je kvantifikacija strukturne organizacije i citoarhitektonike (citoarhitekture) tkiva. U nedavnoj studiji, Shamir i saradnici su uz pomoć ove metode merili teksturalnu entropiju mišićnog tkiva na eksperimentalnom animalnom modelu *Caenorhabditis elegans* u životinja starosti 0, 2, 4, 6, 8, 10 i 12 dana kao i kod adultnih formi (Shamir et al. 2009). Studija je urađena na digitalnim mikrografima mišićnog tkiva na utorku od 50 životinja, a rezultati su pokazali da se teksturalna entropija povećava sa starenjem na način koji korelira sa prethodnim nalazima ekspresije pojedinih gena (Shamir et al. 2009). Autori su ukazali da teksturalna entropija kao indikator strukturne neuređenosti tkivne arhitekture, kao i drugi parametri GLCM analize, može biti korisna u kvantifikaciji promena koje su u vezi propadanjem i degradacijom tkiva tokom procesa starenja. *Caenorhabditis elegans* je poznati eksperimentalni animalni model na kome su uražene brojne histološke studije, međutim, smatramo da je korisno da se istraži da li su iste zakonitosti koje su detektovali Shamir i saradnici prisutne i u drugim životinjskim vrstama (naročito kičmenjacima poput miševa, pacova, zamorčica itd.).

U svetlu ovih nalaza, u našoj studiji pored GLCM analize ćelijskog hromatina, urađena je i GLCM analiza tkivne arhitekture za sva ispitivana tkiva. Za razliku od gore navedene studije, naši rezultati ukazuju da se u parenhimatoznim organima (kako limfoidnim, tako i nelimfoidnim) vrednosti entropije i drugih GLCM parametara ne menjaju značajno sa starenjem. Ovo je u kontrastu sa rezultatima vezanim za fraktalnu analizu koji pokazuju da se vrednost fraktalne

dimenzije smanjuje sa starenjem u skoro svim tkivima i nakon svih histoloških bojenja (uz nekoliko izuzetaka).

GLCM metod u smislu kvantifikacije tkivne arhitekture je takođe uspešno primenjena u klasifikaciji strukturalne organizacije kolagena i drugih proteina koji ulaze u sastav kože nakon multifotonske mikroskopije (Cicchi et al. 2010). Autori ove studije su predložili GLCM metodu kao sredstvo za procenu geometrijskog rasporeda kolagenih vlakana dermisa u fiziološkim i patološkim uslovima. Takođe je istaknuto da teksturalna analiza može biti od pomoći u boljem razumevanju procesa regeneracije i reparacije oštećenog tkiva, kao i dijagnoza raznih oboljenja koja zahvataju vezivno tkivo. Ova studija je istakla klinički značaj GLCM mikroskopske analize vezivnog tkiva koja bi mogla imati široke implikacije na buduće istraživanja u različitim granama interne medicine.

#### **4.6. Kompleksnost bioloških struktura i starenje**

Naša studija je u svom delu na oglednim životinjama pokazala statistički značajno smanjenje strukturne kompleksnosti merene vrednostima fraktalne dimenzije u većini analiziranih tkiva, kada su se starosne grupe životinja uporedile sa grupom novorođenih miševa. Ovaj rezultat je u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da biološke strukture tokom starenja, bilo kao posledica poremećene međucelijske komunikacije, bilo zbog promena u samim ćelijama gube kako strukturnu, tako i funkcionalnu kompleksnost (Lipstz & Goldberger, 1992; Lipsitz 2004; Shamir et al. 2009;).



Prema našim podacima, jedna o prvih teorija o potencijalnoj primeni fraktala i teorije haosa radi analize starosnih promena u biološkim sistemima postavljena je od strane naučnika Lewis Lipstz-a i Ary Goldberger-a 1992. godine. Autori su se u ovom radu fokusirali pre svega na potencijalne promene tzv. funkcionalne kompleksnosti u fiziološkim procesima kao što su varijabilnost srčane frekvence, tonus simpatikusa i parasimpatikusa, i neuroendokrine funkcije. Pored ostalog implicirano je da bi značajne promene mogle da se nađu u fraktalnoj analizi elektrokardiograma, elektroencefalograma, kao i regulacije hormonalne sekrecije adenohipofize (Lipstz & Goldberger, 1992).

Kad je u pitanju strukturna kompleksnost, Lipstz i Goldberger su su ukazali na već ranije detektovan gubitak kompleksnosti neuronskih dendrita (preko analize njihovog granjanja; Scheibel, 1985), kao i histološke promene u arhitekturi trabekularne kosti (Mosekilde, 1988). Predloženo je da se fraktalna analiza i teorija haosa primene kao potencijalni dodaci postojećim metodama u fundamentalnim medicinskim istraživanjima i kliničkoj praksi.

Od 1992. godine do danas, publikovano je više stotina radova u prestižnim međunarodnim časopisima u kojima su istraživači aplikovali fraktalnu geometriju na biološke strukture, bilo da je u pitanju individualna ćelija ili celokupno tkivo. Veliki procenat ovih studija je baziran na humanom materijalu, gde su fraktalna dimenzija i ostali parametri strukturne kompleksnosti korišćeni da kvantifikuju razlike između mlade i stare populacije u tkivnoj arhitekturi u određenim patološkim stanjima (Copley et al. 2012; Azemin et al. 2012). Prema dostupnim podacima, naša studija je prva koja je pored analize strukturne kompleksnosti tkiva u starenju, analizirala i starosne

promene kompleksnosti u individualnim ćelijama, odnosno njihovom genetskom materijalu.

#### **4.7. Strukturne promene u hromatinu tokom starenja**

Hromatin, kao i svi ostali makromolekuli u humanom i animalnom organizmu je podložan delovanju različitih fizičkih i hemijskih agenasa. Primer fizičkog agensa je ultravioletno zračenje. Hemijski agensi se uglavnom odnose na slobodne radikale nastale kao posledica oksidativnog stresa, mada u principu čitav niz hemijskih supstanci kao što su neki lekovi, toksini poreklom iz hrane, vode i vazduha, takođe mogu da indukuju promene u hromatinskom strukturnom integritetu (O'Sullivan & Karlseder, 2012; Chandra et al. 2012).

Osnovna jedinica strukture hromatina u eukariotskim ćelijama je nukleozom koji se sastoji iz lanca DNK i histonskog oktamera sačinjenog od baznih histonskih proteina H2A, H2B, H3 i H4 (Thurman et al. 2012; Ptasinska et al. 2012; Schwartzentruber et al. 2012). Nukleozomi su medjusobno povezani segmentima tzv. linker DNK (Talbert et al. 2012; Liu et al. 2012; Dolnik et al. 2012; Ameyar-Zazoua et al. 2012). Na mestu gde DNK ulazi odnosno napušta nukleozom, nalazi se histon H1. Nukleozomi predstavljaju prvi od nekoliko mogućih nivoa organizacije hromatina. Viši nivoi hromatinske organizacije nastaju kada dodje do dalje spiralizacije DNK, odnosno do stvaranja solenoidnih struktura i hromatinskih niti prosečne debljine 30 nanometara. Dalja spiralizacija (superspiralizacija) je takođe moguća, a na kom strukturalnom nivou će se hromatin nalaziti zavisi od

mnogobrojnih faktora, kao što je transkripciona aktivnost u jedru i mitotski status ćelije.

Prema poslednjim saznanjima, nukleozomi tokom procesa starenja ćelije trpe značajne promene u ultrastrukturnoj organizaciji. Ove promene su više izražene u heterohromatinu nego u euhromatinu, što je razumljivo, imajući u vidu da je euhromatin transkripciono aktivan i stoga važniji za normalno obavljanje životnih funkcija ćelije (O'Sullivan & Karlseder, 2012; Li et al. 2012).

Konstitutivni heterohromatin je u najvećoj meri zahvaćen starosnim promenama i to najviše regioni tzv. tih hromatinskih domena (silent chromatin domains) kao što su centromere i repetitivna DNK. Primećeno je da se ukupna količina DNK (merena brojem baznih parova) u konstitutivnom heterohromatinu tokom vremena smanjuje. Ovaj starosno-zavisni gubitak hromatina može nastati kao posledica spontano nastalih grešaka koje se dešavaju tokom replikacije DNK, odnosno nemogućnosti odgovarajućih DNK polimeraza i drugih enzima da te greške poprave. Takođe, mnogi fizički i hemijski agensi (mutagene supstance, jonizujuća zračenja itd.) mogu direktno da oštete pojedine regione u konstitutivnom hromatinu i izazovu njegov gubitak tokom sledeće replikacije. Nažalost, još uvek nije poznato da li i u kojoj meri se ovakav starosno-izazvani gubitak konstitutivnog hromatina odražava na transkripcionu aktivnost koja se dešava u euhromatinu (O'Sullivan & Karlseder, 2012).

Tokom poslednjih deset godina, definisane su posebne lokacije u okviru fakultativnog heterohromatina koje su javljaju samo kod veoma starih ćelija koje se odlikuju zastojećem u ćelijskom ciklusu i jedinstvenim fenotipskim karakteristikama (sekrecija određenih citokina i faktora rasta, ekspresija starosno-zavisne beta galaktozidaze

itd.). Ove lokacije su nazvane "starosno asocirani heterohromatinski fokusi" (Senescence-associated heterochromatin foci) i sastoje se od lanca DNK, i određenih histonskih i nehistskih proteina kao što su macroH2A, high-mobility group protein A (HMGA), HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (HIRA), heterohromatinski protein 1- $\gamma$  izoforma (HP1 $\gamma$ ), i anti-silencing faktor (ASF)1 (O'Sullivan & Karlseder, 2012). Starosno-asocirani heterohromatinski fokusi su od posebnog značaja u modulaciji genskog odgovora na DNK oštećenje i trenutno su predmet intenzivnog izučavanja sa posebnim akcentom na njihovu ulogu u patogenezi kancera.

Starosno-asocirani heterohromatinski fokusi definitivno utiču na strukturnu arhitekturu heterohromatina u svim ćelijama u kojima se jave, međutim još uvek nije poznato u kojoj meri su ove promene izražene. Takođe, ostaje nepoznanica da li postojeće metode vezane za svetlosnu mikroskopiju, uključujući fraktalnu i teksturalnu analizu mogu detektovati ovako male subnuklearne promene.

U našoj studiji pored ostalog, koristili smo ultravioletno zračenje da bismo indukovali hromatinsko oštećenje u ćelijskoj kulturi. Ovo je jedan o često korišćenih modela takozvanog fotostarenja (photoaging) kod koga se u hromatinu indukuju procesi koji se, ukoliko je doza zračenja dovoljno velika (što je slučaj sa našom studijom) završavaju apoptozom ispitivane ćelije. Iako ovaj model ima značajnih prednosti kada se poredi sa eksperimentalnim modelima fiziološkog starenja (eksperiment sa laboratorijskim životinjama različite starosti), njegova glavna mana je ta što se kod njega pre svega prate promene u hromatinu vezane za akumulaciju DNK oštećenja, dok većina epigenetskih promena koje su karakteristične za fiziološko starenje

uopšte nije prisutna (Almagor & Cole, 1989; Nyström & Osiewacz, 2004; Rochette & Brash, 2010).

#### **4.8. Strukturne promene u slezini tokom postnatalnog razvoja i starenja**

Slezina je sekundarni limfoidni organ koji pored ostalog ima ulogu filtra koji zadržava strane antigene kada se nađu u krvi, kao i ostarele i oštećene eritrocite. Kod velikog broja vrsta glodara koji se danas koriste kao eksperimentalni animalni modeli, slezina je i aktivni hematopoetski organ, odnosno proces hematopoeze se odvija kako u kako u postnatalnom razvoju tako i u adultnoj životnoj dobi.

U glodara, na rođenju struktura slezine je nerazvijena i ima izgled dobro vaskularizovanog mezenhimalnog tkiva. Od prve nedelje do odrasle dobi, masa slezine se poveća 20 000 puta a naročito su upadljiva dva perioda povećanja mase slezine: prvi, između prve i druge nedelje (šest puta), a drugi, između 75. i 80. dana postnatalnog života (Gomariz et al. 1989; Kamath et al. 2000).

Prvi dokazi hematopoeze javljaju se petog dana pojavom razbacanih fokusa primitivnih eritrocita i ranih megakariocita. Već 7 dana nakon rođenja u slezini se mogu detektovati i zone granulocitopoeze koja je posebno aktivna u prvim nedeljama života. Kasnije, par nedelja nakon rođenja, eritropoeza jako nadmašuje granulocitopoezu i kod juvenilnih životinja nakon prestanka sisanja, kao i kod adultnih glodara hematopoezna aktivnost je uglavnom ograničena na eritropoetsko tkivo neposredno ispod kapsule organa. U

ovom tkivu, eritroidni prekurzori su raspoređeni u agregate koji se jasno mogu videti na standardnim histološkim bojenjima (Gomariz et al. 1989; Kamath et al. 2000).

Tkivo slezine je već u prvim nedeljama života podeljeno na dva morfološki i funkcionalno razdvojena odeljaka: crvenu pulpu i belu pulpu. Crvena pulpa zauzima veću površinu i u njen sastav ulaze krvni sudovi (venski sinusoidi) i ćelijske gredice. Pored ovih struktura postoji i veliki broj potpornih, retikularnih ćelija. U okviru ćelijskih gredica nalaze se brojni makrofagi, limfociti, plazmociti i eritrociti. Sastav gredica uveliko zavisi od funkcionalnog statusa slezine u datom trenutku (imunska aktivnost, razgradnja eritrocita itd.)

Bela pulpa je deo slezine u kome se odvija većina fizioloških procesa vezanih za pokretanje humoralnog imenskog odgovora. Sastoji se od limfnih folikula, PALS-a (periarteriolar lymphoid sheath) i marginalne zone. Sva tri odeljka, iako morfološki razdvojena, imaju intenzivnu komunikaciju tokom odvijanja humoralnog imenskog odgovora.

Limfociti koji se akumuliraju oko arteriola na rođenju čine takozvani "primitivni PALS" (periarteriolar lymphoid sheaths), a već drugog dana nakon rođenja ova struktura počinje da se povećava koncentrično oko arterije centralis da bi se između četvrtog i desetog dana PALS u potpunosti razvio. Smatra se da marginalna zona nastaje oko šestog dana postnatalnog života (Gomariz et al. 1989; Kamath et al. 2000).

Folikuli su strukture sastavljene prvenstveno od B-limfocita. U svakom folikulu se može naći i jedan mali procenat T-limfocita koji su neophodni za regulaciju aktivnosti folikula tokom imenskog odgovora.

Nakon kontakta sa antigenom, i uz pomoć T-limfocita, primarni folikul se transformiše u sekundarni folikul koji se sastoji od germinativnog centra i limfocitne korone. Limfociti su u prva dva meseca života u glodara skoncentrisani u dva glavna odeljka: oko arteriola organa i u primarnim folikulima. Sekundarni folikuli sa germinativnim centrima počinju da se javljaju tek u adultnoj životnoj dobi, tako da kod starijih životinja su na standardnim preparatima mogu videti i primarni i sekundarni folikuli (Gomariz et al. 1989; Kamath et al. 2000).

Na standardnoj, svetlosnoj mikroskopiji, u germinativnom centru se mogu uočiti dve morfološki odvojene celine: svetla zona (light zone) i tamna zona (dark zone). B-limfociti u tamnoj zoni se zovu centroblasti, a u svetloj zoni centrociti. Centroblasti se nalaze u procesu intenzivne deobe (zbog toga njihova jedra imaju veći procenat heterohromatina i tamnije su obojena). Zbog ove stalne mitotske aktivnosti, tamna zona germinativnog centra se ponaša kao "generator" novih limfocita, od kojih većina nije zrela, odnosno sposobna za adekvatan humoralni odgovor. B-limfociti iz tamne zone migriraju u svetlu zonu u kojoj se transformišu u centrocite (B-ćelije koje se ne dele). U svetloj zoni se vrši odabir onih B - limfocita koji pokazuju afinitet prema datom antigenu. Izabrani B - limfociti dobijaju "pro-survival signal", (signal koji omogućava preživljavanje ćelije dok svi ostali limfociti ulaze u proces programirane ćelijske smrti (apoptoze) (Tan et al, 2009; Berkowska et al. 2011; Corcione et al. 2010).

Izabrani B-limfociti ponovo migriraju, ovog puta iz svetle zone u tamnu zonu u kojoj brzo proliferišu. Ovo cirkulisanje B - limfocita između tamne i svetle zone omogućava brzu i efikasnu selekciju i proliferaciju onih ćelija sposobnih da se transformišu u plazmocite koji

će lučiti velike količine antitela na odgovarajući antigen, što je u osnovi humoralnog imuniteta.

U našoj prethodnoj studiji (Pantic & Pantic, 2012), pokazali smo da su određeni parametri GLCM analize svetle i tamne zone germinativnog centra u korelaciji sa pokazateljima imunskog odgovora na dati antigen. Ovo istraživanje je takođe pokazalo da je GLCM metod sposoban da kvantifikuje promene koje se dešavaju tokom strukturne degradacije tkiva u folikulu bele pulpe slezine.

Međutim, naši rezultati vezani za postnatalni razvoj i starenje ukazuju da nema značajnih promena u folikularnom tkivu slezine ni u fraktalnim, ni u teksturalnim parametrima. Ovo odsustvo promena je možda posledica toga što u ovoj studiji životinje nisu bile imunizovane, pa su zbog toga analizirani isključivo primarni folikuli (bez germinativnih centara) za koje se zna da tokom većeg dela života ostaju intaktni (Gomariz et al. 1989; Kamath et al. 2000).

#### **4.9. Promene kompleksnosti hematopoeznog tkiva slezine**

Naša studija je prva koja je uspela da pokaže da hematopoezno tkivo slezine u miševa podleže značajnim strukturnim promenama kako u postnatalnom razvoju, tako i u starenju. Takođe, ovo je prva studija na animalnom modelu koja je primenila metode fraktalne i teksturalne analize u cilju kvantifikovanja citoarhitektonike hematopoeznog tkiva.

Hematopoezna matična ćelija je multipotentna ćelija koja je sa jedne strane sposobna da se diferencira u specijalizovanije prekurzorske ćelije, a sa druge strane ima sposobnost samoobnavljanja



(ćerke ćelije su genetski i funkcionalno identične sa majkom ćelijom). Prekurzorske ćelije imaju manju sposobnost diferencijacije od pluripotentne matične ćelije, odnosno mogu da dovedu do stvaranja/obnavljanja zrelih, specijalizovanih ćelija samo određene loze (Wilson 2009; Muller-Sieburg 2002; Guo 2003).

Već neko vreme je poznato da u kostnoj srži sa starošću, sposobnost pluripotentne hematopoezne matične ćelije da se diferencira u zrele ćelije krvi progresivno opada. Ovo je sa druge strane praćeno mnogobrojnim strukturnim i funkcionalnim promenama u celokupnom tkivu kostne srži.

U kostnoj srži, sa starošću dolazi do povećanja stvaranja i procentualne zastupljenosti masnog tkiva. Takođe, dolazi do smanjenja broja kako pluripotentnih matičnih ćelija tako i prekurzorskih ćelija. Kad su u pitanju ertiroidne prekurzorske ćelije, smanjenje njihovog broja u starih laboratorijskih životinja kao što su miševi dovodi do progresivnog smanjenja vrednosti hematokrita i broja retikulocita (retikulocitopenije). Ove promene mogu biti praćene pojavom blage anemije (Tsuboi, 1991, Saitoh 1999; Boggs 1985). Za sada nije poznato da li su funkcionalne promene koje se manifestuju poremećajima u krvnoj slici posledica smanjenog broja eritroidnih prekurzora ili posledica smanjenog kapaciteta za diferencijaciju individualnih prekurzorskih ćelija.

U zdravom ljudskom organizmu, kostna srž predstavlja osnovno mesto u kome se obavlja proces hematopoeze. Kod fetusa, jetra i slezina takođe imaju hematopoetsku funkciju. Kod odraslog čoveka, hematopoeza u jetri i slezini može biti prisutna samo u određenim patološkim stanjima.

Sa druge strane, za razliku od čoveka, kod mnogih animalnih eksperimentalnih modela kao što je miš i pacov, jetra i slezina su normalni hematopoezni organi kako u embrionalnom životu, tako i u postnatalnom razviću i starenju. U miševa, hematopoezno tkivo slezine je veoma važno u održavanju normalnog broja zrelih ćelija periferne krvi. Pretpostavlja se da je slezina u miša poseduje oko 50 procenata eritropoetskog kapaciteta normalnog hematopoeznog tkiva kostne srži. Ovo čini slezinu u miševa pogodnim eksperimentalnim modelom za izučavanje procesa eritropoeze.

U hematopoeznom tkivu slezine pri standardnom bojenju (Hematoksin-Eozin, Gimza), eritroidne prekurzorske ćelije se mogu uočiti grupisane u agregate u crvenoj pulpi neposredno u blizini kapsule organa (Suttie 2006). Karakteristika eritroidnih prekurzora je da se pri standardnom bojenju jedra boje tamno, odnosno da je odnos heterohromatina prema euhromatinu relativno veliki. Po ovoj specifičnosti, eritroidni prekurzori se relativno lako mogu razlikovati od mijeloidnih prekurzora i ostalih ćelija koje se mogu naći u ovom delu crvene pulpe slezine.

Kao što je slučaj sa većinom ćelija u ljudskom organizmu, pretpostavlja se da i kod matičnih ćelija postoje dve osnovne grupe faktora koji dovode do strukturnih i funkcionalnih promena tokom starenja: spoljašnji (extrinsic) i unutrašnji (intrinsic) faktori (Ergen & Goodell, 2010; De Haan & Gerrits, 2007; Wagner et al. 2008, Aucagne et al. 2011; Minami et al. 2007). Ovo se odnosi kako na pluripotentnu hematopoeznu pluripotentnu matičnu ćeliju, tako i na specijalizovane prekurzorske ćelije.

Spoljašnji faktori se pre svega odnose na specifičnu tkivnu mikrosredinu koja okružuje svaku matičnu / prekurzorsku ćeliju. U ovoj

sredini se nalaze različite koncentracije mnogobrojnih hemijskih medijatora kao što su interleukini i faktori rasta. Ovi medijatori mogu na razne načine da usmeravaju matičnu ćeliju u smislu ubrzane diferencijacije prema specifičnoj krvnoj lozi. Neki interleukini, sa druge strane imaju inhibitornu ulogu i zaustavljaju proces diferencijacije (Dorshkind et al. 2009, Rossi et al. 2005, Aucagne et al. 2011; Boiret et al. 2001).

Veoma značajan spoljašnji faktor koji dovodi do starosno-zavisnog smanjenja funkcije hematopoezne matične ćelije predstavljaju stromalne ćelije u kostnoj srži i drugim hematopoetskim tkivima. Stromalne ćelije stvaraju veliki broj hemijskih medijatora, od kojih neki spadaju u faktore rasta sa funkcijom povećanja mitotske aktivnosti matične, odnosno prekurzorske ćelije. Stromalne ćelije na ovaj način pozitivno utiču na održavanje, odnosno samoobnavljanje pula pluripotentnih i usmenih matičnih ćelija, što je od vitalnog značaja za organizam. Ove ćelije takođe sintetišu i luče specifične stimulišuće faktore koje pomažu diferencijaciju odgovarajućeg prekurzora u zreliju formu. Konačno, pretpostavlja se da stromalne ćelije mogu da u određenim slučajevima direktno komuniciraju sa matičnim ćelijama i da ta adhezija utiče na proces diferencijacije i samoobnavljanja (Sun et al. 2012; Xiao et al. 2012; Tuljapurkar et al. 2011; Bocker et al. 2011; Beerman et al. 2010).

Primećeno je da se sa starošću adhezija stromalnih ćelija za hematopoezne matične ćelije smanjuje. Ovo smanjenje utiče na arhitekturu celokupnog hematopoeznog tkiva kostne srži, a naša je pretpostavka da se slične promene kod miševa dešavaju i slezini. U našoj studiji, moguće je da je detektovano starosno –zavisno smanjenje kompleksnosti subkapsularnog hematopoetskog tkiva slezine rezultat

upravo ovih promena u međućelijskoj komunikaciji stromalne i matične ćelije.

Unutrašnji faktori u starenju hematopoeznog tkiva se pre svega odnose na epigenetske promene i akumulaciju DNK oštećenja. Posebno važne su promene u epigenetskoj regulaciji genoma, odnosno promene u genskoj ekspresiji koje u određenim slučajevima mogu značajno uticati na hromatinsku strukturalnu i ultrastrukturalnu organizaciju (Sun et al. 2012; Xiao et al. 2012; Tuljapurkar et al. 2011; Bocker et al. 2011; Beerman et al. 2010). Naša je pretpostavka da su upravo neki od ovih unutrašnjih faktora presudno uticali na starosno-zavisno povećanje entropije (neuređenosti) hromatina eritroidinih prekurzorskih ćelija u našoj studiji.

Do sada je otkriveno nekoliko stotina gena čija se ekspresija menja sa starenjem hematopoezne matične ćelije. Veliki procenat ovih gena je važan učesnik u regulaciji signalnih puteva u kojima se odlučuje o usmerenju diferencijacije matične ćelije u specifičnu ćelijsku lozu. Kad su u pitanju oni geni za koje se misli da potenciraju obnavljanje limfoidne loze, njihova ekspresija se sa starenjem značajno smanjuje. Sa druge strane, geni koji direktno ili indirektno dovode do diferenciranja matične ćelije u mijeloidnu lozu imaju povećanu ekspresiju u starih životinja. Misli se da je upravo ovaj fenomen odgovoran za starosno – zavisno pomeranje (engl. skewing) od limfopoeze ka mijelopoezi u kostnoj srži (Dorshkind et al. 2009, Rossi et al. 2005).

Naime, dokazano je da se tokom starenja hematopoezne matične ćelije kostne srži dobijaju tendenciju da se češće diferenciraju u ćelije mijeloidne loze nego limfoidne loze. Takođe, kada su u pitanju nešto specijalizovane prekurzorske ćelije, primećeno je se broj limfoidnih prekurzora u kostnoj srži sa starošću smanjuje mnogo većim tempom

nego kad su u pitanju mijeloidni prekursori. Ovaj fenomen je dobio ime “lozno izvrtnje” (engl. lineage skewing). Smanjen broj limfoidnih prekuzora se odražava na brojnost i funkcionalnost populacija CD4+ i CD8+ T limfocita periferne krvi u starih ljudi. Sa kliničkog aspekta, ovaj fenomen je takođe važan jer donekle objašnjava povećanu incidenciju limfoidnih tumora u mladih osoba i mijeloproliferativnih bolesti kod stare populacije. Metodama savremene molekularne biologije, kao što je gore rečeno, su identifikovani geni za koje se sumnja da su odgovorni za ovaj fenomen (Dorshkind et al. 2009, Rossi et al. 2005, Lobetti-Bodoni et al. 2012, Gekas et al. 2009; Beyer et al. 2011).

Starosne promene vezane za epigenetsku regulaciju hromatinske organizacije su veoma izražene kako u pluripotentnim, tako i prekuzorskim hematopoeznim ćelijama. Chambers i saradnici su ukazali da u hematopoeznim matičnim ćelijama postoji izražena epigenetska disregulacija sa smanjenom genskom ekspresijom na mnogim hromozomskim regionima (Chambers et al. 2007). Postoji velika grupacija gena koji su direktno odgovorni za regulaciju hromatinske arhitekture sa nazivom “hromatinski regulatori” (prisutni u velikom broju tkiva, a ne samo u hematopoeznom) kod koje su ove promene naročito izražene (Chambers et al. 2007; Fujimoto et al. 2012). Većina ovih gena utiče na procese u jedru matične ćelije poput menjanja tercijarne strukture proteina (protein folding), hromatinske inaktivacije (chromatin silencing) i prezervacije genomskog integriteta (Chambers et al. 2007).

Tipičan primer promene genske ekspresije asocirane sa starenjem hematopoezne matične ćelije je promena u Ezh2 genu koji je član tzv. Polycomb familije gena koja kodira transkripcione receptore. Ovaj gen je odgovoran za hromatinsko remodelovanje i fiziološko

samoobnavljanje pula matičnih ćelija (Kamminga et al. 2006; Ergen & Goodell, 2010). Preterana ekspresija Ezh2 gena može dovesti do veće otpornosti pula hematopoeznih matičnih ćelija nakon ponovljenih transplantacija nego što je to slučaj sa ćelijama sa normalnim Ezh2 genskim lokusom. U starim ćelijama primećena je smanjena ekspresija ovog gena, što bi po nekim pretpostavkama moglo da bude jedno od objašnjenja poremećaja u funkciji samoobnavljanja i diferencijacije matičnih ćelija tokom starosti (Ergen & Goodell, 2010; Kamminga et al. 2006).

Drugi potencijalni intrinzični faktor koji se u matičnim, kao u ostalim i u većini drugih ćelija u organizmu manifestuje sa starenjem je postepena akumulacija DNK oštećenja u jedru (Wang et al. 2012; Nijnik et al. 2007; Garinis et al. 2009). Jedan od razloga zašto je akumulacija DNK oštećenja fenomen koji se može u manjoj ili većoj meri detektovati u svim ćelijama čak i u ranoj životnoj dobi je taj što mnogi mehanizmi popravke DNK (takozvani repair mehanizmi) nisu stoprocentno efikasni. Jednom nastalo DNK oštećenje koje nije detektovano od strane repair mehanizama postaje sastavni deo genoma ćelije i nakon mitoze se prenosi na ćerke ćelije. Mehanizmi popravke u ćerkama ćelijama nemaju više sposobnost da DNK oštećenje isprave, odnosno ono postaje ireverzibilno. Vremenom ova akumulacija može dovesti do poremećaja funkcije hematopoezne matične ćelije.

Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno koji od mehanizama je više odgovoran za starosno-zavisne promene u funkcionisanju hematopoeznog tkiva: akumulacija DNK oštećenja ili poremećaj u epigenetskoj kontroli hromatina? Iako je u poslednjih nekoliko decenija uloženo puno napora da se na ovo nedoumica razjasni, postojeće studije ne mogu da daju adekvatno i precizno objašnjenje. U našoj studiji,

uočili smo statistički značajno povećanje entropije hromatina tokom starenja na eritroidnim prekurzorskim ćelijama. Pretpostavljamo da je GLCM metoda u ovom slučaju pre svega uspela da detektuje odgovarajuće starosne epigenetske promene u hromatinu, imajući u vidu da je analiza urađena korišćenjem svetlosne mikroskopije (uveličanje 1000x).

#### **4.10. Struktura i funkcija timusa u postnatalnom razviću i starosti**

Timus je primarni limfoidni organ od vitalnog značaja za razvoj imunskog sistema i njegove sposobnosti da se bori sa infektivnim i drugim štetnim procesima u organizmu. Sastoji se iz dva glavna morfološka odeljka: korteksa i medule. Glavne ćelije u oba odeljka su T-limfociti (T-ćelije). Pored njih, u timusu se takođe nalazi određen broj potpornih stromalnih ćelija koje mogu, ali i ne moraju da interaguju sa T-limfocitima.

Velika većina T-limfocita u timusu su nezreli i nefunkcionalni. Da bi mogli da normalno funkcionišu, potrebno je da prođu kroz komplikovan proces selekcije i maturacije. Ovaj proces se odvija i u korteksu i u meduli i sastavljen je od nekoliko faza (Gui et al. 2012; Zubkova et al. 2012; Gruver et al. 2009; Nabarra et al. 2001).

Prva faza maturacije T-lifocita se dešava u korteksu i naziva se T-limfocitna genska rekombinacija (T-cell receptor gene rearrangement). U ovoj fazi dolazi do nasumičnog spajanja genskih, odnosno DNK segmenata. Nakon stvaranja odgovarajuće sekvence, na osnovu njene genetske informacije, sintetiše se grupa proteina koja ulazi u sastav T-

ćelijskog receptora (T-cell receptor, TCR). T-ćelijski receptor kasnije daje sposobnost T-limfocitu da prepozna odgovarajući antigen. Nakon što se gensko pregrupisanje završi, T-limfocit poseduje dva površinska (membranska) TCR koreceptorska molekula: CD4 i CD8. Ovakva ćelija se još naziva duplo pozitivni nezreli T- limfocit (double positive CD4+CD8+ immature T-cell) (Sleckman 2005; Nitta et al. 2008; Krangel 2009; Seitan et al. 2011).

Sledeća faza maturacije T-limfocita se takođe odvija u korteksu. Ćelija koja eksprimira oba koreceptorska molekula se izlaže molekulima glavnog kompleksa histokompatibilnosti (major histocompatibility complex – MHC). Ukoliko je T-ćelijski receptor sposoban da reaguje sa MHC molekulom, ćelija dobija signal koji joj omogućava dalje funkcionisanje. Ovaj signal se još naziva pro-survival signal zato što svi T-limfociti koji ga ne dobiju pre ili kasnije ulaze u proces programirane ćelijske smrti. Ova faza sazrevanja T-ćelija se zove pozitivna selekcija zato što se tokom nje odabiraju one ćelije koje su sposobne da reaguju na prisustvo potencijalnog antigena. Ostale ćelije koje takvu sposobnost ne iskazuju bivaju odstranjene iz timusa apoptozom (Zuklys et al. 2005; Roberts et al. 2012; Luc et al. 2012; Seitan et al. 2011; Teng et al. 2011; Kurobe et al. 2006).

Za razliku od pozitivne selekcije u korteksu timusa, u meduli se dešava potpuno drugačiji proces odabira T-limfocita. Naime, pozitivnom selekcijom, izdvojene su one ćelije koje su "reaktivne", odnosno imaju sposobnost da ulaze u interakciju sa drugim ćelijama nosiocima glavnog molekula tkivne histokompatibilnosti i na taj način prepoznaju antigen. Među ovim odabranim ćelijama, postoji određeni procenat koji je sposoban da reaguje na antigene normalno prisutne u tkivima i organima (self antigeni). Prepoznavanje ovih antigena od strane



imunskog sistema je potencijalno veoma opasno, jer se u tom slučaju sopstvena tkiva i ćelije označavaju kao strana i organizam kao rezultat pokreće odgovarajući imunski odgovor, odnosno autoimunsku reakciju.

Da bi se autoimunost sprečila, u meduli se sprovodi takozvana negativna selekcija T-limfocita. Ćelijama se kontinuirano prezentuju self antigeni na MHC molekulima, a oni limfociti koji pokažu afinitet prema takvim molekulima dobijaju proapoptotski signal (Tanaka et al, 2010). Nažalost, i pored toga što je negativna selekcija veoma efikasan proces, u ljudskoj populaciji, a i na animalnim eksperimentalnim modelima postoji čitav spektar autoimunih bolesti, nastalih bilo kao posledica preživljavanja autoreaktivnih T-limfocita u meduli, bilo kao posledica kasnije modulacije imunskih odgovora u zrelih T-ćelijama (Zuklys et al. 2005; Roberts et al. 2012; Luc et al. 2012; Seitan et al. 2011; Teng et al. 2011; Kurobe et al. 2006; Tanaka et al. 2010).

Naša studija je pored ostalog utvrdila da se u pojedinim starosnim grupama životinja limfociti korteksa timusa značajno razlikuju od limfocita medule. Statistički značajna razlika između ove dve populacije ćelija je detektovana u hromatinskim teksturalnim parametrima: GLCM entropiji, angularnom drugom momentu i teksturalnoj korelaciji. Entropija i varijansa su bile više u kortikalnim, a angularni drugi momenat i korelacija u medularnim limfocitima.

Iz gore navedenih podataka, jasno je da se ove dve populacije limfocita razlikuju, kako u morfološkim, tako i u funkcionalnim karakteristikama. Kortikalni i medularni limfociti imaju različitu ekspresiju gena vezanih za TCR koreceptorske molekule. Kortikalni limfociti su uglavnom duplo pozitivni (CD4+CD8+), ili duplo negativni (CD4-CD8-), odnosno sadrže ili oba, ili nijedan od TCR koreceptorskih molekula na membrani. Medularni limfociti sa druge strane uglavnom

imaju esprimiran samo jedan od koreceptorskih molekula (i stoga nose oznake CD4+CD8- or CD4-CD8+).

Još jedna važna razlika između korteksa i medule timusa je specifičnost u mikrosredinama koje okružuju T-limfocite u ova dva odeljka. Kortikalna i medularna mikrosredina se razlikuju u prisustvu i koncentracijama interleukina i faktora rasta. Takođe postoje značajne razlike u funkcionisanju potpornih, stromalnih ćelija i načinu njihove interakcije sa T-limfocitima (Nabarra et al. 2001; Heino et al. 1999; Gruver et al. 2009).

Naši rezultati ukazuju da je teksturalna GLCM analiza jedarnog hromatina T-limfocita u stanju da detektuje diskretne strukturne promene koje su asocirane sa ćelijskom migracijom i maturacijom u timusu. Ove promene, iako nisu uočljive tokom standardne svetlosne mikroskopije statistički značajno utiču na teksturalne parametre. Teoretski, u budućnosti bi se mogao dizajnirati poseban programski algoritam koji bi kombinovao teksturalne parametre hromatina, sa ciljem lakše morfološke identifikacije kortikalnih i medularnih limfocita.

Kao dodatak ovoj studiji, analizirana je efikasnost GLCM parametara u razlikovanju individualnih T-limfocita vezano za njihovu pripadnost kortikalnoj, odnosno medularnoj populaciji. Ovo je urađeno konstrukcijom ROC (Receiver-operating characteristic) dijagrama (Wintermark et al. 2006; Seli et al. 2011). Metoda se zasniva na određivanju senzitivnosti i specifičnosti datog parametra u detektovanju pripadnosti ćelije jednoj ili drugoj populaciji. Na ROC dijagramu, na ordinati (y osi) je prikazana senzitivnost (u ovom slučaju sposobnost testa da ćelije koje su pripadnici kortikalne ćelijske populacije zaista prikaže kao pripadnike ćelijske populacije), a na

apscisi (x osi) je prikazana vrednost lažno pozitivnih rezultata testa (procenat ćelija koje je test pogrešno svrstao u kortikalnu populaciju, iako one pripadaju medularnoj populaciji; ova vrednost se dobija kao rezultat jednačine: 100%-specifičnost testa).

Rezultati ROC analize se tumače određivanjem površine na dijagramu ispod ROC krive. Ova površina se određuje procentualno u odnosu na površinu celog dijagrama. Test koji je maksimalno uspešan u razlikovanju dve populacije bi imao površinu ispod ROC krive od 100%. Neuspešni testovi imaju površinu približno 50%.

Naši rezultati su pokazali da je od testiranih parametara najefikasnija entropija (površina ispod ROC krive 65.2%), zatim angularni drugi momenat (64.9%), varijansa (63%) i korelacija (62.6%). Ove površine su relativno male kada se uporede sa nekim drugim testovima u ćelijskoj biologiji i kliničkoj praksi, međutim, treba imati u vidu da je ova efikasnost i dalje iznad one koja se smatra minimalnom za prolaznu ocenu testa (60%).

Pretpostavljamo da će u budućnosti biti moguće dizajnirati poseban scoring sistem koji se zasniva na kombinaciji različitih GLCM parametara sa fraktalnom analizom u cilju povećanja efikasnosti diskriminacije dve limfocitne populacije u timusu. Ovakav sistem bi teoretski imao mnogo veću senzitivnost i specifičnost od individualnih teksturalnih ili fraktalnih parametara, a zadržao bi sve prednosti ovih metoda u poređenju sa konvencionalnim tehnikama ćelijske biologije: egzaktnost, brzinu i dostupnost.

Timus predstavlja organ u kome morfološke i funkcionalne promene vezane za starenje počinju da budu izražene veoma rano tokom života. Morfološke promene se manifestuju kroz strukturnu

atrofiju tkivnog parenhima (Morrot et al. 2011; Kanavaros et al. 2010). Dinamika nastanka atrofije je približno ista u korteksu i meduli. Funkcionalni parenhim se zamenjuje fibroznim vezivnim tkivom u kome se proces maturacije T-limfocita obavlja sa veoma smanjenom efikasnošću.

Jedna od posledica involucije timusa je smanjenje proizvodnje nativnih T-limfocita (Aw et al. 2008; Morrot et al. 2011). Moguće je da ovo smanjenje dalje u starosti uzrokuje smanjen kapacitet organizma u borbi protiv infektivnih agensa, barem kada je u pitanju T-zavisni humoralni imunski odgovor (T-cell dependent humoral immune response - TDAR) i citotoksičnost T-ćelija. Naši rezultati u ovom radu pokazuju da timus kao organ gubi svoju strukturnu kompleksnost tokom starenja. Ovaj gubitak kompleksnosti je meren kroz smanjenje vrednosti fraktalne dimenzije i odgovarajućem promenama u teksturalnoj entropiji.

U našoj prethodnoj studiji pokazali smo da određeni parametri teksturalne GLCM analize mogu pomoći u predviđanju T-zavisnog humoralnog imunskog odgovora (Pantic & Pantic, 2012). Naime, nakon imunizacije životinje stranim antigenom (ovčijim eritrocitima), tkivo slezine je uzeto za analizu i obojeno Gimza metodom. Slično metodologiji koja je opisana u ovom radu, napravljeni su digitalni mikrofotografije svetle i tamne zone germinativnih centara, odnosno mesta gde se obavlja maturacija (i migracija) B-limfocita, ćelija odgovornih za nastanak humoralnog imuniteta. Zatim je za svaki mikrofotograf određena vrednost GLCM teksturalne entropije kao i prosečna vrednost entropije po životinji. U drugom delu eksperimentalnog protokola, korišćenjem PFC testa (Plaque-forming cells test, odnosno T-cell dependent humoral immune response assay) na suspenziji ćelija slezine kvantifikovan je

humoralni imunski odgovor na strani antigen. Nakon statističke analize, utvrđeno je da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između vrednosti PFC testa i teksturalne entropije germinativnog centra (kako svetle, tako i tamne zone). Drugim rečima, sa povećanjem T-zavisnog humoralnog imunskog odgovora, došlo je do povećanja entropije u tkivu germinativnog centra, i obrnuto. Ova studija je pokazala da GLCM parametri mogu biti važni prediktori funkcionisanja imunskog sistema (Pantic & Pantic, 2012).

Naša je pretpostavka da bi u budućnosti vredelo testirati da li postoji i u kojij meri je izražena veza između parametara fraktalne i teksturalne analize timusa sa jedne strane, i parametara humoralnog imunskog odgovora (određenih bilo TDAR testom bilo ELISA testom) sa druge strane. Takođe bi bilo interesantno ispitati da li se ta potencijalna korelacija menja tokom starenja. Ukoliko bi se pokazalo da su metode fraktalne i teksturalne analize sposobne da predvide parametre funkcije imunskog sistema i u slezini i u timusu, ove metode bi mogle postati važan dodatak savremenim tehnikama zlatnog standarda u molekularnoj imunologiji.

Pored gubitka strukturne kompleksnosti tkiva timusa kao celine, naši rezultati ukazuju da se hromatinska kompleksnost u individualnim ćelijama sa starenjem takođe menja. Ovo smanjenje fraktalne dimenzije je primećeno na T-limfocitima, ali ne i na stromalnim ćelijama.

Danas se zna da stromalne ćelije imaju mnogo veću ulogu u sazrevanju i starenju timusa nego što se ranije pretpostavljalo (Zubkova et al. 2005). Ove ćelije grade specifičnu trodimenzionalnu mrežu koja interaguje sa T-limfocitima i olakšava i usmerava njihovo kretanje kroz korteks, odnosno medulu. Ukoliko je ova mreža na neki način promenjena ili oštećena, to se može značajno odraziti na T-

ćelijsku migraciju, pa samim tim i sazrevanje. Nešto slično ovom fenomenu možemo naći i u drugim parenhimatoznim organima kao što je jetra gde potporne ćelije takođe grade mrežu koja služi kao putokaz funkcionalnim ćelijama – hepatocitima na putu od periferije lobulusa ka centru.

Pretpostavljamo da su starosne promene koje se dešavaju u trodimenzionaloj mreži stromalnih ćelija timusa značajno uticale na tkivnu kompleksnost. Naime, svaki poremećaj u citoarhitektonici koji se manifestuje time da ćelijska distribucija postane više varijabilna, odnosno manje ravnomerna na digitalnom mikrografu, može dovesti do promena fraktalnih karakteristika ispitivanog tkiva. Takođe, naravnornija distribucija ćelija u tkivu u pojedinim slučajevima se može odraziti na stepen neuređenosti tkiva, odnosno entropiju.

#### **4.11. Strukturne i funkcionalne promene u bubregu tokom starenja i njihova veza sa promenama fraktalne kompleksnosti**

Bubreg kao organ se takođe odlikuje značajnim strukturnim i funkcionalnim promenama tokom postnatalnog razvoja i starenja. Međutim, u poređenju sa timusom, te promene su i kvalitativno i kvantitativno drugačije, i imaju različitu dinamiku i trajanje. Bubrežni parenhim se, slično timusu, može podeliti na dva histološki odvojena odeljka: korteks i medulu. Osnovna funkcionalna jedinca bubrega, odgovorna za proces glomerulske filtracije i stvaranje mokraće je nefron koji po svojoj lokalizaciji može biti kortikalni ili jukstamedularni. Za razliku od timusa gde relativno rano dolazi do involucije i atrofije praćene infiltracijom fibroznog vezivnog tkiva,

starenje se u bubregu morfološki manifestuje smanjenjem broja nefrona (Weinstein & Anderson, 2010).

Kod zdravog odraslog čoveka, u bubregu se nalazi približno milion funkcionalnih nefrona koji vrše glomerulsku filtraciju od oko 125 mililitara u minuti, odnosno 180 litara dnevno (Matsushita et al, 2012). Nefroni su strukture koje se formiraju tokom embrionalnog razvoja i posle rođenja stvaranje novih nefrona nije moguće, bez obzira na faktor koji je doveo do njihovog gubitka (npr. trauma, infekcija, tumor itd.). Sa starenjem dolazi do progresivnog i ireverzibilnog gubitka nefrona: već posle četrdesete godine njihov broj počinje da opada, i po nekim autorima, taj gubitak iznosi oko deset procenata za svaku narednu deceniju života (Abecassis et al. 2012; Grunwald et al. 2012; Newland et al. 2012).

Bez obzira na ovo, na prvi pogled, značajno smanjenje broja nefrona u starosti, veličina glomerulske filtracije se ne menja u velikoj meri u adultnoj životnoj dobi. Isto važi i za ostale važne pokazatelje bubrežne funkcije kao što je efektivni protok krvi i plazme, klirensi određenih toksičnih supstanci, sposobnost bubrega da koncentriše mokraću, dnevna diureza itd. Postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja ovog fenomena. Danas je opšte prihvaćena teorija da preostali nefroni imaju veliku sposobnost adaptacije koja im omogućava da postepeno povećavaju srednju brzinu glomerulske filtracije, što je prećeno odgovarajućim promenama u resorpciji i sekreciji pojedinih supstanci.

Velika sposobnost adaptacije nefrona u smislu modulacije veličine glomerulske filtracije se osim u starenju manifestuje i nakon transplantacije, kao i kod velikog broja bolesti (Abecassis et al. 2012; Grunwald et al. 2012; Newland et al. 2012; Miya et al. 2012). Tipičan

primer je hronična bubrežna insuficijencija, nastala kao posledica dugotrajne šećerne bolesti, hipertenzije, ateroskleroze ili glomerulonefritisa. Kod hronične bubrežne insuficijencije obično dolazi do velikog gubitka nefrona tokom određenog vremenskog perioda (nekoliko meseci ili godina) i taj gubitak je obično nekoliko puta pa čak i nekoliko desetina puta veći nego kod normalnog procesa starenja (Abecassis et al. 2012; Grunwald et al. 2012; Newland et al. 2012). Ipak glomerulska filtracija se održava u dovoljnom obimu čak i kada nefronski gubitak pređe 50 procenata. Tek nakon gubitka tri četvrtine funkcionalnih nefrona počinju da se javljaju klinički simptomi vezani za poremećaj održavanja adekvatne koncentracije elektrolita u ekstracelularnoj tečnosti (edemi, promene u EKG zapisu, promene u arterijskom krvnom pritisku, nemogućnost održavanja stalne koncentracije vodonikovih jona u krvi itd.). Smrt nastupa kada se broj funkcionalnih nefrona smanji ispod 5% (Abecassis et al. 2012; Grunwald et al. 2012; Newland et al. 2012; Sataranatarajan et al. 2012; Matsushita et al, 2012; Hartleben et al. 2010;).

Nakon nefronskog gubitka izazvanog bilo starenjem, bilo bolešću, osnovna morfološka promena koja se dešava u preostalim nefronima je hipertrofija, odnosno povećanje zapremine. Hipertrofija je prisutna kako u glomerulu (veličina kapilarnog klupka, površina glomerulske bazalne membrane itd.), tako i u tubulskom sistemu. Na nivou pojedinačnih ćelija kao što su tubulske epitelijalne ćelije, hipertrofija takođe može biti prisutna, međutim, za sada nije poznato da li je ona praćena još nekom morfološkom promenom koja se može detektovati standardnom svetlosnom mikroskopijom.

Tokom postnatalnog razvoja, u bubregu se takođe dešavaju brojne strukturne promene koje se ponekad značajno razlikuju od promena



tokom starosti (Weinstein & Anderson, 2010). Na rođenju, veličina glomerulske filtracije je relativno mala i postepeno raste do druge godine života kada dostiže vrednosti karakteristične za adultno doba (Weinstein & Anderson, 2010; Brennan et al, 2008). Renalna masa na rođenju iznosi oko 50 grama i najviše se povećava tokom prvih nekoliko godina života. Povećanje renalne mase traje sve do četvrte decenije kada dostiže maksimum (400 grama) (Weinstein & Anderson, 2010). Imajući u vidu da mnogi fiziološki procesi postaju izraženiji tokom postnatalnog razvoja što je u suprotnosti sa onim što se dešava tokom starosti, očekivalo bi se da se i parametri koji kvantifikuju bubrežnu strukturu (u našem radu fraktalna i teksturalna analiza) različito menjaju tokom ova dva životna stadijuma (odnosno da smer njihove promene bude različit). U našoj studiji, međutim, rezultati ukazuju da strukturalna kompleksnost kako organa kao celine, tako i hromatina u individualnim ćelijama ne prati dokumentovane promene u fiziološkim parametrima.

Kad je u pitanju strukturalna kompleksnost bubrega kao celine, najveća vrednost fraktalne dimenzije je zabeležena u grupi novorođenih miševa (0 dana). Kompleksnost bubrežnog tkiva se smanjivala, kako u postnatalnom razviću (miševi stari 10, 20 i 30 dana) tako i u starenju (kod adultnih miševa starijih od mesec dana). Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja je ispitala starosne promene u bubrežnom parenhimu kvantifikovane fraktalnom i teksturalnom analizom i u saglasnosti je sa opšteprihvaćenim stanovištem da se strukturalna kompleksnost u biološkim strukturama smanjuje sa starenjem.

Postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja za detektovano smanjenje tkivne kompleksnosti. Prvo, kao što je u prethodnom tekstu

pomenuto, zna se da se geneza novih nefrona obavlja skoro isključivo tokom embrionalnog razvoja, i da se nakon rođenja novi nefroni ne stvaraju. Sigurno je da gubitak nefrona tokom života znatno remeti tkivnu citoarhitektoniku i da se to prikazuje kroz smanjenje fraktalne dimenzije.

Drugi potencijalni razlog za smanjenje tkivne kompleksnosti mogao bi da se nađe u promenama u bubrežnoj vaskularizaciji koje se dešavaju tokom adultnog života. Naime, delimično usled adaptacije individualnih nefrona na veće zahteve za glomerulskom filtracijom tokom starenja (i određenih bolesti) dolazi do vazodilatacije i smanjenja vaskularne rezistencije u krvnim sudovima koji snabdevaju krvlju preživle nefrone. Ovaj fenomen ima kao posledicu povećanje prosečnog dijametra velikog broja krvnih sudova na digitalnim mikrografima tkiva, što dalje može uticati na kompleksnost analizirane slike. Ovo je u skladu sa našim zapažanjima da na standardnim digitalnim mikrografima, u svim analiziranim organima, krvni sudovi i vezivno tkivo generalno imaju manju vrednost fraktalne dimenzije u poređenju sa regionima gde su funkcionalne ćelije prisutnije.

Kad je u pitanju analiza strukturne kompleksnosti nukleusnog hromatina, u našoj studiji dobijeni su rezultati slični onima vezanim za celokupno bubrežno tkivo. Naime, kod ćelija proksimalnih tubula, kao i kod ćelija makule denze detektovano je statistički signifikantno smanjenje fraktalne dimenzije hromatinske arhitekture u većini starosnih grupa u poređenju sa kontrolnom grupom (novorođene životinje). Sa druge strane, fraktalna dimenzija u hromatinu ćelija distalnih tubula i sabirnih kanalića nije se statistički značajno menjala ni u juvenilnom, ni kasnije, u adultnom periodu.

Činjenica da se fraktalna kompleksnost hromatina u proksimalnom delu nefrona smanjuje tokom starenja, a u distalnom delu nefrona ne menja može da se objasni na nekoliko načina. Prvo, veliki procenat tubulske tečnosti i rastvorenih materija se resorbuje čim dođe u kontakt sa ćelijama proksimalnog tubula. Kad su u pitanju određeni joni taj procenat je veći od 60%. Među supstancama koje se resorbuju u proksimalnom tubulu, mogu se naći i one sa toksičnim dejstvom, bilo da su one unete spolja (putem hrane, vode, vazduha) bilo da su stvorene endogeno. Zapravo za većinu toksina, postoje samo dva uslova koja moraju biti ispunjena da bi se oni našli u tubulskoj tečnosti: moraju biti hidrosolubilni i dovoljno malih dimenzija da bi prošli filtracionu barijeru (Huang et al. 2012)

Čak i oni toksini koji se primarno izbacuju iz organizma urinarnim putem, mogu da se nekoliko puta resorbuju u proksimalnim tubulima pre nego što konačno dospeju do distalnih delova nefrona i budu izbačeni iz organizma. Drugim rečima, za razliku od ćelija u distalnim tubulima i sabirnim kanalićima, ćelije proksimalnih tubula su u mnogo većem stepenu izložene štetnom dejstvu. Pod pojmom "štetno dejstvo na ćeliju", obično se podrazumeva negativni efekat toksina na strukturu i funkciju njenog genetskog materijala.

Pretpostavljamo da je u našoj studiji u ćelijama proksimalnih tubula, fraktalna analiza uspela da detektuje diskretne strukturne promene u hromatinu koje su posledica progresivne akumulacije DNK oštećenja tokom života. Poznato je da ova oštećenja počinju da se stvaraju odmah nakon rođenja zbog kombinovanog dejstva brojnih egzogenih i endogenih činilaca i da su najviše izražena u starosti. Akumulacija DNK oštećenja u ćelijama u bubregu samo u izuzetnim slučajevima (kad ona pretili da kompromituje vitalne funkcije ćelije)

izaziva ćelijsku smrt (apoptozu ili još ređe nekrozu) (Gan et al. 2012). U većini slučajeva ćelija dugo vremena preživljava i normalno obavlja svoju funkciju. Nakon mitoze, kumulativno DNK oštećenje se prenosi na ćerke ćelije i na taj način se održava do kraja životnog veka organizma (Gan et al. 2012).

Ukoliko bi se u nekoj budućoj studiji potvrdilo da fraktalna analiza može da detektuje diskretne promene u nukleusnom hromatinu asocirane sa akumulacijom DNK oštećenja tokom starenja, to bi ukazalo na potencijalni značaj ove metode u ispitivanju nefrotoksičnosti velikog broja hemijskih agenasa (kao npr. lekova, pesticida, industrijskih zagađenja, itd). Danas na eksperimentalnim animalnim modelima nefrotoksičnost ksenobiotika se obično kvantifikuje praćenjem fizioloških parametara bubrežne funkcije kao što je veličina glomerulske filtracije, efektivni renalni protok plazme i veličina dnevne diureze. Pod uslovom da se pokaže kao metoda sa adekvatnom senzitivnošću i specifičnošću fraktalna analiza bi mogla predstavljati važan dodatak ovim fiziološkim parametrima u eksperimentalnoj nefrologiji.

U našoj studiji je takođe detektovano statistički značajno smanjenje strukturne kompleksnosti nukleusnog hromatina ćelija makule denze. Smanjenje fraktalne dimenzije je uočeno već u grupi životinja starih 10 dana, a starije životinje su imale još izraženiji pad fraktalne kompleksnosti. Za razliku od rezultata vezanih za hromatin proksimalnih tubulskih ćelija, ovi nalazi se teško mogu objasniti akumulacijom DNK oštećenja.

Makula denza (Macula densa, Pars maculata tubuli distalis nephroni) je struktura koja se nalazi u zidu distalnog tubula u neposrednoj blizini vaskularnog pola glomerula. Sastavljena je od

grupe epitelijalnih ćelija sa jedrima koja imaju relativno veliku količinu heterohromatina (zbog toga se na standardnim histološkim preparata vidi tamnije-gušće nego ostale strukture u bubregu). Ove ćelije imaju veoma važnu ulogu u regulaciji glomerulske filtracije) (Aoyagi et al. 2008; Tanaka et al. 2010; Oppermann et al. 2006).

Kada veličina glomerulska filtracija opadne, smanji se brzina proticanja tečnosti kroz tubulski sistem. Ovo dovodi do povećanja resorpcije natrijum hlorida i smanjenja njegove koncentracije u tubulskoj tečnosti. Ćelije makule denze imaju sposobnost da detektuju ovaj pad u koncentraciji natrijum hlorida i da, kao posledica toga, upute signal jukstaglomerulskim ćelijama da luče renin (Aoyagi et al. 2008; Tanaka et al. 2010; Oppermann et al. 2006). Renin ima enzimsku aktivnost u reakciji pretvaranja angiotenzinogena u angiotenzin, što ima za rezultat vazokonstrikciju eferentne arteriole u okviru glomerulskog sistema. Ova vazokonstrikcija eferentne arteriole uz vazodilataciju aferentne arteriole izazvane za sada nepoznatim medijatorom iz ćelija makule denze, ima za posledicu povećanje hidrostatskog pritiska u glomerulu i povećanje glomerulske filtracije. Drugim rečima, pad glomerulske filtracije pokreće složeni mehanizam koji dovodi do njenog povećanja, odnosno vraćanja na normalu (Oppermann et al. 2006; Aoyagi et al. 2008; Tanaka et al. 2010; Huang et al. 2012).

Analogan, suprotan proces se dešava i kada glomerulska filtracija poraste. Ćelije makule denze u ovom slučaju dovode do smanjenja lučenja renina, što uz ostale mehanizme dovodi do pada hidrostatskog pritiska u glomerulu. Ovaj celokupni proces se još naziva tubuloglomerulska povratna sprega i od ključne je važnosti za

autoregulaciju glomerulske filtracije. (Aoyagi et al. 2008; Tanaka et al. 2010; Oppermann et al. 2006).

Naši rezultati vezani za ćelije makule denze su od potencijalno velikog naučnog značaja iz nekoliko razloga. Prvo, naša studija je do sada prva u svetu koja je primenila metode fraktalne i teksturalne analize u kvantifikovanju strukturnih promena u ovim ćelijama. Pokazano je da je moguće pratiti promene u hromatinskoj arhitekturi i pored toga što se ove ćelije odlikuju velikim procentom heterohromatina, što njihova jedra čini drugačijim u odnosu na druge ćelijske populacije u bubregu pri standardnim bojenjima.

Drugo, ovo je prva studija koja je pokazala da se tokom procesa starenja uopšte dešavaju bilo kakve promene u strukturalnoj organizaciji ćelija makule denze. Kao što je ranije rečeno, većina dosadašnjih studija vezanih za starenje urinarnog sistema je bila fokusirana na promene u fiziološkim parametrima (npr. veličina glomerulske filtracije). Studije orjentisane na praćenje histoloških promena su uglavnom ispitivale promene u broju i veličini nefrona. Pregledom dostupne literature, nismo našli nijedan rad koji se odnosio na starosne strukturne promene u ćelijama makule denze.

#### **4.12. Promene u tkivnoj i celularnoj fraktalnoj organizaciji jetre tokom postnatalnog razvoja i starenja**

Naši rezultati vezani za ispitivanje tkivne kompleksnosti jetre su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na tkivu timusa i bubrega. Detektovano je statistički značajno smanjenje fraktalne dimenzije

jetrinih lobulusa. Ovo smanjenje je bilo izraženo u svim grupama u poređenju sa grupom novorođenih miševa. Takođe, slično smanjenje strukturne kompleksnosti nađeno je u hromatinskoj strukturi hepatocita, odnosno, fraktalna dimenzija jetrinog tkiva je korelirala sa frkatalnom dimenzijom hromatina u hepatocitima.

Osnovna morfološka jedinica jetrinog parenhima je lobulus. Lobulusi na poprečnom preseku u većini slučajeva imaju oblik šestougla. Na standardnim histološkim preparatima, uočava se da su lobulusi razdvojeni slojem rasresitog vezivnog tkiva koje čini takozvanu ekstralobularnu stromu. Stroma pored ostalog sadrži krvne sudove (arteriae interlobulares i venae interlobulares) poreklom od arterije hepaticke proprije, odnosno vene porte, kao i žučne kanaliće, limfne sudove i nerve. U centru lobulusa se takođe nalazi krvni sud – vena centralis.

Osnovna funkcionalna jedinica jetrinog parenhima je hepatocit. Hepatociti su na poprečnom preseku u lobulusima organizovani u posebne strukture – lamine koje se pružaju od periferije lobulusa ka centru (jedna lamina se sastoji iz dva reda hepatocita). Na početku lamine (odnosno periferiji lobulusa), nalazi se bazalna membrana. Neposredno uz bazalnu mebranu se nalaze matične ćelije jetrinog tkiva (takozvane ovalne ćelije) koje po potrebi mogu da se dele i diferenciraju u zrele hepatocite. Prema tome, najmlađi hepatociti su u lobulusu lokalizovani na periferiji (blizu bazalne membrane), dok su najstariji lokalizovani blizu vene centralis. Hepatocit u fiziološkim uslovima ima relativno dug životni vek koji iznosi više od pet meseci (Wisse et al. 1996; Schmucker et al. 2005; Gaudio et al. 2005; Warren et al. 2008).

Kapilarna mreža u jetri ima jedinstvene morfološke i funkcionalne karakteristike koje je izdvajaju u poređenju sa vaskularizacijom ostalih parenhimatoznih organa. Kapilari u jetri su tzv. sinusoidnog tipa. Oni imaju nepravilan i širok lumen i bazalnu membranu koja nije kontinuirana kao kod drugih tipova kapilara. Ova diskontinuiranost bazalne membrane omogućava veliku propustljivost zida kapilara. Kao posledica toga, krvna plazma nesmetano ulazi u prostore između sinusoida i hepatocita (Diseovi prostori). Na ovaj način veliki procenat toksičnih materija poreklom iz creva dolazi u kontakt sa hepatocitima koji su sposobni da ih neutrališu i time spreče da se slobodne nađu u sistemske cirkulaciji (Wisse et al. 1996; Schmucker et al. 2005; Warren et al. 2008).

Warren i saradnici su 2008. godine publikovali studiju vezanu za ispitivanje starosnih promena u sinusoidnim kapilarima jetre. Korišćenjem fraktalne analize jetrinog parenhima u Wistar pacova, autori su kvantifikovali kompleksnost granjanja sinusoidalne mreže u mladih i starih životinja. Dobijeni rezultati su ukazali da se parametri fraktalne geometrije kapilara menjaju sa starenjem u smislu smanjenja strukturne kompleksnosti. Sa druge strane, konvencionalni histološki parametri sinusoidalne mreže, kao što su kapilarna gustina, dijametar i površina kapilara, kao i vaskularna disperzija ostali su nepromenjeni sa starenjem (Warren et al. 2008). Ova studija je ukazala na potencijalno visoku senzitivnost fraktalne analize u detektovanju starošću – izazvanih vaskularnih promena u jetri.

Gaudio i saradnici su svojevremeno uradili sličan eksperiment vezan za primenu fraktalne analize u kvantifikovanju tkivne arhitekture jetre. Studija je urađena na Wistar pacovima koji su korišćeni da se napravi eksperimentalni animalni model ciroze. Ovo je postignuto



tretmanom životinja poznatom hepatotoksičnom supstancom ugljentetrahloridom (CCl<sub>4</sub>) u kombinaciji sa barbituratima radi amplifikacije dejstva CCl<sub>4</sub> na jetrin parenhim. Utvrđeno je da se fraktalna dimenzija mikrovaskularne mreže jetrinog tkiva značajno smanjila u životinja sa cirozom u poređenju sa kontrolnom grupom (Gaudio et al. 2005).

Kada se uporede dve gorepomeute studije, može se primetiti da vrednost fraktalne dimenzije, a samim tim i strukturna kompleksnost jetre, trpi mnogo veći pad u cirozi, nego što je to slušaj sa starenjem (čiše od deset procenata u cirozi u poređenju sa svega par procenata u starenju) (Gaudio et al. 2005; Warren et al. 2008). Ovo se može objasniti izraženim strukturnim promenama u jetri tokom ciroze koje su praćene zamenom funkcionalnog parenhima nefunkcionalnim fibroznim vezivnim tkivom. Proliferacija vezivog tkiva takođe utiče na to da konture tkiva, pa samim tim i mikrografa koji ga predstavlja, budu homogenije, odnosno da bude manje prelaza između crnih i belih rezolucionihi jedinica nakon binarizacije slike. Ova homogenizacija mikrografa se može značajno odraziti na kompleksnost slike u smislu smanjenja fraktalne dimenzije.

U našoj studiji, objašnjenje smanjenja strukturne kompleksnosti jetrinog parenhima, odnosno lobulusa je dvojako. Prvo, velika je verovatnoća da su starosne promene u mikrovaskularnoj mreži, odnosno jetrinim sinusoidima dovele do sličnih promena u fraktalnoj dimenziji celokupnog parenhima.

Drugo, treba imati u vidu da drugi deo naših rezultata ukazuje da se fraktalna dimenzija hromatina u individualnim hepatocitima takođe statistički značajno smanjila sa starenjem. Uočili smo da na standardom mikrografu lobulusa dimenzija 1200 x 1600 piksela, sa centrom

postavljenim u nivou vene centralis, više od dvadeset procenata celokupne površine zahvataju jedra hepatocita. Ovaj procenat se teoretski može izračunati kako za jetru, tako i za ostala ispitivana tkiva uz pomoć savremenog softvera za obradu slike. Takođe, kada smo uporedili vrednosti tkivne fraktalne dimenzije, sa vrednostima hepatocitne hromatinske fraktalne dimenzije, detektovali smo statistički visoko signifikantnu pozitivnu korelaciju. Drugim rečima, što je vrednost fraktalne dimenzije hromatina veća, to je i vrednost tkivne fraktalne dimenzije veća i obrnuto.

S obzirom na to da je fraktalna dimenzija relativno egzaktna metoda, vrednosti fraktalne dimenzije (kao i većine ostalih parametara u našoj studiji) su bile homogene sa veoma malim standardnim devijacijama (koeficijent varijacije u većini slučajeva nije prelazio 15%). Takođe, vrednosti fraktalne dimenzije su pratile normalnu distribuciju. Ovo je omogućilo ne samo da se ispita postojanje proste korelacije u našoj studiji, nego i ispitivanje potencijalne linearne povezanosti. I zaista, utvrđeno je da je tkivna fraktalna dimenzija u statistički visoko značajnoj linearnoj korelaciji sa prosečnom hromatinskom fraktalnom dimenzijom hepatocita (za detalje videti grafik). Detaljnijom regresionom analizom može se odrediti jednačina koja matematički oslikava ovaj odnos.

Naravno, treba imati u vidu da korelacija kao statistički test detektuje samo postojanje i jačinu povezanosti (u ovom slučaju i linearnu prirodu), ali ne i uzročno - posledičnu vezu između dva parametra. Da bi se detektovala uzročno - posledična veza, potrebno je odrediti mnogobrojne faktore (confounding factors) koji takođe mogu uticati na jedan ili drugi ispitivani parametar.

Ipak, u našoj studiji, postoji više razloga da verujemo da je uočena starosno - zavisna promena tkivne kompleksnosti jetre prvenstveno uzrokovana promenama u hromatinskoj kompleksnosti hepatocita, a mnogo manje promenama u tkivnoj organizaciji (kompleksnost sinusoidnih kapilara) ili međućelijskoj komunikaciji. Kao što je gore navedeno, glavni razlog za ovu pretpostavku je postojanje veoma jake korelacije između dve fraktalne dimenzije. Drugi razlog je relativno velika površina koju individualne hromatinske strukture zahvataju na tkivnom mikrografu, o odnosu na dimenzije i površinu celog mikrografa.

Smanjenje hromatinske kompleksnosti individualnih hepatocita tokom starenja se može objasniti na sličan način kao i detektovane promene u bubregu. Hepatociti su u toku celog života kontinuirano izloženi dejstvu raznih toksičnih supstanci od kojih mnoge imaju mutageno dejstvo na DNK. Kao i u ostalim ćelijama, i u hepatocitima se progresivno akumulira DNK oštećenje koje može, ali i ne mora dovesti do poremećaja funkcionisanja ćelije (Vinken et al. 2009; Liu et al. 2010).

#### **4.13. Razlike između ispitivanih tkiva u pogledu dinamike i stepena promena strukturne kompleksnosti**

U našem radu, detektovano je starosno-zavisno smanjenje fraktalne dimenzije većini ispitivanih tkiva. Ovaj rezultat je u skladu sa nalazima ranijih studija koje su utvrdile da biološki sistemi generalno sa starošću gube kako strukturnu tako i funkcionalnu kompleksnost

(Lipsitz & Goldberger, 1992; Goldberger et al. 2002; Lipsitz, 2004; Zhang et al. 2007; Shamir et al. 2009).

Međutim, treba imati u vidu da uočene promene fraktalne dimenzije nisu bile podjednako izražene u svim tkivima, kao ni u svim ćelijskim populacijama. Na primer, u korteksu timusa fraktalna dimenzija se smanjila sa vrednosti 1.790 (kod novorođenih životinja) na vrednost 1.442 (u grupi najstarijih miševa), što predstavlja pad od 19.4%. Sa druge strane, ovaj pad fraktalne dimenzije u lobulusima jetre bio je značajno manji – svega 9.6%. Naša je pretpostavka da je ovako veliki pad kompleksnosti u timusu posledica zamene funkcionalnog parenhima fibroznim vezivnim tkivom koji se dešava tokom starosne atrofije i involucije ovog organa. Jetrin parenhim, sa druge strane se odlikuje visokom sposobnošću regeneracije, pa njegova citoarhitektura trpi manje izražene promene tokom starenja.

Još jedan rezultat koji bi po našem mišljenju trebalo posebno istaći je starosno-zavisno povećanje teksturalne entropije hromatina eritroidnih prekurzorskih ćelija u subkapsularnom hematopoeznom tkivu slezine. Ovo je jedina ispitivana ćelijska populacija u kojoj je uočena promena GLCM parametara hromatina sa starenjem. Sa druge strane, hromatinska fraktalna dimenzija eritroidnih prekurzora nije se značajno menjala. Nameće se zaključak da se hromatin progenitorskih, (odnosno matičnih) ćelija značajno razlikuje o poređenju sa ostalim ćelijama u organizmu u pogledu dinamike i stepena starosnih promena strukturne kompleksnosti. Takođe, postoji mogućnost da je visok stepen heterohromatina u eritroidnim prekurzorima doprineo tome da jedra ovih ćelija ispoljavaju jedinstvene fraktalne i teksturalne karakteristike.

#### **4.14. Budućnost primene fraktalne i teksturalne analize u molekularnoj medicini**

Fraktalna i teksturalna analiza su relativno nove metode koje su u naučno-istraživačkom radu u molekularnoj medicini počele da se široko primenjuju tek u poslednjih nekoliko godina. Kada je u pitanju primena ovih tehnika u analizi ćelijskog jedra, u budućnosti će biti potrebno razjasniti nekoliko značajnih nedoumica.

Prvo, još uvek se ne zna da li i na koji način vrednost fraktalne dimenzije, ili nekog GLCM parametra hromatinske strukture oslikava sveukupnu transkripcionu aktivnost jedra ćelije, odnosno da li promena u nekom od ovih parametra ukazuje na promenjen nivo genske ekspresije. Ranijim studijama je utvrđeno da euhromatin generalno ima veću vrednost fraktalne dimenzije od heterohromatina, međutim, ova činjenica nije dovoljan dokaz o potencijalnoj primenljivosti ove metode u evaluaciji transkripcione aktivnosti jedra.

Drugo, ostaje da se odgovori na pitanje da li su fraktalna i teksturalna analiza kao metode dovoljno senzitivne da detektuju akumulaciju DNK oštećenja tokom starenja u svim ćelijama i tkivima. Naši rezultati u *in vitro* delu studije ukazuju da se lakunarnost jedra u ćelijskoj kulturi menja nakon indukcije DNK oštećenja UV zračenjem, međutim kada je fraktalna analiza primenjena u ekperimentu na oglednim životinjama, lakunarnost hromatina se u većini slučajeva nije značajno menjala.

Sa druge strane, u mnogim analiziranim ćelijskim populacijama došlo je do smanjenja fraktalne dimenzije hromatina sa starenjem. Ovaj rezultat ukazuje na potencijalni veliki značaj intrinzič faktora u

starosno-zavisnom smanjenju funkcije tkiva kojima ove ćelije pripadaju. Međutim, u našoj studiji nije bilo moguće utvrditi koji konkretno od ovih faktora- akumulacija DNK oštećenja ili epigenetske promene, je više odgovoran za smanjenje kompleksnosti hromatina. Drugim rečima, još uvek se ne zna kolika je minimalna promena u genetskom materijalu koju su fraktalna i teksturalna analiza sposobne da detektuju. Pretpostavljamo da će u budućnosti biti potrebno kombinovati ovaj pristup sa drugim metodama molekularne genetike da bi se odgovorilo na ova pitanja.

Konačno, u nekoj budućoj studiji, biće potrebno definitivno utvrditi da li su fraktalna i teksturalna analiza senzitivnije od konvencionalnih citofluorometrijskih metoda u detektovanju promena u ćelijskom jedru koje se dešavaju tokom rane faze programirane ćelijske smrti. Pored kulture kancerskih ćelija koja je korišćena u našoj studiji, ovu senzitivnost bi trebalo ispitati i na drugim ćelijskim kulturama koje se danas često koriste u molekularnoj biologiji.

U svakom slučaju, fraktalna i teksturalna analiza su savremene i egzaktne metode koje se sa uspehom mogu primeniti u skoro svim granama medicine. Naša studija predstavlja početni korak u aplikaciji ovih metoda u fiziologiji starenja, a pretpostavljamo da će u budućnosti, one postati značajan dodatak konvencionalnim biološkim tehnikama koje se koriste u naučno-istraživačkom radu u ovoj oblasti.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Fraktalna kompleksnost nukleusnog hromatina merena vrednostima fraktalne dimenzije se smanjuje u postnatalnom razvoju i starenju u ćelijskim populacijama kortikalnih i medularnih limfocita timusa, epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega, ćelija makule denze, kao i u hepatocitima jetre. U ćelijskim populacijama timusnih stromalnih ćelija, bubrežnih epitelih ćelija distalnih tubula i sabirnih kanalića, kao i folikularnim ćelijama i eritroidnim prekurzorskim ćelijama slezine, fraktalna kompleksnost nukleusnog hromatina se ne menja tokom života.

2. Teksturalna neuređenost nukleusnog hromatina eritroidnih prekurzorskih ćelija hematopoeznog tkiva slezine, merena GLCM entropijom, se povećava sa starenjem. U svim ostalim analiziranim ćelijskim populacijama parametri hromatinske teksture se ne menjaju.

3. U postnatalnom razvoju i starenju postoji značajno smanjenje fraktalne komplektnosti tkivne arhitekture merene fraktalnom dimenzijom u korteksu i meduli timusa, korteksu i meduli bubrega, hematopoeznom tkivu slezine i lobulusima jetre.

4. Parametri teksturalne analize tkivne arhitekture sa starenjem ostaju nepromenjeni u svim ispitivanim tkivima.

5. Fraktalna dimenzija tkivne arhitekture statistički značajno korelira sa hromatinskom fraktalnom dimenzijom u većini ispitivanih tkiva, odnosno ćelijskih populacija.

6. Nakon indukcije DNK oštećenja *in vitro*, u ćelijskoj kulturi, dolazi do značajnog smanjenja i celularne fraktalne dimenzije i hromatinske lakunarnosti.



## 6. LITERATURA

1. Abecassis M, Bridges ND, Clancy CJ, Dew MA, Eldadah B, Englesbe MJ, Flessner MF, Frank JC, Friedewald J, Gill J, Gries C, Halter JB, Hartmann EL, Hazzard WR, Horne FM, Hosenpud J, Jacobson P, Kasiske BL, Lake J, Loomba R, Malani PN, Moore TM, Murray A, Nguyen MH, Powe NR, Reese PP, Reynolds H, Samaniego MD, Schmader KE, Segev DL, Shah AS, Singer LG, Sosa JA, Stewart ZA, Tan JC, Williams WW, Zaas DW, High KP. Solid-Organ Transplantation in Older Adults: Current Status and Future Research. *Am J Transplant*. 2012 Sep 7. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04245.x.
2. Afanas'ev I. Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging-Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. *Aging Dis*. 2010 Oct;1(2):75-88.
3. Akhtari M, Giver CR, Ali Z, Flowers CR, Gleason CL, Hillyer CD, Kaufman J, Khoury HJ, Langston AA, Lechowicz MJ, Lonial S, Renfroe HM, Roback JD, Tighiouart M, Vaughn L, Waller EK. Receiver operating characteristic curve analysis of circulating blood dendritic cell precursors and T cells predicts response to extracorporeal photopheresis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Transfusion*. 2010 Nov;50(11):2424-31.
4. Almagor M, Cole RD. Changes in chromatin structure during the aging of cell cultures as revealed by differential scanning calorimetry. *Biochemistry* 1989; 28(13):5688-93

5. Alvarenga AV, Pereira WC, Infantosi AF, Azevedo CM. Complexity curve and grey level co-occurrence matrix in the texture evaluation of breast tumor on ultrasound images. *Med Phys*. 2007 Feb;34(2):379-87.
6. Ameyar-Zazoua M, Rachez C, Souidi M, Robin P, Fritsch L, Young R, Morozova N, Fenouil R, Descostes N, Andrau JC, Mathieu J, Hamiche A, Ait-Si-Ali S, Muchardt C, Batsché E, Harel-Bellan A. Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Sep 9;19(10):998-1004. doi: 10.1038/nsmb.2373.
7. Anantharaju A, Feller A, Chedid A. Aging Liver. A review. *Gerontology*. 2002 Nov-Dec;48(6):343-53.
8. Aoyagi T, Izumi Y, Hiroyama M, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Sanbe A, Miyazaki H, Fujiwara Y, Nakayama Y, Kohda Y, Yamauchi J, Inoue T, Kawahara K, Saito H, Tomita K, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Jul;295(1):F100-7.
9. Appay V, Sauce D, Prelog M. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging (Albany NY)*. 2010 Mar 20;2(2):78-81.
10. Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, Hammann A, Bataille A, Martin L, Yan KP, Fenaux P, Losson R, Solary E, Bastie JN, Delva L. Transcription intermediary factor 1 $\gamma$  is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2361-70. doi: 10.1172/JCI45213.

11. Aw D, Silva AB, Maddick M, von Zglinicki T, Palmer DB. Architectural changes in the thymus of aging mice. *Aging Cell*. 2008 Mar;7(2):158-67.
12. Azemin MZ, Kumar DK, Wong TY, Wang JJ, Mitchell P, Kawasaki R, Wu H. Age-related rarefaction in the fractal dimension of retinal vessel. *Neurobiol Aging*. 2012 Jan;33(1):194.e1-4.
13. Bai Y, Chu VB, Lipfert J, Pande VS, Herschlag D, Doniach S. Critical assessment of nucleic acid electrostatics via experimental and computational investigation of an unfolded state ensemble. *J Am Chem Soc*. 2008 Sep 17;130(37):12334-41.
14. Bancaud A, Huet S, Daigle N, Mozziconacci J, Beaudouin J, Ellenberg J. Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J* 2009; 28(24):3785-98.
15. Baum T, Joseph GB, Nardo L, Virayavanich W, Arulanandan A, Alizai H, Carballido-Gamio J, Nevitt MC, Lynch J, McCulloch CE, Link TM. MRI-based knee cartilage T2 measurements and focal knee lesions correlate with BMI - 36 month follow-up data from the Osteoarthritis initiative. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012 May 23. doi: 10.1002/acr.21741.
16. Beck LH. The aging kidney. Defending a delicate balance of fluid and electrolytes. *Geriatrics*. 2000 Apr;55(4):26-8, 31-2
17. Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D, Rossi DJ. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage

potential during aging by a mechanism of clonal expansion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 23;107(12):5465-70.

18. Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, He B, Biermann K, Lange JF, van der Burg M, van Dongen JJ, van Zelm MC. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. Blood. 2011 Aug 25;118(8):2150-8.
19. Beyer M, Thabet Y, Müller RU, Sadlon T, Classen S, Lahl K, Basu S, Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Krebs W, Schönfeld EA, Böttcher J, Golovina T, Mayer CT, Hofmann A, Sommer D, Debey-Pascher S, Endl E, Limmer A, Hippen KL, Blazar BR, Balderas R, Quast T, Waha A, Mayer G, Famulok M, Knolle PA, Wickenhauser C, Kolanus W, Schermer B, Bluestone JA, Barry SC, Sparwasser T, Riley JL, Schultze JL. Repression of the genome organizer SATB1 in regulatory T cells is required for suppressive function and inhibition of effector differentiation. Nat Immunol. 2011 Aug 14;12(9):898-907.
20. Bocker MT, Hellwig I, Breiling A, Eckstein V, Ho AD, Lyko F. Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging. Blood. 2011 May 12;117(19):e182-9.
21. Boggs DR, Patrene KD. Hematopoiesis and aging III: Anemia and a blunted erythropoietic response to hemorrhage in aged mice. Am J Hematol. 1985 Aug;19(4):327-38.
22. Boiret N, Kanold J, Bons JM, Rapatel C, Halle P, Tournilhac O, Guilhouard L, Guérin JJ, Travade P, Demeocq F, Bonhomme J,

Berger MG. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood CD34+ cells from children contain the same levels of long-term culture-initiating cells producing the same numbers of colony-forming cells as those from adults, but display greater in vitro monocyte/macrophage potential. *Br J Haematol.* 2001 Mar;112(3):806-13.

23. Borys P, Krasowska M, Grzywna ZJ, Djamgoz MB, Mycielska ME. Lacunarity as a novel measure of cancer cells behavior. *Biosystems* 2008; 94(3):276-81.
24. Brennan KA, Kaufman S, Reynolds SW, McCook BT, Kan G, Christiaens I, Symonds ME, Olson DM. Differential effects of maternal nutrient restriction through pregnancy on kidney development and later blood pressure control in the resulting offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Jul;295(1):R197-205. Epub 2008 May 14.
25. Burgos JD. Fractal representation of the immune B cell repertoire. *Biosystems.* 1996;39:19-24.
26. Carballido-Gamio J, Link TM, Majumdar S. New techniques for cartilage magnetic resonance imaging relaxation time analysis: texture analysis of flattened cartilage and localized intra- and inter-subject comparisons. *Magn Reson Med.* 2008 Jun;59(6):1472-7
27. Carey JR. Theories of life span and aging. In: *Physiological Basis of Aging and Geriatrics* (3rd ed.), edited by Timiras PS. Boca Raton, FL: CRC, 2003, p. 85–95

28. Castellanos NP, Martínez E, Gutierrez J. Improving osteoporosis diagnosis in children using image texture analysis. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2011;2011:6184-7.
29. Castelli C, Losa GA. Ultrastructural complexity of nuclear components during early apoptotic phases in breast cancer cells. *Anal Cell Pathol.* 2001;23(1):1-9
30. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):455-65.
31. Chandra T, Kirschner K, Thuret JY, Pope BD, Ryba T, Newman S, Ahmed K, Samarajiwa SA, Salama R, Carroll T, Stark R, Janky R, Narita M, Xue L, Chicas A, Nñez S, Janknecht R, Hayashi-Takanaka Y, Wilson MD, Marshall A, Odom DT, Babu MM, Bazett-Jones DP, Tavaré S, Edwards PA, Lowe SW, Kimura H, Gilbert DM, Narita M. Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. *Mol Cell.* 2012 Jul 27;47(2):203-14.
32. Chappard D, Legrand E, Haettich B, Chalès G, Auvinet B, Eschard JP, Hamelin JP, Baslé MF, Audran M. Fractal dimension of trabecular bone: comparison of three histomorphometric computed techniques for measuring the architectural two-dimensional complexity. *Journal of Pathology.* 2001 Nov; 195 (issue 4) : 515 - 21.
33. Chaudhuri B, Sarkar N. Texture Segmentation Using Fractal Dimension. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 1995;17(1):72-77.

34. Chen SJ, Lin CH, Chang CY, Chang KY, Ho HC, Hsiao SH, Lin CW, Tzeng JE, Chen YT, Tsai HM. Characterizing the major sonographic textural difference between metastatic and common benign lymph nodes using support vector machine with histopathologic correlation. *Clinical Imaging Journal*. 2012 Jul-Aug;36 (4): 353-9. e2.
35. Choi ES, Strålfors A, Catania S, Castillo AG, Svensson JP, Pidoux AL, Ekwall K, Allshire RC. Factors That Promote H3 Chromatin Integrity during Transcription Prevent Promiscuous Deposition of CENP-A(Cnp1) in Fission Yeast. *PLoS Genet*. 2012 Sep;8(9):e1002985. doi: 10.1371/journal.pgen.1002985.
36. Cicchi R, Kapsokalyvas D, De Giorgi V, Maio V, Van Wiechen A, Massi D, Lotti T, Pavone FS. Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J Biophotonics*. 2010 Jan;3(1-2):34-43.
37. Corcione A, Ferretti E, Bertolotto M, Fais F, Raffaghello L, Gregorio A, Tenca C, Ottonello L, Gambini C, Furtado G, Lira S, Pistoia V. CX3CR1 is expressed by human B lymphocytes and mediates [corrected] CX3CL1 driven chemotaxis of tonsil centrocytes. *PLoS One*. 2009 Dec 29;4(12):e8485. Erratum in: *PLoS One*. 2010;5(1). doi: 10.1371/annotation/50da3cf8-38cb-4985-8875-e41aa03191ba.
38. Corsonello A, Pedone C, Lattanzio F, Cherubini A, Onder G, Corica F, Pranno L, Mari V, Laino I, Garasto S, Antonelli Incalzi R. Pharmacovigilance in the elderly Care study group. Chronic kidney disease and 1-year survival in elderly patients discharged from acute care hospitals: a comparison of three glomerular

filtration rate equations. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011 Jan;26(1):360-4.

39. Cutts JH, Krause WJ. Postnatal development of the spleen in *Didelphis virginiana*. *J Anat*. 1982 Oct;135(Pt 3):601-13.
40. De Haan G, Gerrits A. Epigenetic control of hematopoietic stem cell aging the case of *Ezh2*. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jun;1106:233-9
41. de Oliveira MS, Balthazar ML, D'Abreu A, Yasuda CL, Damasceno BP, Cendes F, Castellano G. MR imaging texture analysis of the corpus callosum and thalamus in amnesic mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011 Jan;32(1):60-6..
42. den Braber I, Mugwagwa T, Vrisekoop N, Westera L, Mögling R, de Boer AB, Willems N, Schrijver EH, Spierenburg G, Gaiser K, Mul E, Otto SA, Ruiter AF, Ackermans MT, Miedema F, Borghans JA, de Boer RJ, Tesselaar K. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity*. 2012 Feb 24;36(2):288-97.
43. Di Ieva A, Matula C, Grizzi F, Grabner G, Trattinig S, Tschabitscher M. Fractal analysis of the susceptibility weighted imaging patterns in malignant brain tumors during antiangiogenic treatment: technical report on four cases serially imaged by 7 T magnetic resonance during a period of four weeks. *World Neurosurg*. 2012 May;77(5-6):785.e11-21.
44. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini Luise C, Schurra C, Garre' M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R,



Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006 Nov 30;444(7119):638-42

45. Diederichs G, Link TM, Kentenich M, Schwieger K, Huber MB, Burghardt AJ, Majumdar S, Rogalla P, Issever AS. Assessment of trabecular bone structure of the calcaneus using multi-detector CT: correlation with microCT and biomechanical testing. *Bone*. 2009 May;44(5):976-83.
46. Dolnik A, Engelmann JC, Scharfenberger-Schmeer M, Mauch J, Kelkenberg-Schade S, Haldemann B, Fries T, Krönke J, Kühn MW, Paschka P, Kayser S, Wolf S, Gaidzik VI, Schlenk RF, Rucker FG, Döhner H, Lottaz C, Döhner K, Bullinger L. Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin-remodeling and splicing. *Blood*. 2012 Sep 13. doi: 10.1182/blood-2011-12-401471.
47. Dorshkind K, Montecino - Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nature Reviews Immunol*. 2009 Jan;9(1):57-62.
48. Ergen AV, Goodell MA. Mechanisms of hematopoietic stem cell aging. *Exp Gerontol*. 2010 Apr;45(4):286-90.
49. Ferro DP, Falconi MA, Adam RL, Ortega MM, Lima CP, de Souza CA, Irene Lorand-Metze I, Metze K. Fractal Characteristics of May-Grunwald-Giemsa Stained Chromatin Are Independent Prognostic Factors for Survival in Multiple Myeloma. *PLoS ONE* 2011; 6: e20706.

50. Fritsche M, Reinholdt LG, Lessard M, Handel MA, Bewersdorf J, Heermann DW. The impact of entropy on the spatial organization of synaptonemal complexes within the cell nucleus. *PLoS One*. 2012;7(5):e36282.
51. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono N, Kubo M, Miya F, Arai Y, Takahashi H, Shirakihara T, Nagasaki M, Shibuya T, Nakano K, Watanabe-Makino K, Tanaka H, Nakamura H, Kusuda J, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Ueno M, Shigekawa Y, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Gotoh K, Ishikawa O, Ariizumi S, Yamamoto M, Yamada T, Chayama K, Kosuge T, Yamaue H, Kamatani N, Miyano S, Nakagama H, Nakamura Y, Tsunoda T, Shibata T, Nakagawa H. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet*. 2012 May 27;44(7):760-4. doi: 10.1038/ng.2291.
52. Funama Y, Awai K, Liu D, Oda S, Yanaga Y, Nakaura T, Kawanaka K, Shimamura M, Yamashita Y. Detection of nodules showing ground-glass opacity in the lungs at low-dose multidetector computed tomography: phantom and clinical study. *J Comput Assist Tomogr*. 2009 Jan-Feb;33(1):49-53.
53. Galavis PE, Hollensen C, Jallow N, Paliwal B, Jeraj R. Variability of textural features in FDG PET images due to different acquisition modes and reconstruction parameters. *Acta Oncol*. 2010 Oct;49(7):1012-6.
54. Gan W, Nie B, Shi F, Xu XM, Qian JC, Takagi Y, Hayakawa H, Sekiguchi M, Cai JP. Age-dependent increases in the oxidative

damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging. *Free Radic Biology Med.* 2012 May 1;52(9):1700-7.

55. Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Gori D, Giuliani C, Mari D, Di Blasio AM, Gentilini D, Vitale G, Collino S, Rezzi S, Castellani G, Capri M, Salvioli S, Franceschi C. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell.* 2012 Sep 12. doi: 10.1111/accel.12005
56. Garinis GA, Uittenboogaard LM, Stachelscheid H, Fousteri M, van Ijcken W, Breit TM, van Steeg H, Mullenders LH, van der Horst GT, Brüning JC, Niessen CM, Hoeijmakers JH, Schumacher B. Persistent transcription-blocking DNA lesions trigger somatic growth attenuation associated with longevity. *Nat Cell Biol.* 2009 May;11(5):604-15.
57. Gaudio E, Chaberek S, Montella A, Pannarale L, Morini S, Novelli G, Borghese F, Conte D, Ostrowski K. Fractal and Fourier analysis of the hepatic sinusoidal network in normal and cirrhotic rat liver. *Journal of Anatomy.* 2005 Aug;207(2):107-15.
58. Gekas C, Rhodes KE, Gereige LM, Helgadottir H, Ferrari R, Kurdistani SK, Montecino-Rodriguez E, Bassel-Duby R, Olson E, Krivtsov AV, Armstrong S, Orkin SH, Pellegrini M, Mikkola HK. Mef2C is a lineage-restricted target of Scl/Tal1 and regulates megakaryopoiesis and B-cell homeostasis. *Blood.* 2009 Apr 9;113(15):3461-71.
59. Gentilini D, Mari D, Castaldi D, Remondini D, Ogliari G, Ostan R, Bucci L, Sirchia SM, Tabano S, Cavagnini F, Monti D,

Franceschi C, Di Blasio AM, Vitale G. Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring. *Age (Dordr)*. 2012. doi: 10.1007/s11357-012-9463-1.

60. Gilmore S, Hofmann-Wellenhof R, Muir J, Soyer HP. Lacunarity analysis: a promising method for the automated assessment of melanocytic naevi and melanoma. *PLoS One* 2009; 13;4(10).
61. Goldberger AL, Peng CK, Lipsitz LA. What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease? *Neurobiol Aging* 2002; 23(1):23-6
62. Gomariz RP, De Cárdenas L, Zapat A. Postnatal development of the splenic white pulp in the golden hamster *Mesocricetus auratus*. I. The periarterial lymphoid sheath (PALS). *Tissue Cell*. 1989;21(3):403-17.
63. Grunwald JE, Ying GS, Maguire M, Pistilli M, Daniel E, Alexander J, Whittock-Martin R, Parker C, Mohler E, Lo JC, Townsend R, Gadegbeku CA, Lash JP, Fink JC, Rahman M, Feldman H, Kusek JW, Xie D, Coleman M, Keane MG; Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group. Association between retinopathy and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease (from the Chronic Renal Insufficiency Cohort [ CRIC ] Study ). *American Journal of Cardiology*. 2012 Jul 15; 110 (2):246-53.
64. Gruver AL, Ventevogel MS, Sempowski GD. Leptin receptor is expressed in thymus medulla and leptin protects against thymic

- remodeling during endotoxemia-induced thymus involution. *J Endocrinol.* 2009 Oct;203(1):75-85.
65. Gui J, Mustachio LM, Su DM, Craig RW. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. *Aging Dis.* 2012 Jun;3(3):280-90.
66. Guo Y, Lübbert M, Engelhardt M. CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. *Stem Cells.* 2003;21(1):15-20.
67. Haralick, R.M., Shanmugam, K. & Dinstein, I. (1973). Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, Cybernetics* 3, 610-621.
68. Harrison LC, Nikander R, Sikiö M, Luukkaala T, Helminen MT, Ryymin P, Soimakallio S, Eskola HJ, Dastidar P, Sievänen H. MRI texture analysis of femoral neck: Detection of exercise load-associated differences in trabecular bone. *J Magn Reson Imaging.* 2011 Dec;34(6):1359-66.
69. Harrison LC, Raunio M, Holli KK, Luukkaala T, Savio S, Elovaara I, Soimakallio S, Eskola HJ, Dastidar P. MRI texture analysis in multiple sclerosis: toward a clinical analysis protocol. *Acad Radiol.* 2010 Jun;17(6):696-707.
70. Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, Köbler S, Wiech T, Grahammer F, Arnold SJ, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Mizushima N, Shaw AS, Walz G, Huber TB. Autophagy influences glomerular disease

susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest.* 2010 Apr;120(4):1084-96.

71. Heino M, Peterson P, Kudoh J, Nagamine K, Lagerstedt A, Ovod V, Ranki A, Rantala I, Nieminen M, Tuukkanen J, Scott HS, Antonarakis SE, Shimizu N, Krohn K. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr 21;257(3):821-5.
72. Hotta N, Otsuka K, Murakami S, Yamanaka G, Kubo Y, Matsuoka O, Yamanaka T, Shinagawa M, Nunoda S, Nishimura Y, Shibata K, Saitoh H, Nishinaga M, Ishine M, Wada T, Okumiya K, Matsubayashi K, Yano S, Ichihara K, Cornélissen G, Halberg F. Fractal analysis of heart rate variability and mortality in elderly community-dwelling people -- Longitudinal Investigation for the Longevity and Aging in Hokkaido County (LILAC) study. *Biomed Pharmacother.* 2005 Oct;59 Suppl 1:S45-8.
73. Huang WH, Hung CC, Yang CW, Huang JY. High correlation between clearance of renal protein-bound uremic toxins (indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate) and renal water-soluble toxins in peritoneal dialysis patients. *Ther Apher Dial.* 2012 Aug;16(4):361-7. doi: 10.1111/j.1744-9987.2012.01068.x.
74. Huber MB, Carballido-Gamio J, Fritscher K, Schubert R, Haenni M, Hengg C, Majumdar S, Link TM. Development and testing of texture discriminators for the analysis of trabecular bone in proximal femur radiographs. *Med Phys.* 2009 Nov;36(11):5089-98.

75. Iglesias-Ara A, Zenarruzabeitia O, Fernandez-Rueda J, Sánchez-Tilló E, Field SJ, Celada A, Zubiaga AM. Accelerated DNA replication in E2F1- and E2F2-deficient macrophages leads to induction of the DNA damage response and p21(CIP1)-dependent senescence. *Oncogene*. 2010 Oct 14;29(41):5579-90.
76. Joseph GB, Baum T, Carballido-Gamio J, Nardo L, Virayavanich W, Alizai H, Lynch JA, McCulloch CE, Majumdar S, Link TM. Texture analysis of cartilage T2 maps: individuals with risk factors for OA have higher and more heterogeneous knee cartilage MR T2 compared to normal controls--data from the osteoarthritis initiative. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):R153.
77. Kaludjerovic GN, Miljkovic D, Momcilovic M, Djinovic VM, Mostarica Stojkovic M, Sabo TJ, Trajkovic V. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int. J. Cancer*. 2005;116:479-486.
78. Kam Y, Karperien A, Weidow B, Estrada L, Anderson AR, Quaranta V. Nest expansion assay: a cancer systems biology approach to in vitro invasion measurements. *BMC Res Notes*. 2009 Jul 13;2:130
79. Kamath AT, Pooley J, O'Keefe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, D'Amico A, Wu L, Tough DF, Shortman K. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *Journal of Immunology*. 2000 Dec 15; 165 (12): 6762-70.
80. Kamminga LM, Bystrykh LV, de Boer A, Houwer S, Douma J, Weersing E, Dontje B, de Haan G. The Polycomb group gene *Ezh2*

prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2170-9.

81. Kanavaros P, Stefanaki K, Rontogianni D, Papalazarou D, Sgantzios M, Arvanitis D, Vamvouka C, Gorgoulis V, Siatitsas I, Agnantis NJ, Bai M. Immunohistochemical expression of p53, p21 / waf1, rb, p 16, cyclin D1, p 27, Ki 67, cyclin A, cyclin B1, bcl2, bax and bak proteins and apoptotic index in normal thymus. *Histology and Histopathology*. 2001 Oct; 16 (4) : 1005-12.
82. Karperien A, Jelinek HF, Leandro JJ, Soares JV, Cesar Jr RM, Luckie A. "Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice". *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*. 2008;2(1):109-122.
83. Karperien A. FracLac for ImageJ, version 2.5. <http://rsbinfo.nih.gov/ij//fraclac/FLHelp/Introductionhtm>. 1999-2007
84. Karperien AL, Jelinek HF, Buchan AM. Box-Counting Analysis of Microglia Form in Schizophrenia, Alzheimer's Disease and Affective Disorder. *Fractals*. 2008;16(2):103.
85. Keller L and Genoud M. Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. *Nature* 389: 958-960,1997.
86. Kemeleva EA, Sinitsyna OI, Kolosova NG, Vasyunina EA, Zharkov DO, Conlon KA, Berrios M, Nevinsky GA. Immunofluorescent detection of 8-oxoguanine DNA lesions in liver cells from aging OXYS rats, a strain prone to overproduction of free radicals. *Mutat Res*. 2006 Jul 25;599(1-2):88-97.



87. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994 Dec 23;266(5193):2011-5
88. Krangel MS. 2009. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 21: 133-9.
89. Kurobe H, Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, Arakaki R, Hayashi Y, Kitagawa T, Lipp M, Boyd RL, Takahama Y. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):165-77.
90. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Sasaki T, Niikura K, Narita M, Miyashita K, Imai S, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T, Suzuki T, Narita M. Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. *Synapse Journal*. 2010 Aug;64(8):611-6.
91. Lai PK, Hsieh CM, Lin ST. Rapid determination of entropy and free energy of mixtures from molecular dynamics simulations with the two-phase thermodynamic model. *Phys Chem Chem Phys*. 2012. doi: 10.1039/C2CP42011B.
92. Landini G. Fractals in microscopy. *Journal of Microscopy* 2011;241:1-8.
93. Lata H, Walia L. Ageing: Physiological Aspects. *JK Science* 2007; 9:111-115.

94. Lebedev DV, Filatov MV, Kuklin AI, Islamov AKh, Kentzinger E, Pantina R, Toperverg BP, Isaev-Ivanov VV. Fractal nature of chromatin organization in interphase chicken erythrocyte nuclei: DNA structure exhibits biphasic fractal properties. *FEBS Lett* 2005; 579(6):1465-8
95. Lefebvre JS, Maue AC, Eaton SM, Lanthier PA, Tighe M, Haynes L. The aged microenvironment contributes to the age-related functional defects of CD4 T cells in mice. *Aging Cell*. 2012 Oct;11(5):732-40.
96. Levin ED. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) quenches free radicals and attenuates age-related cognitive decline: opportunities for novel drug development in aging. *Curr Alzheimer Res*. 2005 Apr;2(2):191-6.
97. Li G, Ruan X, Auerbach RK, Sandhu KS, Zheng M, Wang P, Poh HM, Goh Y, Lim J, Zhang J, Sim HS, Peh SQ, Mulawadi FH, Ong CT, Orlov YL, Hong S, Zhang Z, Landt S, Raha D, Euskirchen G, Wei CL, Ge W, Wang H, Davis C, Fisher-Aylor KI, Mortazavi A, Gerstein M, Gingeras T, Wold B, Sun Y, Fullwood MJ, Cheung E, Liu E, Sung WK, Snyder M, Ruan Y. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1-2):84-98.
98. Li X, Pai A, Blumenkrantz G, Carballido-Gamio J, Link T, Ma B, Ries M, Majumdar S. Spatial distribution and relationship of T1rho and T2 relaxation times in knee cartilage with osteoarthritis. *Magn Reson Med*. 2009 Jun;61(6):1310-8
99. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO,

- Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES, Dekker J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009 Oct 9;326(5950):289-93.
100. Lin BN, Whu SW, Chen CH, Hsu FY, Chen JC, Liu HW, Chen CH, Liou HM. Bone marrow mesenchymal stem cells, platelet-rich plasma and nanohydroxyapatite-type I collagen beads were integral parts of biomimetic bone substitutes for bone regeneration. *J Tissue Eng Regenerative Med*. 2012 Jun 28. doi: 10.1002/term.1472.
101. Linder N, Konsti J, Turkki R, Rahtu E, Lundin M, Nordling S, Haglund C, Ahonen T, Pietikäinen M, Lundin J. Identification of tumor epithelium and stroma in tissue microarrays using texture analysis. *Diagn Pathol*. 2012 Mar 2;7:22.
102. Lipsitz LA and Goldberger AL. Loss of complexity and aging. *JAMA*, 1992; 267:1806.
103. Lipsitz LA. Physiological complexity, aging, and the path to frailty. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004; 2004(16):pe16
104. Liska V, Treska V, Mirka H, Benes J, Vycital O, Bruha J, Pitule P, Skalicky T, Sutnar A, Chlumska A, Racek J, Trefil L, Finek J, Holubec L. Immediately preoperative use of biological therapy does not influence liver regeneration after large resection--porcine experimental model with monoclonal antibody against epidermal growth factor. *In Vivo*. 2012 Jul;26(4):683-91.

105. Liu HH, Lu P, Guo Y, Farrell E, Zhang X, Zheng M, Bosano B, Zhang Z, Allard J, Liao G, Fu S, Chen J, Dolim K, Kuroda A, Usuka J, Cheng J, Tao W, Welch K, Liu Y, Pease J, de Keczser SA, Masjedizadeh M, Hu JS, Weller P, Garrow T, Peltz G. An integrative genomic analysis identifies *Bhmt2* as a diet-dependent genetic factor protecting against acetaminophen-induced liver toxicity. *Genome Res.* 2010 Jan;20(1):28-35.
106. Liu W, Das A, Morales R, Banday M, Aris V, Lukac DM, Soteropoulos P, Wah DA, Palenchar J, Bellofatto V. Chromatin immunoprecipitation and microarray analysis reveal that TFIIB occupies the SL RNA gene promoter region in *Trypanosoma brucei* chromosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 2012 Sep 19. pii: S0166-6851(12)00221-6. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.09.003.
107. Lobetti-Bodoni C, Ferrero D, Genuardi E, Passera R, Bernocco E, Sia D, Grignani G, Crisà E, Monitillo L, Rocci A, Drandi D, Gai V, Zanni M, Boi M, Isaia G, Barbero D, Lunghi M, Abruzzese E, Radaelli F, Pini M, Pregno P, Carlo-Stella C, Gaidano G, Boccadoro M, Ladetto M. Telomere loss in Philadelphia-negative hematopoiesis after successful treatment of chronic myeloid leukemia: Evidence for premature aging of the myeloid compartment. *Mech Ageing Development.* 2012 Jul;133(7):479-88.
108. Loh ND, Hampton CY, Martin AV, Starodub D, Sierra RG, Barty A, Aquila A, Schulz J, Lomb L, Steinbrener J, Shoeman RL, Kassemeyer S, Bostedt C, Bozek J, Epp SW, Erk B, Hartmann R, Rolles D, Rudenko A, Rudek B, Foucar L, Kimmel N, Weidenspointner G, Hauser G, Holl P, Pedersoli E, Liang M, Hunter MM, Gumprecht L, Coppola N, Wunderer C, Graafsma H, Maia FR, Ekeberg T, Hantke M, Fleckenstein H, Hirsemann H, Nass K, White

TA, Tobias HJ, Farquar GR, Benner WH, Hau-Riege SP, Reich C, Hartmann A, Soltau H, Marchesini S, Bajt S, Barthelmeß M, Bucksbaum P, Hodgson KO, Strüder L, Ullrich J, Frank M, Schlichting I, Chapman HN, Bogan MJ. Fractal morphology, imaging and mass spectrometry of single aerosol particles in flight. *Nature*. 2012 Jun 27;486(7404):513-7.

109. Loh ND, Hampton CY, Martin AV, Starodub D, Sierra RG, Barty A, Aquila A, Schulz J, Lomb L, Steinbrener J, Shoeman RL, Kassemeyer S, Bostedt C, Bozek J, Epp SW, Erk B, Hartmann R, Rolles D, Rudenko A, Rudek B, Foucar L, Kimmel N, Weidenspointner G, Hauser G, Holl P, Pedersoli E, Liang M, Hunter MS, Gumprecht L, Coppola N, Wunderer C, Graafsma H, Maia FR, Ekeberg T, Hantke M, Fleckenstein H, Hirsemann H, Nass K, White TA, Tobias HJ, Farquar GR, Benner WH, Hau-Riege SP, Reich C, Hartmann A, Soltau H, Marchesini S, Bajt S, Barthelmeß M, Bucksbaum P, Hodgson KO, Strüder L, Ullrich J, Frank M, Schlichting I, Chapman HN, Bogan MJ. Erratum: Fractal morphology, imaging and mass spectrometry of single aerosol particles in flight. *Nature*. 2012 Aug 8. doi: 10.1038/nature11426.
110. Losa GA, Castelli C. Nuclear patterns of human breast cancer cells during apoptosis: characterisation by fractal dimension and co-occurrence matrix statistics. *Cell and Tissue Research* 2005; 322: 257-267.
111. Luc S, Luis TC, Boukarabila H, Macaulay IC, Buza-Vidas N, Bouriez-Jones T, Lutteropp M, Woll PS, Loughran SJ, Mead AJ, Hultquist A, Brown J, Mizukami T, Matsuoka S, Ferry H, Anderson K, Duarte S, Atkinson D, Soneji S, Domanski A, Farley A, Sanjuan-Pla A, Carella C, Patient R, de Bruijn M, Enver T, Nerlov C,

- Blackburn C, Godin I, Jacobsen SE. The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nat Immunol.* 2012 Feb 19;13(4):412-9. doi: 10.1038/ni.2255.
112. Mascaro AA, Mello CA, Santos WP, Cavalcanti GD. Mammographic images segmentation using texture descriptors. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009;2009:3653-6.
113. Matsushita K, Mahmoodi BK, Woodward M, Emberson JR, Jafar TH, Jee SH, Polkinghorne KR, Shankar A, Smith DH, Tonelli M, Warnock DG, Wen CP, Coresh J, Gansevoort RT, Hemmelgarn BR, Levey AS; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Comparison of risk prediction using the CKD-EPI equation and the MDRD study equation for estimated glomerular filtration rate. *JAMA.* 2012 May 9;307(18):1941-51.
114. Mayerhoefer ME, Welsch GH, Riegler G, Mamisch TC, Materka A, Weber M, El-Rabadi K, Friedrich KM, Dirisamer A, Trattng S. Feasibility of texture analysis for the assessment of biochemical changes in meniscal tissue on T1 maps calculated from delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage data: comparison with conventional relaxation time measurements. *Invest Radiol.* 2010 Sep;45(9):543-7.
115. McNally JG, Mazza D. Fractal geometry in the nucleus. *EMBO J* 2010; 29(1):2-3
116. Meirovitch H, Cheluvaram S, White RP. Methods for calculating the entropy and free energy and their application to problems involving protein flexibility and ligand binding. *Curr Protein Pept Sci.* 2009 Jun;10(3):229-43.

117. Milosevic NT, Ristanovic D, Jelinek HF, Rajkovic K.  
Quantitative analysis of dendritic morphology of the alpha and delta retinal ganglion cells in the rat: a cell classification study. *J Theor Biol.* 2009;259:142-150
118. Minami A, Tsuboi I, Harada T, Fukumoto T, Hiramoto M, Koshinaga M, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S.  
Inflammatory biomarker, neopterin, suppresses B lymphopoiesis for possible facilitation of granulocyte responses, which is severely altered in age-related stromal-cell-impaired mice, SCI/SAM. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007 Jan;232(1):134-45.
119. Mirny LA. The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell. *Chromosome Res* 2011;19(1):37-51.
120. Miya M, Maeshima A, Mishima K, Sakurai N, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiromura K, Nojima Y. Age-related decline in label-retaining tubular cells: implication for reduced regenerative capacity after injury in the aging kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Mar 15;302(6):F694-702.
121. Moal F, Chappard D, Wang J, Vuillemin E, Michalak-Provost S, Rousselet MC, Oberti F, and Cal`es.P. Fractal Dimension Can Distinguish Models and Pharmacologic Changes in Liver Fibrosis in Rats. *Hepatology* 2006;36:840-849.
122. Mohd Khuzi A, Besar R, Wan Zaki W, Ahmad N.  
Identification of masses in digital mammogram using gray level co-occurrence matrices. *Biomed Imaging Interv J.* 2009 Jul;5(3):e17.

123. Monti D, De Rossi M, Sorrenti A, Laguzzi G, Gatto E, Stefanelli M, Venanzi M, Luvidi L, Mancini G, Paolesse R. Supramolecular chirality in solvent-promoted aggregation of amphiphilic porphyrin derivatives: kinetic studies and comparison between solution behavior and solid-state morphology by AFM topography. *Chemistry*. 2010 Jan 18;16(3):860-70.
124. Morrot A, Terra-Granado E, Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Milićević NM, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, De Meis J, Takiya CM, Beloscar J, Wang X, Kont V, Peterson P, Bottasso O, Savino W. Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4+CD8+ T cells in severe forms of human disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Aug;5(8):e1268.
125. Mosekilde LI. Age-related changes in vertebral trabecular bone architecture: assessed by a new method. *Bone*. 1988;9:247-250.
126. Muller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB. Deterministic regulation of haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood*. 2002; 100; 1302-9.
127. Mund A, Schubert T, Staeger H, Kinkley S, Reumann K, Kriegs M, Fritsch L, Battisti V, Ait-Si-Ali S, Hoffbeck AS, Soutoglou E, Will H. SPOC1 modulates DNA repair by regulating key determinants of chromatin compaction and DNA damage response. *Nucleic Acids Res*. 2012. doi: 10.1093/nar/gks868
128. Nabarra B, Mulotte M, Casanova M, Godard C, London J. Ultrastructural study of the FVB/N mouse thymus: presence of an



- immature epithelial cell in the medulla and premature involution. *Dev Comp Immunol.* 2001 Apr;25(3):231-43. Erratum in: *Dev Comp Immunol* 2001 Jun-Jul;25(5-6):539-43.
129. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, Dawson S, Lambe T, Liu C, Rodrigues NP, Crockford TL, Cabuy E, Vindigni A, Enver T, Bell JI, Slijepcevic P, Goodnow CC, Jeggo PA, Cornall RJ. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature.* 2007 Jun 7;447(7145):686-90
130. Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y. 2008. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol* 99: 59-94.
131. Nyström T, Osiewacz HD (2004) *Model systems in aging.* Springer, Heidelberg.
132. Ohya T, Kawasaki Y, Hiraga S, Kanbara S, Nakajo K, Nakashima N, Suzuki A, Sugino A. The DNA polymerase domain of pol(epsilon) is required for rapid, efficient, and highly accurate chromosomal DNA replication, telomere length maintenance, and normal cell senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2002 Aug 2;277(31):28099-108.
133. Oppermann M, Mizel D, Huang G, Li C, Deng C, Theilig F, Bachmann S, Briggs J, Schnermann J, Castrop H. Macula densa control of renin secretion and preglomerular resistance in mice with selective deletion of the B isoform of the Na,K,2Cl co-transporter. *Journal of American Nephrology Society.* 2006 Aug;17(8):2143-52.

134. O'Sullivan RJ, Karlseder J. The great unravelling: chromatin as a modulator of the aging process. *Trends Biochem Sci.* 2012 Sep 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22959736.
135. Pantic I, Basta-Jovanovic G, Starcevic V, Paunovic J, Suzic S, Kojic Z, Pantic S. Complexity reduction of chromatin architecture in macula densa cells during mouse postnatal development. *Nephrology.* 2012d:accepted for press.
136. Pantic I, Harhaji-Trajkovic L, Pantovic A, Milosevic NT, Trajkovic V. Changes in fractal dimension and lacunarity as early markers of UV-induced apoptosis. *Journal of theoretical biology.* 2012a; 303: 87-92.
137. Pantic I, Pantic S, Basta-Jovanovic G. Gray level co-occurrence matrix texture analysis of germinal center light zone lymphocyte nuclei: physiology viewpoint with focus on apoptosis. *Microsc Microanal.* 2012b Jun;18(3):470-5.
138. Pantic I, Pantic S, Paunovic J. Aging increases nuclear chromatin entropy of erythroid precursor cells in mice spleen hematopoietic tissue. *Microsc Microanal.* 2012c; 18 (5). DOI: 10.1017/S1431927612001377
139. Pantic I, Pantic S. Germinal Center Texture Entropy as possible indicator of humoral Immune Response: Immunophysiology Viewpoint. *Mol Imaging Biol* 2012; 14 (5): 534-540.
140. Park S, Kim B, Lee J, Goo JM, Shin YG. GGO nodule volume-preserving nonrigid lung registration using GLCM texture analysis. *IEEE Trans Biomed Eng* 2011; 58(10):2885-94.

141. Park S, Kim B, Lee J, Goo JM, Shin YG. GGO nodule volume-preserving nonrigid lung registration using GLCM texture analysis. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2011 Oct;58(10):2885-94.
142. Ptasinska A, Assi SA, Mannari D, James SR, Williamson D, Dunne J, Hoogenkamp M, Wu M, Care M, McNeill H, Cauchy P, Cullen M, Tooze RM, Tenen DG, Young BD, Cockerill PN, Westhead DR, Heidenreich O, Bonifer C. Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding. *Leukemia.* 2012 Aug; 26(8): doi:10.1038/leu.2012.49.
143. Randall L. Adam, Rosana C. Silva, Fernanda G. Pereira, Neucimar J. Leite, Irene Lorand-Metze, Konradin Metz. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Analytical Cellular Pathology* 2006; 28:55-59.
144. Rangayyan RM, Nguyen TM, Ayres FJ, Nandi AK. Effect of pixel resolution on texture features of breast masses in mammograms. *J Digit Imaging.* 2010 Oct;23(5):547-53.
145. Reed DM, Foley DJ, White LR, Heimovitz H, Burchfiel CM, Masaki K. Predictors of healthy aging in men with high life expectancies. *Am J Public Health.* 1998 Oct;88(10):1463-8.
146. Riddle NC, Jung YL, Gu T, Alekseyenko AA, Asker D, Gui H, Kharchenko PV, Minoda A, Plachetka A, Schwartz YB, Tolstorukov MY, Kuroda MI, Pirrotta V, Karpen GH, Park PJ, Elgin SC. Enrichment of HP1a on Drosophila Chromosome 4 Genes Creates an Alternate Chromatin Structure Critical for Regulation in this

Heterochromatic Domain. PLoS Genet. 2012 Sep;8(9):e1002954.  
doi: 10.1371/journal.pgen.1002954.

147. Roberts NA, White AJ, Jenkinson WE, Turchinovich G, Nakamura K, Withers DR, McConnell FM, Desanti GE, Benezech C, Parnell SM, Cunningham AF, Paolino M, Penninger JM, Simon AK, Nitta T, Ohigashi I, Takahama Y, Caamano JH, Hayday AC, Lane PJ, Jenkinson EJ, Anderson G. Rank signaling links the development of invariant  $\gamma\delta$  T cell progenitors and Aire(+) medullary epithelium. *Immunity*. 2012 Mar 23;36(3):427-37.
148. Rochette PJ, Brash DE. Human telomeres are hypersensitive to UV-induced DNA Damage and refractory to repair. *PLoS Genet* 2010 Apr 29;6(4):e1000926
149. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9194-9.
150. Roy HK, Iversen P, Hart J, et al. Down-regulation of SNAIL suppresses MIN mouse tumorigenesis: Modulation of apoptosis, proliferation, and fractal dimension. *Mol Cancer Ther* 2004; 3:1159-1165.
151. Russel D, Hanson J, Ott E. Dimension of strange attractors. *Physical Review Letters*. 1980;45(14):1175-1178.
152. Saitoh T, Morimoto K, Kumagai T, Tsuboi I, Aikawa S, Horie T. Comparison of erythropoietic response to androgen in young and old senescence accelerated mice. *Mech Ageing Dev*. 1999 Aug 30;109(2):125-39.

153. Sataranatarajan K, Feliars D, Mariappan MM, Lee HJ, Lee MJ, Day RT, Yelamanchili H, Choudhury GG, Barnes JL, Van Remmen H, Richardson A, Kasinath BS. Molecular events in matrix protein metabolism in the aging kidney. *Aging Cell*. 2012 Sep 30. doi: 10.1111/accel.12008.
154. Scheibel AB. Falls, motor dysfunction, and correlative neurohistologic changes in the elderly. *Clin Geriatr Med*. 1985;1:671-676.
155. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, Nantel A, Konermann C, Lindroth A, Jäger N, Rausch T, Ryzhova M, Korbel JO, Hielscher T, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bognar L, Ebinger M, Schuhmann MU, Scheurlen W, Pekrun A, Frühwald MC, Roggendorf W, Kramm C, Dürken M, Atkinson J, Lepage P, Montpetit A, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Dong Z, Siegel P, Kulozik AE, Zapatka M, Guha A, Malkin D, Felsberg J, Reifenberger G, von Deimling A, Ichimura K, Collins VP, Witt H, Milde T, Witt O, Zhang C, Castelo-Branco P, Lichter P, Faury D, Tabori U, Plass C, Majewski J, Pfister SM, Jabado N. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012 Jan 29;482(7384):226-31.
156. Seitan VC, et al. 2011. A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature* 476: 467-71.
157. Seli E, Bruce C, Botros L, Henson M, Roos P, Judge K, Hardarson T, Ahlström A, Harrison P, Henman M, Go K, Acevedo N,

- Siques J, Tucker M, Sakkas D. Receiver operating characteristic (ROC) analysis of day 5 morphology grading and metabolomic Viability Score on predicting implantation outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2011 Feb;28(2):137-44.
158. Shamir L, Wolkow CA and Goldberg IG . Quantitative measurement of aging using image texture entropy. *Bioinformatics* 2009; 25: 3060-3063
159. Shim GJ, Wang L, Andersson S, Nagy N, Kis LL, Zhang Q, Mäkelä S, Warner M, Gustafsson JA. Disruption of the estrogen receptor beta gene in mice causes myeloproliferative disease resembling chronic myeloid leukemia with lymphoid blast crisis. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A.* 2003 May 27;100(11):6694-9. Epub 2003 May 9. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 23;103(21):8298.
160. Silva DA, Basso GG, Semenzim VL, Godoy MF, Taboga SR, Andrade AL, Luvizotto MC, Braile DM, Nery JG. Fractal dimension and Shannon's entropy analyses of the architectural complexity caused by the inflammatory reactions induced by highly crystalline poly (vinyl alcohol) microspheres implanted in subcutaneous tissues of the Wistar rats. *J Biomedical Material Res A.* 2012 Jul 25. doi: 10.1002/ jbm.a.34334.
161. Singharoy A, Joshi H, Cheluvaraja S, Miao Y, Brown D, Ortoleva P. Simulating microbial systems: addressing model uncertainty/incompleteness via multiscale and entropy methods. *Methods Mol Biol.* 2012;881:433-67.
162. Sleckman BP. 2005. Lymphocyte antigen receptor gene assembly: multiple layers of regulation. *Immunol Res* 32: 253-8.

163. Strang BL, Boulant S, Chang L, Knipe DM, Kirchhausen T, Coen DM. Human cytomegalovirus UL44 concentrates at the periphery of replication compartments, the site of viral DNA synthesis. *J Virol*. 2012 Feb;86(4):2089-95.
164. Sun L, Brown R, Chen S, Zhuge Q, Su DM. Aging induced decline in T-lymphopoiesis is primarily dependent on status of progenitor niches in the bone marrow and thymus. *Aging (Albany NY)*. 2012 Sep;4(9):606-19.
165. Suttie AW. Histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):466-503
166. Talbert PB, Ahmad K, Almouzni G, Ausió J, Berger F, Bhalla PL, Bonner WM, Cande WZ, Chadwick BP, Chan SW, Cross GA, Cui L, Dimitrov SI, Doenecke D, Eirin-López JM, Gorovsky MA, Hake SB, Hamkalo BA, Holec S, Jacobsen SE, Kamieniarz K, Khochbin S, Ladurner AG, Landsman D, Latham JA, Loppin B, Malik HS, Marzluff WF, Pehrson JR, Postberg J, Schneider R, Singh MB, Smith MM, Thompson E, Torres-Padilla ME, Tremethick DJ, Turner BM, Waterborg JH, Wollmann H, Yelagandula R, Zhu B, Henikoff S. A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin*. 2012 Jun 21;5:7.
167. Tan CO, Cohen MA, Eckberg DL, Taylor JA. Fractal properties of human heart period variability: Physiological and methodological implications. *The Journal of Physiology*. 2009;587(15):3929. DOI: 10.1113 / jphysiol. 2009. 169219
168. Tan LP, Wang M, Robertus JL, Schakel RN, Gibcus JH, Diepstra A, Harms G, Peh SC, Reijmers RM, Pals ST, Kroesen BJ, Kluin PM, Poppema S, van den Berg A. miRNA profiling of B-cell

subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes. *Lab Invest.* 2009 Jun; 89 (6): 708-16.

169. Tanaka M, Asada M, Higashi AY, Nakamura J, Oguchi A, Tomita M, Yamada S, Asada N, Takase M, Okuda T, Kawachi H, Economides AN, Robertson E, Takahashi S, Sakurai T, Goldschmeding R, Muso E, Fukatsu A, Kita T, Yanagita M. Loss of the BMP antagonist USAG-1 ameliorates disease in a mouse model of the progressive hereditary kidney disease Alport syndrome. *J Clin Invest.* 2010 Mar; 120 (3): 768-77.
170. Tanaka S, Maeda S, Hashimoto M, Fujimori C, Ito Y, Teradaira S, Hirota K, Yoshitomi H, Katakai T, Shimizu A, Nomura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J Immunol.* 2010 Aug 15;185(4):2295-305.
171. Teng F, Zhou Y, Jin R, Chen Y, Pei X, Liu Y, Dong J, Wang W, Pang X, Qian X, Chen WF, Zhang Y, Ge Q. The molecular signature underlying the thymic migration and maturation of TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8 thymocytes. *PLoS One.* 2011;6(10):e25567.
172. Thurman RE, Rynes E, Humbert R, Vierstra J, Maurano MT, Haugen E, Sheffield NC, Stergachis AB, Wang H, Vernot B, Garg K, John S, Sandstrom R, Bates D, Boatman L, Canfield TK, Diegel M, Dunn D, Ebersol AK, Frum T, Giste E, Johnson AK, Johnson EM, Kutuyavin T, Lajoie B, Lee BK, Lee K, London D, Lotakis D, Neph S, Neri F, Nguyen ED, Qu H, Reynolds AP, Roach V, Safi A, Sanchez ME, Sanyal A, Shafer A, Simon JM, Song L, Vong S, Weaver M, Yan



- Y, Zhang Z, Zhang Z Lenhard B, Tewari M, Dorschner MO, Hansen RS, Navas PA, Stamatoyannopoulos G, Iyer VR, Lieb JD, Sunyaev SR, Akey JM, Sabo PJ, Kaul R, Furey TS, Dekker J, Crawford GE, Stamatoyannopoulos JA. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):75-82. doi: 10.1038/nature11232.
173. Torres-Mejía G, De Stavola B, Allen DS, Pérez-Gavilán JJ, Ferreira JM, Fentiman IS, Dos Santos Silva I. Mammographic features and subsequent risk of breast cancer: a comparison of qualitative and quantitative evaluations in the Guernsey prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*. 2005 May; 14 (5) : 1052-9.
174. Tsuboi I, Morimoto K, Horie T, Mori KJ. Age-related changes in various hemopoietic progenitor cells in senescence accelerated (SAM-P) mice. *Exp Hematol* 1991;19:874-877.
175. Tuljapurkar SR, McGuire TR, Brusnahan SK, Jackson JD, Garvin KL, Kessinger MA, Lane JT, O' Kane BJ, Sharp JG. Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *J Anat*. 2011 Nov;219(5):574-81. doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01423.x.
176. Vas V, Senger K, Dörr K, Niebel A, Geiger H. Aging of the microenvironment influences clonality in hematopoiesis. *PLoS One*. 2012;7(8):e42080.
177. Vido JR, Adam RL, Lorand-Metze IG, Metzke K. Computerized texture analysis of atypical immature myeloid precursors in

- patients with myelodysplastic syndromes: an entity between blasts and promyelocytes. *Diagn Pathol.* 2011 Sep 29;6:93.
178. Vinken M, Doktorova T, Decrock E, Leybaert L, Vanhaecke T, Rogiers V. Gap junctional intercellular communication as a target for liver toxicity and carcinogenicity. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2009 Jul-Aug;44(4):201-22.
179. Wagner W, Horn P, Bork S, Ho AD. Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche. *Exp Gerontol.* 2008 Nov;43(11):974-80.
180. Wang J, Oliveira RJ, Chu X, Whitford PC, Chahine J, Han W, Wang E, Onuchic JN, Leite VB. Topography of funneled landscapes determines the thermodynamics and kinetics of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 25;109(39):15763-8.
181. Wang J, Sun Q, Morita Y, Jiang H, Gross A, Lechel A, Hildner K, Guachalla LM, Gompf A, Hartmann D, Schambach A, Wuestefeld T, Dauch D, Schrezenmeier H, Hofmann WK, Nakauchi H, Ju Z, Kestler HA, Zender L, Rudolph KL. A differentiation checkpoint limits hematopoietic stem cell self-renewal in response to DNA damage. *Cell.* 2012 Mar 2;148(5):1001-14.
182. Warnick RM, Brewer K, Megown K, Finco M, Schwind B. (2006) Texture Metric Comparison of Manual Forest Stand Delineation and Image Segmentation. [www.fs.fed.us/eng/rsac/RS2006/presentations/warnick.ppt](http://www.fs.fed.us/eng/rsac/RS2006/presentations/warnick.ppt)
183. Warren A, Chaberek S, Ostrowski K, Cogger VC, Hilmer SN, McCuskey RS, Fraser R, Le Couteur DG. Effects of old age on

vascular complexity and dispersion of the hepatic sinusoidal network. *Microcirculation*. 2008 Apr;15(3):191-202.

184. Weinert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol*. 2003 Oct;95(4):1706-16.
185. Weinstein JR, Anderson S. The aging kidney: physiological changes. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010 Jul;17(4):302-7.
186. Wilson A, Laurenti E, Trumpp A. Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2009 Oct;19(5):461-8.
187. Wintermark M, Flanders AE, Velthuis B, Meuli R, van Leeuwen M, Goldsher D, Pineda C, Serena J, van der Schaaf I, Waaijer A, Anderson J, Nesbit G, Gabriely I, Medina V, Quiles A, Pohlman S, Quist M, Schnyder P, Bogousslavsky J, Dillon WP, Pedraza S. Perfusion-CT assessment of infarct core and penumbra: receiver operating characteristic curve analysis in 130 patients suspected of acute hemispheric stroke. *Stroke*. 2006 Apr;37(4):979-85.
188. Wisse E, Braet F, Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbé E, Vermoesen A. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol*. 1996 Jan-Feb;24(1):100-11.
189. Xiao N, Jani K, Morgan K, Okabe R, Cullen DE, Jesneck JL, Raffel GD. Hematopoietic stem cells lacking *Ott1* display aspects associated with aging and are unable to maintain quiescence during proliferative stress. *Blood*. 2012 May 24;119(21):4898-907.

190. Yasar F, Akgünlü F. Fractal dimension and lacunarity analysis of dental radiographs. *Dentomaxillofac Radiol.* 2005 Sep;34(5):261-7.
191. Yogesan K, Jørgensen T, Albregtsen F, Tveter KJ, Danielsen HE. Entropy-based texture analysis of chromatin structure in advanced prostate cancer. *Cytometry.* 1996;24:268-76.
192. Zhang J, Tong L, Wang L, Li N. Texture analysis of multiple sclerosis: a comparative study. *Magn Reson Imaging.* 2008 Oct;26(8):1160-6.
193. Zhang L, Dean D, Liu JZ, Sahgal V, Wang X, Yue GH. Quantifying degeneration of white matter in normal aging using fractal dimension. *Neurobiol Aging* 2007; 28(10):1543-55
194. Zhou W, Otto EA, Cluckey A, Airik R, Hurd TW, Chaki M, Diaz K, Lach FP, Bennett GR, Gee HY, Ghosh AK, Natarajan S, Thongthip S, Veturi U, Allen SJ, Janssen S, Ramaswami G, Dixon J, Burkhalter F, Spöndlin M, Moch H, Mihatsch MJ, Verine J, Reade R, Soliman H, Godin M, Kiss D, Monga G, Mazzucco G, Amann K, Artunc F, Newland RC, Wiech T, Zschiedrich S, Huber TB, Friedl A, Slaats GG, Joles JA, Goldschmeding R, Washburn J, Giles RH, Levy S, Smogorzewska A, Hildebrandt F. FAN1 mutations cause karyomegalic interstitial nephritis, linking chronic kidney failure to defective DNA damage repair. *Nat Genet.* 2012 Jul 8;44(8):910-5.
195. Zhou XJ, Rakheja D, Yu X, Saxena R, Vaziri ND, Silva FG. The aging kidney. *Kidney Int.* 2008 Sep;74(6):710-20.

196. Zubkova I, Mostowski H, Zaitseva M. Up-regulation of IL-7, stromal-derived factor-1 alpha, thymus-expressed chemokine, and secondary lymphoid tissue chemokine gene expression in the stromal cells in response to thymocyte depletion: implication for thymus reconstitution. *J Immunol.* 2005 Aug 15;175(4):2321-30. Erratum in: *J Immunol.* 2006 Aug 15;177(4):2728.
197. Zuklys S, Mayer CE, Zhanybekova S, Stefanski HE, Nusspaumer G, Gill J, Barthlott T, Chappaz S, Nitta T, Dooley J, Nogales-Cadenas R, Takahama Y, Finke D, Liston A, Blazar BR, Pascual-Montano A, Holländer GA. MicroRNAs Control the Maintenance of Thymic Epithelia and Their Competence for T Lineage Commitment and Thymocyte Selection. *J Immunol.* 2012 Sep 12.

Asist. Dr Igor Pantić  
Institut za medicinsku fiziologiju  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu  
Višegradska 26/II, 11000 Beograd  
Tel: +381 11 3607 097; +381 62 1453 999  
igor.pantic@mfub.bg.ac.rs

## BIOGRAFIJA

- Rođen 15. novembra 1983. u Beogradu.
- Desetu gimnaziju 'Mihajlo Pupin' u Beogradu završio 2002. kao najbolji učenik generacije.
- 2002. godine upisao integrisane akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.
- Godine 2003., 2004., 2006. i 2007. dobio Pohvalnicu najboljem studentu (prve, druge, četvrte i pete godine) Medicinskog fakulteta u Beogradu.
- Godine 2008. dobio stipendiju Grada Beograda za talentovane studente.
- Diplomirao 30.09.2008. sa prosečnom ocenom **9.89** (devet, osamdeset devet). Dobitnik nagrade Zaduzbine Nikole Spasića za najboljeg diplomiranog studenta medicine za 2008. g.
- 25. maja 2010. godine odbranio Završni akademski specijalistički rad pod nazivom "Embrionalne i adultne matične ćelije u eksperimentalnoj i kliničkoj fiziologiji".
- Upisao Doktorske studije iz Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu u Beogradu 04.decembra.2008. godine, i položio sve programom predviđene ispite (prosečna ocena 9.75).

- 28.01.2009. izabran za Saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Medicinska Fiziologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu
- 30.03.2011. izabran u zvanje Asistenta za užu naučnu oblast Medicinska Fiziologija.
- Publikovao **15** "in extenso" radova u međunarodnim časopisima sa CC/SCI/SCIE liste, od kojih pet u vrhunskim međunarodnim časopisima kao prvi, odnosno jedini autor (M21 klasifikacija Ministarstva prosvete i nauke po petogodišnjem impakt faktoru).
- Tokom školske 2009/10 i 2010/11 bio mentor za 4 studentska rada izlagana na Međunarodnom kongresu studenata u Novom Sadu.
- Od 2011. godine angažovan kao saradnik na projektima oi-175059 i iii-41027 Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.
- Obavio ukupno 11 recenzija za međunarodne naučne časopise, kao i jednu recenziju za strani naučni projekat (Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Lisbon, Portugal)
- Član sledećih naučnoistraživačkih organizacija i udruženja: Društvo fiziologa Srbije; The New York Academy of Sciences; Scientists Without Borders; The American Society for Cell Biology.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а ИГОР ПАНТИЋ

број уписа 08-DS-MM-05

### Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

ФРАКТАЛНА И ТЕКСТУРАЛНА АНАЛИЗА СТРУКТУРНЕ КОМПЛЕКСНОСТИ НУКЛЕУСНОГ ХРОМАТИНА У ПОСТНАТАЛНОМ РАЗВОЈУ И СТАРЕЊУ

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

Потпис докторанда

У Београду, 07.02.2013



---



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ ИГОР ПАНТИЋ \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ 08-DS-MM-05 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Молекуларна медицина \_\_\_\_\_

Наслов рада ФРАКТАЛНА И ТЕКСТУРАЛНА АНАЛИЗА СТРУКТУРНЕ КОМПЛЕКСНОСТИ  
НУКЛЕУСНОГ ХРОМАТИНА У ПОСТНАТАЛНОМ РАЗВОЈУ И СТАРЕЊУ

Ментор \_\_\_\_\_ Проф. др Гордана Баста-Јовановић \_\_\_\_\_

Коментор \_\_\_\_\_ Проф. др Весна Старчевић \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ ИГОР ПАНТИЋ \_\_\_\_\_


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, \_\_\_\_\_ 07.02.2013 \_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

ФРАКТАЛНА И ТЕКСТУРАЛНА АНАЛИЗА СТРУКТУРНЕ КОМПЛЕКСНОСТИ НУКЛЕУСНОГ ХРОМАТИНА У ПОСТНАТАЛНОМ РАЗВОЈУ И СТАРЕЊУ

која је моје ауторско дело.

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

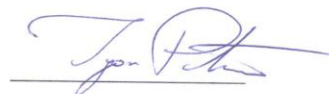
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, 07.02.2013



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.