



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Александра И Величков

**ИНТЕРСТИЦИЈАЛНЕ ЋЕЛИЈЕ КАХАЛА
У ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОМ ТРАКТУ ПАЦОВА
СА ДИЈАБЕТЕСОМ МЕЛИТУСОМ ИЗАЗВАНИМ
СТРЕПТОЗОТОЦИН-НИКОТИНАМИДОМ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Aleksandra I Veličkov

**INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL
IN THE GASTROINTESTINAL TRACT OF RAT
WITH STREPTOZOTOCIN-NICOTINAMIDE
INDUCED DIABETES MELLITUS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2018.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Проф. др Горан Раденковић Катедра за хистологију и ембриологију Медицински факултет, Универзитета у Нишу
Наслов:	Интерстицијалне ћелије Кахала у гастроинтестиналном тракту пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом
Резиме:	<p>Интерстицијалне ћелије Кахала (ИЋК) су ненеуралне ћелије мезенхималног порекла уметнуте између нервних елемената и глатко-мишићних ћелија у гастроинтестиналном тракту (ГИТ). ИЋК су према морфологији, функцији и локализацији подељене у више подтипова. Улога одређених подтипова ИЋК је стварање електричних спорих таласа који су електрофизиолошка основа перисталтике, док остали подтипови ИЋК имају улогу медијатора и модулятора ентеричке моторне неуротрансмисије, механорецептора и одговорни су за адекватно функционисање сфинктера. Механизам дијабетесне гастроентеропатије (ДГ) није у потпуности разјашњен. Симптоми ДГ (гастропареза, успорен интестинални транзит, констипација, фекална инконтиненција) могу се објаснити поремећајима ИЋК узрокованим метаболичким променама у дијабетесу. Циљ истраживања је да се, употребом имунохистохемијских и морфометријских метода, утврди дистрибуција, заступљеност, и морфолошке карактеристике ИЋК у ГИТ-у пацова контролне групе и пацова са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетес мелитусом. Резултати докторске дисертације показали су присуство свих подтипова ИЋК у ГИТ-у пацова контролне групе, са регионалним разликама дистрибуције и заступљености ИЋК. У групи пацова са дијабетесом мелитусом дошло је до значајног дифузног губитка свих подтипова ИЋК у ГИТ-у, док је густина нервних структура остала непромењена.</p>
Научна област:	медицинске науке
Научна дисциплина:	хистологија и ембриологија, патологија
Кључне речи:	Интерстицијалне ћелије Кахала, дијабетес мелитус, гастроинтестинални тракт, стрептозотоцин, никотинамид
УДК:	611.018.1:616.379-008.64:616.33/.34-008.1
CERIF класификација	B440; B480; B 520; B 550
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Professor Goran Radenković, MD.,Ph.D. Department of Histology and Embryology Faculty of Medicine, University of Niš
Title:	Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract of rat with streptozotocin-nicotinamide induced diabetes mellitus
Abstract:	Interstitial cells of Cajal (ICC) are non-neural cells of mesenchymal origin inserted between nerve elements and smooth muscle cells in the gastrointestinal tract (GIT). ICC are necessary for normal function of gastrointestinal (GI) tract and according to their morphology, function and localization, ICC are classified in several subtypes. Certain ICC subtypes serve as source of electrical slow waves which are electrophysiological foundation of peristalsis, while other ICC subtypes are mediators and modulators of enteric motor neurotransmission, mechanoreceptors and are responsible for proper function of GIT sphincters. Mechanism of diabetic gastroenteropathy (DG) is unclear. ICC disorders caused by metabolic changes in diabetes (DM) could explain symptoms of DG (gastroparesis, slow intestinal transit, constipation, fecal incontinence). The aim of research is to determine ICC distribution and morphology in GIT of rats in control group and rats with streptozotocin-nicotinamide induced DM using immunohistochemical and morphometric methods. The results of doctoral dissertation showed that all ICC subtypes are present in the GIT of the rat, with regional distribution and density differences. In the DM group, there was a significant diffuse loss of all subtypes of ICC in GIT, while the density of nerve structures remained unchanged.
Scientific Field:	Medical sciences
Scientific Discipline:	histology and embryology, pathology
Key Words:	Interstitial cells of Cajal, diabetes mellitus, gastro intestinal tract, streptozotocin, nicotinamide
UDC:	611.018.1:616.379-008.64:616.33/.34-008.1
CERIF Classification:	B440; B480; B 520; B 550
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

"Звезде се рађају и умиру у бескрају универзума. Кондензују се као кишне капи из великих облака гаса и прашине. Постају толико вруће да се језгра атома у њима састају да би створили кисеоник који дишемо, угљеник у нашим мишићима, калцијум у нашим костима, гвожђе у нашој крви, све је кувано у ватреним срцима дуго нестале звезде. Ви, ја, сви ... ми смо направљени од звездане прашине." - Neil deGrasse Tison

Наука откључава мистерије тела и универзума, али не може да одговори на кључно питање-шта је смисао живота, а за мене смисао живота је љубав, а љубав то је оно што сте ми показали.

Калини и Миши

Захвалница

Проф. др Горану Раденковићу, ментору и учитељу, искрену захвалност на великој и несебичној помоћи, сугестијама, усмеравању и пренетим знањима, стрпљењу и указаном поверењу у току израде дисертације,

Проф. др Верици Аврамовић, небројано пуно хвала на помоћи, перфекционизму и на непроцењивим пријатељским и стручним саветима током израде дисертације,

Проф. др Душану Соколовићу, дугујем неизмерну захвалност на експерименталном дизајну студије и прикупљеном материјалу, као и на подстицају и подршци,

Проф. др Драгану Михаиловићу, дугујем захвалност за вишегодишњу сарадњу, као и за подршку током израде докторске дисертације,

Проф. др Душану Лалошевићу, дугујем захвалност за научну сарадњу и изузетну срдечност и предусретљивост,

Доц. др Александру Петровићу, Доц. др Владимиру Петровићу неизмерно се захваљујем на вишегодишњем пријатељству, бројним дебатама и домаћинским техничким решењима и помоћи током имунохистохемијске обраде,

Колегама са Катедре за хистологију и ембриологију хвала на јединственој прилици да откријем свет ћелија; Проф. др Маријоли Мојсиловић и Проф. др Горани Ранчић, хвала на подстреку, бројним саветима и пријатељско-мајчинској топлини коју уливају свакодневно у просторије института; Проф. др Ивану Николићу, мом првом учитељу хистологије, хвала што нам је дочарао хистологију на прави начин и предодредио моје стручно усмеравање; асистенту Марку Јовићу, хвала на разумевању, пријатељским саветима и подстицају, као и на замени током обављања редовних дужности; госпођи Марини Ђорђевић дугујем захвалност на саветима и помоћи током израде хистолошких препарата,

најзад, а на првом месту, захваљујем се мојој породици, ћерки Калини, сину Миши, супругу Асену, мајци Ивани и баки Десанки, на подршци, бескрајном стрпљењу и огромном пожртвовању у сатима, данима и ноћима израде ове дисертације.

САДРЖАЈ

1. УВОД	10
1.1. ХИСТОЛОШКА ГРАЂА ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА	12
1.1.1. Хистолошка грађа желуца	15
1.1.2. Хистолошка грађа танког црева	18
1.1.3. Хистолошка грађа дебелог црева	20
1.2. ИНЕРВАЦИЈА ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА	22
1.2.1. Ентерични нервни систем	23
1.2.2. Перисталтичке контракције	26
1.3. РАЗВИЋЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА	28
1.3.1. Развиће желуца	28
1.3.2. Развиће танког црева	29
1.3.3. Развиће дебелог црева	30
1.3.4. Развиће ентеричног нервног система	31
1.4. ИНТЕРСТИЦИЈАЛНЕ ЋЕЛИЈЕ КАХАЛА	32
1.4.1. Историјски преглед	32
1.4.2. Порекло и ембрионално развиће интерстицијалних ћелија Кахала	35
1.4.3. Морфолошке карактеристике, подела и дистрибуција интерстицијалне ћелије Кахала	41
1.4.4. Ултраструктурне карактеристике интерстицијалних ћелија Кахала	45
1.4.5. Функција интерстицијалних ћелија Кахала	49
1.4.6. Идентификација интерстицијалних ћелија Кахала	53
1.4.7. Поремећаји мотилитета гастроинтестиналног тракта узроковани алтерацијама интестиналним ћелијама Кахала	54
1.5. ДИЈАБЕТЕСНА ГАСТРОЕНТЕРОПАТИЈА	55
1.5.1. Интерстицијалне ћелије Кахала у дијабетесу мелитусу	56
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	59
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	61
3.1. Експериментална процедура	61
3.2. Узорковање матерјала	63
3.3. Лабораторијска обрада ткивних узорака	64
3.5. Хисто-морфолошка и морфометријска анализа	66
3.6. Статистичка анализа	67
3.7. Софтверски програми коришћени за обраду података	68
4. РЕЗУЛТАТИ	69
4.1. Вредности гликемије и телесне масе експерименталних група	65
4.2. Хистолошка и морфометријска анализа	72

4.2.1. Присуство и дистрибуција подтипова интерстицијалних ћелија Кахала у различитим анатомским сегментима зида гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе	72
4.2.2. Дистрибуцији интерстицијалних ћелија Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта експерименталне групе пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом	87
4.2.3. Дистрибуцији, морфологији и организацији интрамукуларних подтипова интерстицијалних ћелија Кахала у сфинктерима (кардија и пилорус) у експерименталној групи пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом и у контролној групи.....	98
4.2.4. Морфолошке карактеристике и организација интерстицијалних ћелија Кахала мијентеричног и субмукозног плексуса код групе пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом и контролне групе	103
4.2.5. Дистрибуција нервних структура различитих анатомских сегмената зида гастроинтестиналног тракта контролне и експерименталне групе пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом.....	109
4.2.6. Корелација густине интерстицијалних ћелија Кахала са густином нервних структура контролне и експерименталне групе пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом.....	113
5. ДИСКУСИЈА	116
5.1. ПРИСУСТВО, ДИСТРИБУЦИЈА И ГУСТИНА ИНТЕРСТИЦИЈАЛНИХ ЋЕЛИЈА КАХАЛА У ЗИДУ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА ПАЦОВА КОНТРОЛНЕ ГРУПЕ	116
5.1.1. Интрамукуларне интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе	116
5.1.2. Мијентеричне интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе	117
5.1.3. Остали типови интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе	118
5.1.4. Дистрибуција интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе	119
5.2. ПРИСУСТВО, ДИСТРИБУЦИЈА И ГУСТИНА ИНТЕРСТИЦИЈАЛНИХ ЋЕЛИЈА КАХАЛА У РАЗЛИЧИТИМ СЕГМЕНТИМА ЗИДА ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ МЕЛИТУСОМ ИЗАЗВАНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИН-НИКОТИНАМИДОМ	121
5.2.1. Експериментални модел поремећаја толеранције глукозе и испитивање интерстицијалних ћелија Кахала	121
5.2.2. Дистрибуција интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом.....	122
5.2.3. Патофизиолошки механизам дијабетесне гастроентеропатије због губитка интерстицијалних ћелија Кахала	126
5.3. МЕХАНИЗМИ НАСТАНКА ПРОМЕНА ИНТЕРСТИЦИЈАЛНИХ ЋЕЛИЈА КАХАЛА ИНДУКОВАНИХ ДИЈАБЕТЕСОМ МЕЛИТУСОМ.....	128
6. ЗАКЉУЧЦИ	133
7. ЛИТЕРАТУРА.....	135

Списак коришћених скраћеница

ГИТ-гастроинтестинални тракт	ИТК-ДМП- интерстицијалне ћелије
ИТК-интерстицијалне ћелије Кахала	Кахала дубоког мишићног плексуса
ЕНС- ентерични нервни систем	ВЕНТ- (<i>ventralny emigrating cell</i>)
SCF- <i>stem cell factor</i>	<i>nNOS-neuronal nitric oxide synthases</i>
SF- <i>steel factor</i>	ИПА- интризични аферентни неурони
ЋНГ-ћелије нервног гребена	ИМА-интрамукуларни завршеци
МП- мијентерични плексус	аферентних нервних влакана
СМП- субмукозни плексус	ЦНС- централни нервни систем
ГДНФ- <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>	ХЕ-хематоксилин-еозин
ИТК-МП- интерстицијалне ћелије	ДМ- дијабетес мелитус
Кахала мијентеричног плексуса	ИХХ-имунохистохемија
ИТК-СМП- интерстицијалне ћелије	<i>NF-M-</i> неурофиламент медиум
Кахала субмукозног плексуса	СТЗ-стрептозотцин
ИТК-ИМ- интрамукуларне	НА-никотинамид
интерстицијалне ћелије Кахала	N_A - нумеричка ареална густина
ИТК-ИМЦ- интрамукуларне	V_V -волуменска густина
интерстицијалне ћелије Кахала кружног	%МП-процена степена окружености
мишићног подслоја	ганглиона мијентеричног плексуса
ИТК-ИМЛ- интрамукуларне	интерстицијалним ћелијама Кахала
интерстицијалне ћелије Кахала	<i>IGF-1-insulin like grow factor 1</i>
уздужног мишићног подслоја	НО-1-хем оксигеназа-1
ИТК-СЕП- интерстицијалне ћелије	<i>NOD-non obese diabetic mice</i>
Кахала септе	ГИНМД-гастроинтестиналне
ИТК-СС- интерстицијалне ћелије	неуромукулаторне болести
Кахала субсерозе	МИН-синцицијум глатко мишићних
	ћелије-ИТК-нервни завршеци

1. УВОД

Шећерна болест или дијабетес мелитус је хронични системски поремећај метаболизма глукозе који се карактерише хипергликемијом, док се компликације мотилитета јављају чак код 50-70% оболелих након десетогодишње болести (*Vinik et al., 2003, Boulton et al., 2005, Sfarti et al., 2010*). Гастроентеропатија представља значајни здравствени проблем који је честа компликација дијабетеса мелитуса и може се манифестовати као гастропареза, успорен интестинални транзит, констипација, дијареја и фекална инконтиненција, дисфагија, горушица, абдоминална нелагодност или бол, мучнина и повраћање. Неометани гастроинтестинални покрет или перисталтика имају кључну улогу за ефикасно варење и апсорпција хране и њених састојака. Перисталтички таласи у цревима покрећу кружне и уздужне слојеве глатких мишићних ћелија у различитим сегментима гастроинтестиналног тракта (ГИТ) (*Sanders et al., 2014b*). Иницијација и регулација перисталтике је комплексан процес који, секундарно, поред глатко-мишићних ћелија и ентеричних неурона, укључује ћелије „пејсмејкере” мезенхималног порекла назване интерстицијалне ћелије Кахала (ИЋК). Међусобна интеракција поменутих структура представља хистофизиолошку основу за перисталтичке контракције и нормално функционисање дигестивног тракта (*Kashyap and Farrugia, 2010*). Механизам настанка дијабетесне гастроентеропатије је комплексан и обухвата промене не само на неуронима аутономног нервног система, већ захвата и глија ћелије, глатко мишићне ћелије, ендотел капилара мијентеричног плексуса и ИЋК.

Интерстицијалне ћелије Кахала су морфолошки и функционално „уметнуте“ између елемената ентеричног нервног система и глатких мишићних ћелија мускулатуре гастроинтестиналног тракта. Иако су описане пре више од сто година, тек 1992. године, открићем да ове ћелије испољавају активност рецептора тирозин киназе (*C-kit*) омогућена је њихова имунохистохемијска идентификација, а такође показано је да оне не представљају примитивне нерве, како се до тада сматрало, већ да су то ћелије мезенхималног порекла (*Maeda et al., 1992, Thuneberg, 1999*). Иако ИЋК представљају само 5% ћелијске популације мишићног слоја ГИТ-а, неопходне су за успостављање и адекватно функционисање гастроинтестиналног мотилитета (*Sanders et al., 2014b*). На

основу различитих образаца дистрибуције, локализације, морфолошких и функционалних особина ИТК се класификују на више подтипова. Одређени подтипови ИТК (ИТК субмукозног и мијентеричног плексуса) одговорни су за контролу гастроинтестиналног мотилитета и представљају изворе електричних спорих таласа који су електрофизиолошка основа перисталтике, због чега се ове ћелије називају пејсмејкерима гастроинтестиналне мускулатуре (*Huizinga and Lammers, 2009, Hwang et al., 2009*). Остали ИТК подтипови имају улогу медијатора ентеричке моторне неуротрансмисије (*Ward et al., 2000, Suzuki et al., 2003, Sanders et al., 2014a*) и механорецептора (*Thuneberg and Peters, 2001, Won et al., 2005*). ИТК су веома осетљиве на промене у својој микросредини, поготово на одсуство *steel factor-a*, лиганда Кит рецептоа, који је неопходан за диференцијацију, пролиферацију и опстанак ИТК (*Beckett et al., 2007*).

Дијабетес мелитус утиче на промене ИТК гастроинтестиналног тракта. Имајући у виду значај њихове функције за нормално одвијање перисталтике, губитак и промене у броју, дистрибуцији и морфологији ИТК доприносе симптоматологији дијабетесне гастроентеропатије. Механизам утицаја дијабетеса мелитуса на ИТК није разјашњен. Поремећаји ИТК у дијабетесу могао би бити изазван хипергликемијом и придодатим оксидативним стресом, редукцијом инсулина и сигнализације факторима раста, аутоимним одговором или комбинацијом поменутих фактора, као и нарушавањем равнотеже фактора неопходних за опстанак ИТК (*Huizinga et al., 2009, Ordog, 2008*). За разумевање механизма настанка дијабетесне гастроентеропатије и механизма поремећаја ИТК узрокованим дијабетесом мелитусом тип 2 неопходно је проучити морфолошке промене и промене дистрибуције ИТК у гастроинтестиналном тракту на моделима експерименталних животиња, пошто је узорковање целе дебљине зида ГИТ-а оболелих и контроле код човека неизводљиво и неприступачно, а рутинским биопсијама није захваћен мишићни слој.

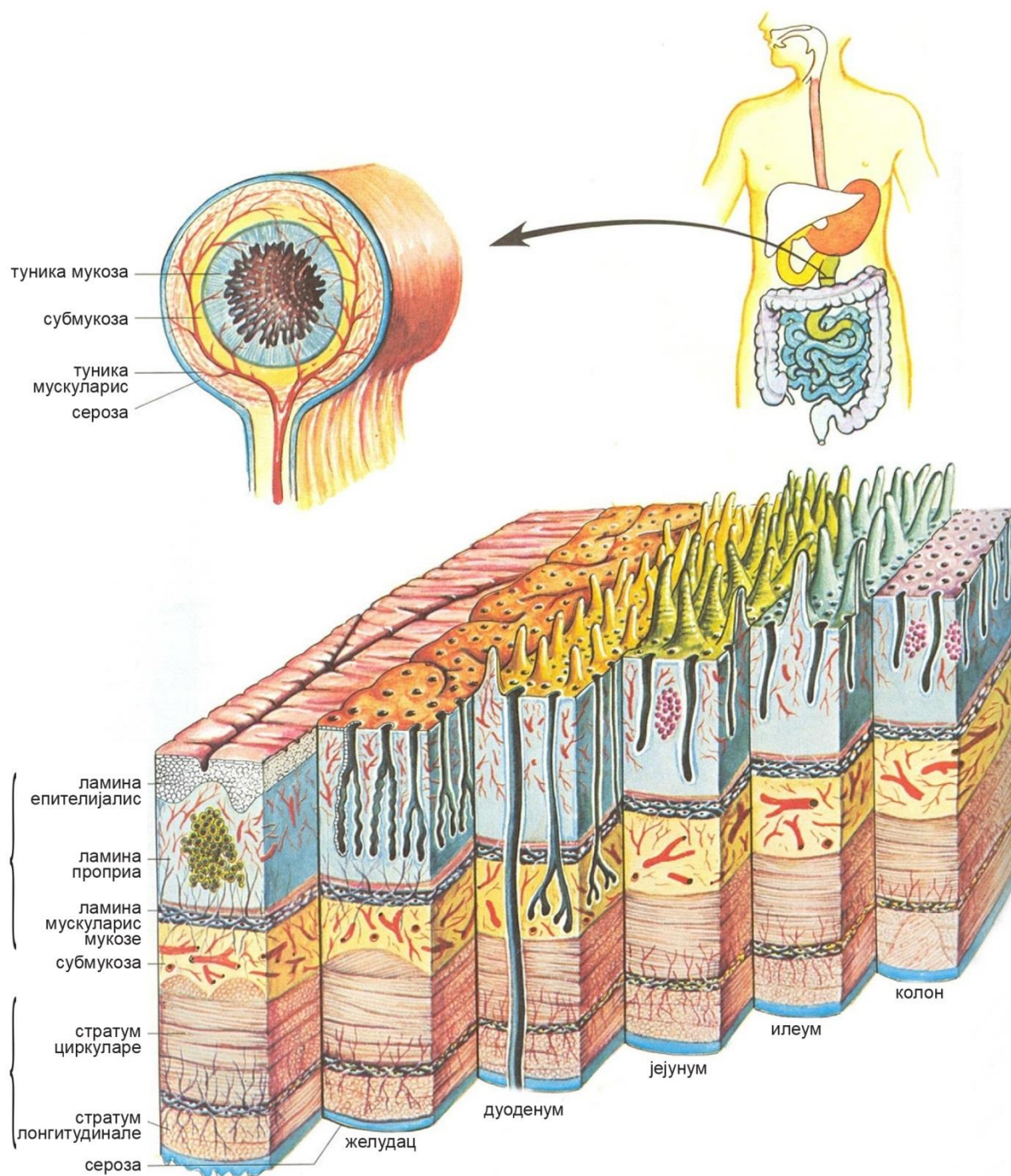
1.1. ХИСТОЛОШКА ГРАЂА ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА

Гастроинтестинални тракт је део дигестивног система облика цеви чија је шупљина различитог дијаметра, а чине га: желудац, танко црево (дуоденум, јејунум и илеум) и дебело црево (цекум са црвуљком, колон, ректум и анални канал). Зидови органа ГИТ-а изграђени су од четири главна слоја: слузокоже (*tunica mucosa*), подслузокоже (*tunica submucosa*), мишићног слоја (*tunica muscularis*) и серозе (*tunica serosa*) (слика 1.). (Stevens and Lowe, 2005).

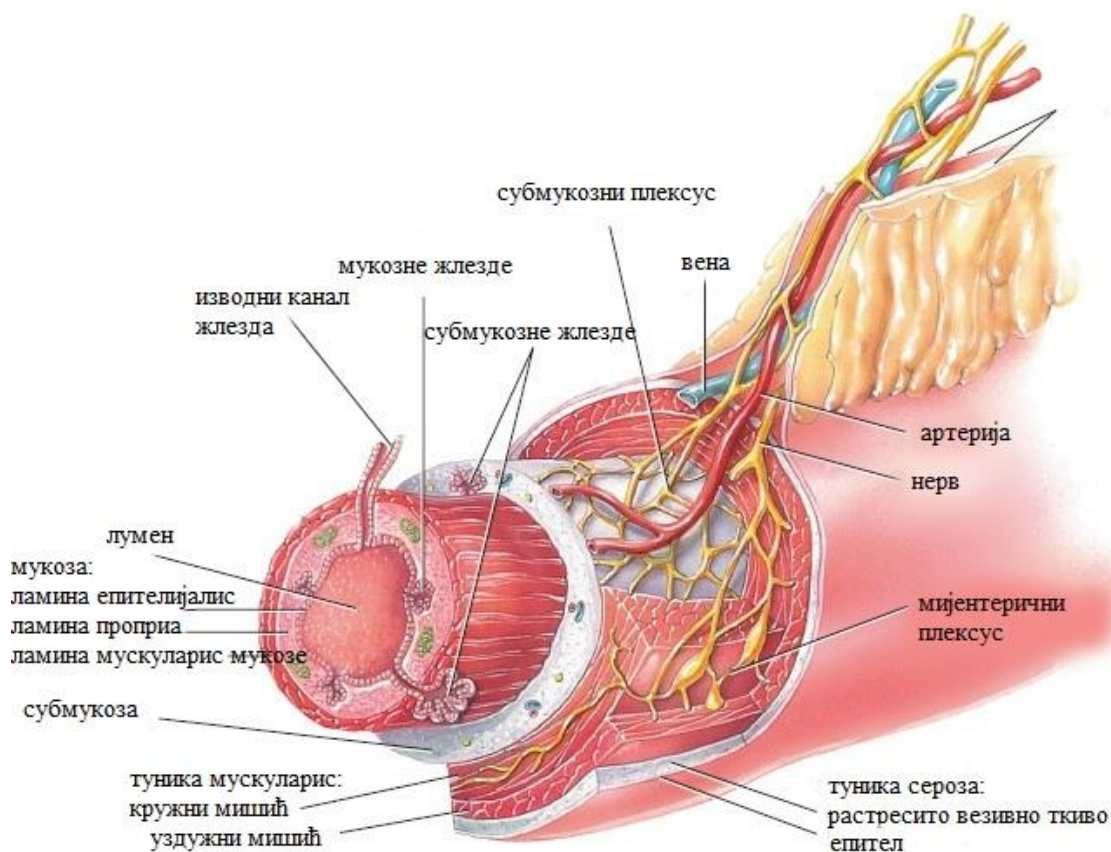
Слузокожа се састоји од покровног једноредног цилиндричног епитела (*lamina epithelialis*), везивног ткива слузокоже (*lamina propria*) и танког мишићног слоја лонгитудинално постављених глаткомишићних ћелија који одваја слузокожу од подслузокоже (*lamina muscularis mucosae*).

Подслузокожа се састоји од густог везивног ткива са много крвних и лимфних судова и субмукозним нервним сплетом (*plexus submucosus Meissneri*). Овај слој такође може да садржи жлезде, мишиће и лимфне фоликуле (Standring, 2005, Gartner and Hiatt, 2014).

Мишићни слој изграђен је од спирално распоређених глатко-мишићних ћелија и у највећем делу дигестивне цеви дели се на два подслоја, у зависности од основног усмерења мишићних ћелија. Унутрашњи слој (*stratum circulare*) ближи је лумену и изграђен је од углавном кружно распоређених глатко-мишићних ћелија. Спољашњи мишићни слој (*stratum longitudinale*) изграђен је од углавном уздужно постављених глатко мишићних ћелија. Тростандардна реконструкција мишићног слоја показује да су ћелије оба подслоја спирално распоређене, али да су завојнице спирале знатно гушће у унутрашњем кружном подслоју у односу на спољашњи уздужни, у коме су слабије изражене. Унутар мишићног слоја, између кружног и уздужног мишићног подслоја, налази се мијентерични нервни плексус (*plexus mienthericus Auerbachi*) који садржи тела постганглијских парасимпатичких неурона и неуроне ентеричног нервног система. У везивном ткиву који раздваја два подслоја налазе се крвни и лимфни судови (Standring, 2005, Ross and Pawlina, 2016). Контракцијом кружног подслоја сужава се лумен дигестивног канала, а његов садржај се меша и компримује. Контракцијама лонгитудиналног подслоја дигестивна цев се скраћује и садржај гура напред (Ross and Pawlina, 2016).



Слика 1. Општа грађа желуца, танког и дебелог црева (Standring, 2005)



Слика 2. Хистолошка грађа гастроинтестиналног тракта са мезентеријумом (*Standring, 2005*)

Сероза је изграђена од танког слоја растреситог везивног ткива, богатог крвним и лимфним судовима и адипоцитима, и једнослојног плочастог епитела-мезотела. У трбушној дупљи сероза је у континуитету са мезентеријумом који пружа потпору цреву, као и са перитонеумом, серозном мембраном која облаже трбушни зид. Велики крвни и лимфни судови и нервна стабла садржани су у серози на свом путу од мезентеријума ка зидовима гастроинтестиналног тракта (слика 2.) (*Ross and Pawlina, 2016, Gartner and Hiatt, 2014, Standring, 2005*).

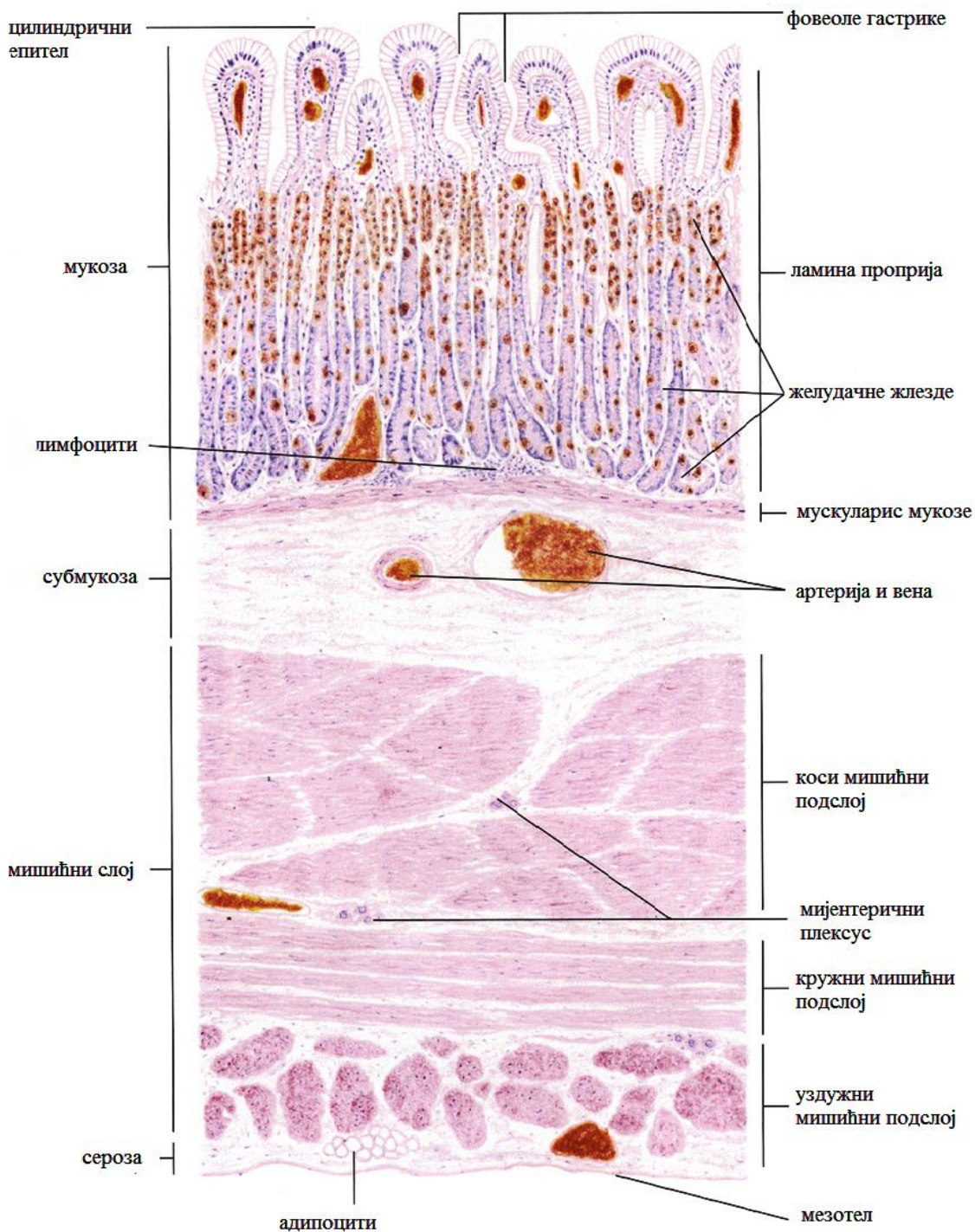
1.1.1. Хистолошка грађа желуца

Желудац је кесасто проширени део дигестивне цеви чија је главна улога наставак варења угљених хидрата започет у усној дупљи, додавање киселине прогутаној храни и претварање хране, радом мишића, у вискозну масу и започињање варења протеина. Анатоомски се у желуцу разликују четири подручја: кардија, фундус, корпус и пилорус, међутим, будући да су по микроскопској грађи фундус и корпус индентични, хистолошки се разликују само три подручја желуца: кардијални регион, краћи кружни регион на месту уласка једњака у желудац; пилорусни регион, проксимално од пилорусног сфинктера, и корпусни регион, највећи део желуца између кардије и пилоруса који карактеришу фундусне, односно, желудачне разгранате тубуларне жлезде у слузокожи (*Junqueira and Carneiro, 2005*).

Желудачна слузокожа се састоји од површног једноредног цилиндричног епитела, ламине проприје изграђене од растреситог везива и танког лонгитудиналног слоја глаткомишићних ћелија (слика 3.). Површински епител прави плитка удубљења у ламину проприју формирајући желудачне јамице (*foveole gastrice*) у чијем се дну отварају разгранате тубуларне жлезде (кардијачне, желудачне и пилорусне) које су карактеристичне за свако подручје желуца. Ламину проприју чини растресито везивно ткиво прожето бројним крвним и лимфним судовима, богато плазмоцитима, лимфоцитима, мастоцитима и понеком глатко-мишићном ћелијом (*Standring, 2005, Gartner and Hiatt, 2014*).

Подслузокожа се састоји од густог везивног ткива прожето лимфоцитима, макрогима и мастоцитима, у коме се налазе крвни и лимфни судови и субмукозни нервни плексус у близини мишићног слоја (*Standring, 2005*).

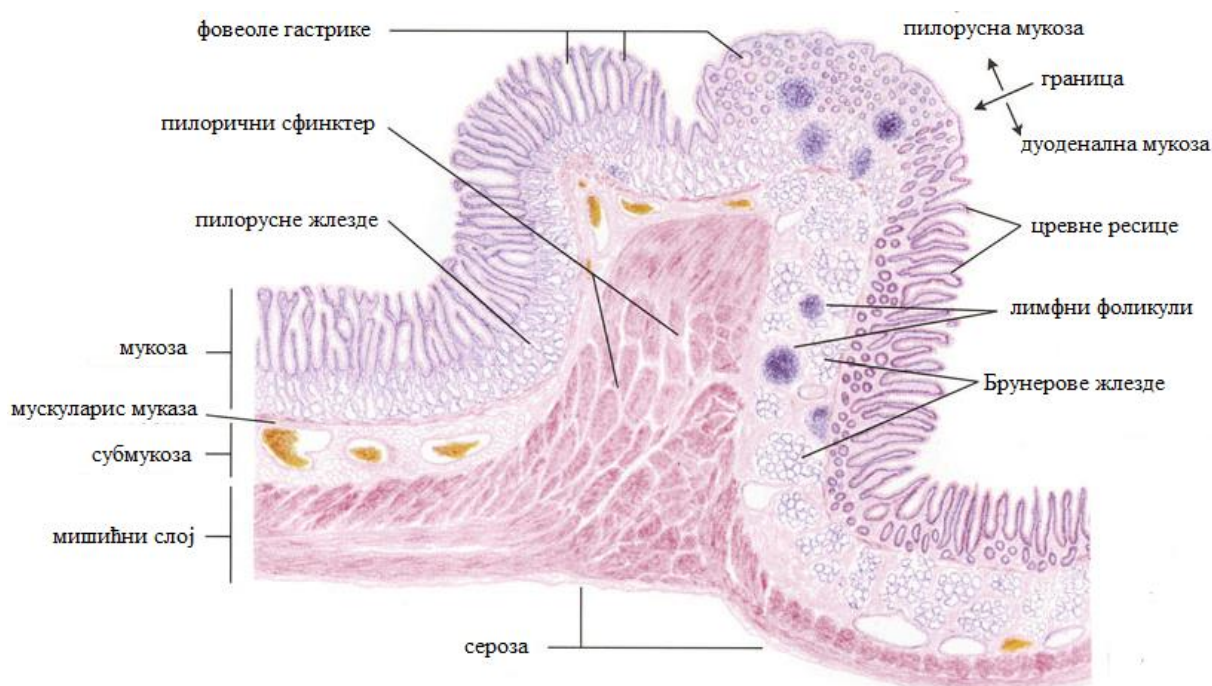
У празном желуцу уочавају се упадљиви слузокожни и подслузокожни уздужни набори (*rugae gastricae*), посебно изражени у корпусном делу. Руге омогућују ширење желуца и када се желудац испуни храном оне исчезавају (*Gartner and Hiatt, 2014*).



Слика 3. Хистолошка грађа желуца (Shu-Xin, 1999)

Мишићни слој желуца изграђују глатко-мишићне ћелије распоређене у три нејасно ограничена подслоја. У спољашњем подслоју мишићна влакна су уздужно орјентисана, са изузетком антериорног и постериорног дела тела желуца и пилоруса где овај подслој изостаје. У средишњем подслоју глатко-мишићне ћелије су кружно

оријентисане, у подручју пилоруса овај подслој је јако задебљао и чини пилорични сфинктер (слика 4.), док је у пределу кардије слабије развијен. Унутрашњи мишићни подслој изграђују косо оријентисане глатко-мишићне ћелије и овај подслој је добро развијен у пределу кардије. Овакав аранжман мишићних подслојева је функционално важан за улогу мешања хране током дигестије, као и за потискивање желудачног садржаја ка танком цреву. Између средишњег и спољашњег подслоја налазе се ганглиони мијентеричног плексуса (МП) (*Gartner and Hiatt, 2014, Ross and Pawlina, 2016, Mescher, 2010*).



Слика 4. Хистолошка грађа пилорусног региона желуца и дуоденума (*Shu-Xin, 1999*)

Серозу гради растресито везиво у коме има доста адипоцита и једнослојан плочаст епител, и она је у континуитету са перитонеумом и оментумом (*Junqueira and Carneiro, 2005*).

1.1.2. Хистолошка грађа танког црева

Танко црево представља место завршног варења хране, абсорпције хранљивих састојака и ендокрине секреције. Танко црево је релативно дугачко и састоји се од три дела: дуоденума, јејунума и илеума (*Mescher, 2010*).

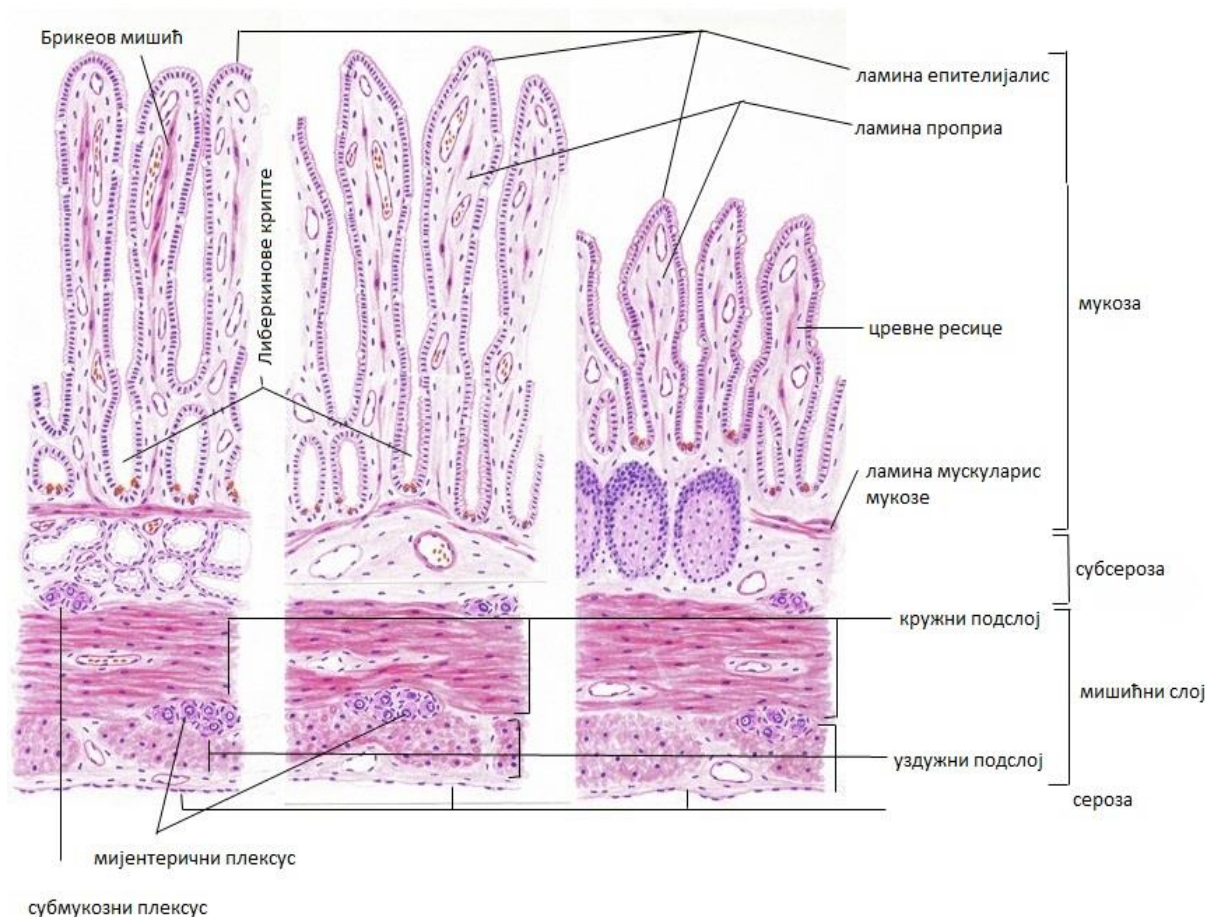
Слузокожу танког црева карактеришу дуги прстолики изданци, цревне ресице (*villi intestinales*) који проминирају у лумен танког црева обложене простим цилиндричним епителом испод кога се налази ламина проприја. Ламина проприја танког црева изграђује срж ресица и састављена је од богато васкуларизованог растреситог везивног ткива у коме су присутна нервна влакна и глатко-мишићне ћелије. Ове глатко-мишићне ћелије представљају танак мишићни сноп који се одваја од ламине мускуларис мукозе и чини Брикеов (*Brick*) мишић неопходан за ритмично покретање и скраћивање ресица, што је од важности за апсорпцију (*Ross and Pawlina, 2016, Young et al., 2014*). Између база ресица налазе се отвори простих тубуларних жлезди названих Либеркинове (*Lieberkuhn*) крипте. Слузокожа танког црева образује кружне, полумесечасте или спиралне наборе, Керкрингове (*Kerckring*) наборе који су најизраженији у јејунуму (*Ross and Pawlina, 2016*).

Субмукоза је грађена од нешто гушћег везива које једним делом улази у састав Керкрингових набора. У њој се налази богат субмукозни васкуларни сплет, као и субмукозни Меиснеров плексус. У субмукози дуоденума присутне су и просте разгранате тубуларне мукозне дуоденалне Брунерове (*Brunner*) жлезде, док слузокожа и делимично подслузокожа илеума садрже агрегате лимфних фоликула названи Пајерове (*Peyer*) плоче (*noduli lymphatici aggregati*) (*Mescher, 2010, Gartner and Hiatt, 2014*).

Мишићни слој танког црева добро је развијен и састоји се од унутрашњег кружног и спољашњег уздужног подслоја (слика 5.).

Кружни мишићни слој подељен је везивноткивним септама у кружно орјентисане ламеле које се пружају дуж читаве циркумференце. Септе су у континуитету са субмукозним слојем и пружају се целом дебљином кружног слоја. Најунутрашњији слој циркуларних ламела (1-5 ћелија) одвојен је од спољашњег кружног дела везивноткивним простором који садржи нервне елементе дубоког мишићног плексуса,

интерстицијумске ћелије и крвне судове. Спољашњи, главни слој циркуларног мишића је око два пута дебљи од уздужног мишићног слоја (Ross and Pawlina, 2016, Young et al., 2014).



Слика 5. Хистолошка грађа танког црева (ауторски цртеж)

Уздужни мишићни подслој подељен је септама од ирегуларног фиброзног везива у којима су садржани нерви и крвни судови. Мишићне ћелије сличне оријентације често окружују ганглионе мијентеричног плексуса, који је на тај начин делимично или потпуно утопљен у уздужни мишићни слој, али никада у кружни слој. У области ганглиона, везивноткивени простор раздваја главне мишићне слојеве, док су у другим областима кружни и уздужни слој у блиском контакту (слика 5). У овом простору налазе се нервне структуре мијентеричног плексуса, интерстицијумске ћелије, глатко-мишићне ћелије и крвни судови (Young et al., 2014, Gartner and Hiatt, 2014).

Сероза одговара општој грађи ГИТ-а, саињена од мезотела и растреситог везива.

1.1.3. Хистолошка грађа дебелог црева

Дебело црево је завршни део дигестивне цеви и обухвата слепо црево-цекум (*caecum*) са црвуљком (*appendix vermiformis*), сито црево-колон (*colon*), ректум и анални канал. У њему се апсорбује вода и електролити, обликују фекалне масе и производи слуз (*Junqueira and Carneiro, 2005*). Хистолошки, разлика између танког и дебелог црева условљена је другачијом грађом слузокоже и мишићног слоја. У дебелом цреву нема цревних ресица и кружних набора, а цревне жлезде су дубоке, праве, тубуларне и пружају се читавом дебљином мукозе.

Основна четири слоја карактеристична за читав ГИТ присутна су у зиду колона, уз неколико структурних карактеристика (слика 6.):

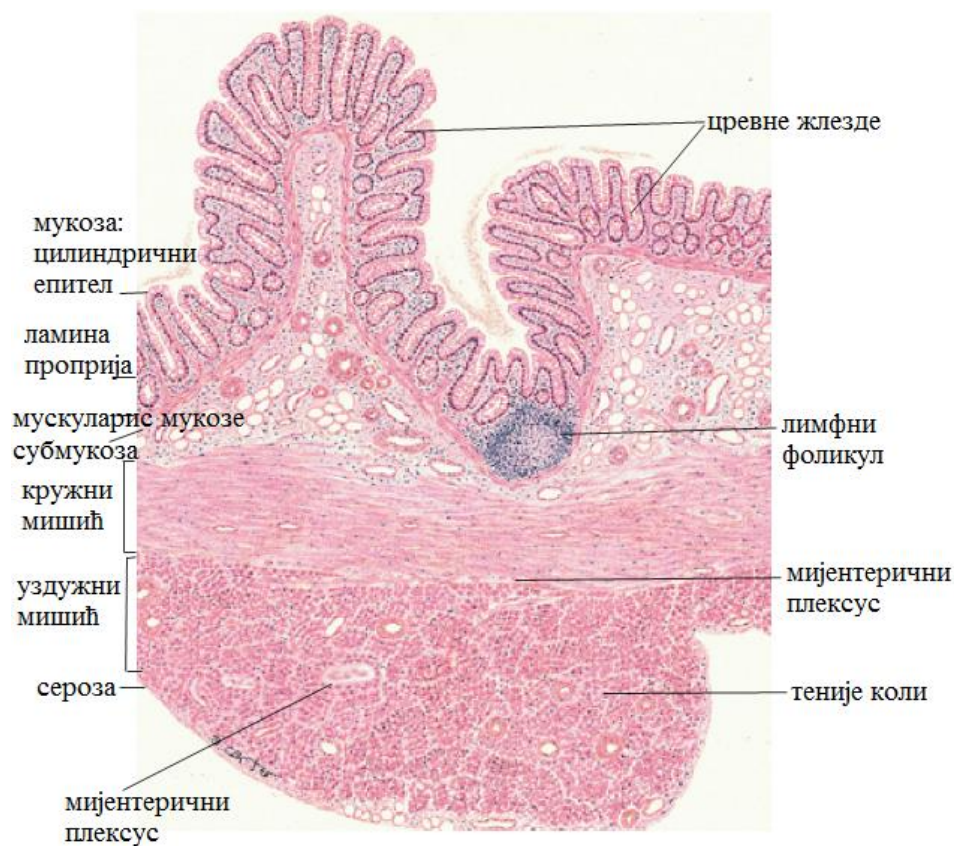
- у спољашњем уздужном мишићном подслоју глатко-мишићне ћелије организоване су у три дебеле уздужне траке назване теније коли (*taeniae coli*);
- са тунике серозе пружају се мале израслине масног ткива у интраперитонеални део (*apendices epiploicae*);
- на спољашњој површини истичу се кесаста проширења названа хаустре коли (*haustreae coli*).

У слузокожи, испод једноредног цилиндричног епитела, ламина проприја садржи бројне лимфоците, појединачне лимфне фоликуле, мастоците, а између цревних жлезда нема лимфних судова (*Young et al., 2014, Standring, 2005*).

Субмукоза дебелог црева грађена је од богато васкуларизованог густог везивног ткива, и садржи субмукозни нервни сплет, који лежи на унутрашњој површини мишићног слоја (*Standring, 2005, Gartner and Hiatt, 2014*).

Мишићни слој дебелог црева састоји се из унутрашњег кружног и спољашњег уздужног подслоја. Кружни подслој је значајно дебљи, правилне ламеларне грађе, док је уздужни подслој изузетно танак, осим у три уздужне траке-теније коли. Снопови глатко-мишићних ћелија из тенија у неправилним интервалима пенетрирају у унутрашњи кружни подслој. Присутне несразмере у грађи мишићног слоја утичу да се поједини сегменти колона контрахују независно од осталих делова, што доводи до стварања кесастих проширења у њиховом зиду-хаустре коли. Мишићни слој дебелог

црева ствара два основна типа контракција: сегментационе, које су локалног карактера и не доводе до потискивања садржаја, и перисталтичке које покрећу садржај ка дисталним партијама (*Mescher, 2010, Gartner and Hiatt, 2014*).



Слика 6. Хистолошка грађа дебелог црева (*Eroschenko, 1996*)

Сероза покрива читав колон изузев његовог ретроперитонеалног дела коме је својствена адвентиција (*Ross and Pawlina, 2016*).

1.2. ИНЕРВАЦИЈА ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА

Функцију гастроинтестиналног тракта регулише мрежа неурона која је смештена у мозгу, кичменој мождини, превертебралним симпатичким ганглионима, као и у зидовима органа ГИТ-а, кроз интегралну хијерархију нервних центара распоређених на четири нивоа (*Giaroni et al., 1999, Costa et al., 2000*).

Ентерички нервни систем (ЕНС) представља први ниво контроле функције ГИТ-а, кога чини група неурона унутар зида дигестивне цеви. ЕНС образује „мозак црева“ и способан је да локалну функцију обавља независно од централног нервног система. Други ниво интеграције подразумева превертебралне симпатичке ганглионе, где су периферни рефлексни путеви под утицајем преганглијских симпатичких влакана из кичмене мождине. Симпатички и парасимпатички утицај на црева, ограничен на рефлексе сензорних влакана која путују са аутономним нервима из централног нервног система, представља трећи ниво контроле ГИТ-а. Четврти ниво укључује више мождане центре који обезбеђују еферентне сигнале удружене са долазећим сензорним сигнаlima на трећем нивоу (*Costa et al., 2000, Costa, 2006*).

Регулацију контракције мишићног слоја ГИТ-а, транспорт кроз слузокожу црева, као и проток крви кроз зид дигестивне цеви врши ЕНС, који се, поред симпатичког и парасимпатичког, сматра једним од три дела аутономног нервног система (*Giaroni et al., 1999, Goyal, 2000*). Иако ЕНС може функционисати независно од централног нервног система, ипак, централни нервни систем има важну улогу у координацији различитих функција ЕНС са којим је повезан преко моторних и сензитивних путева симпатикуса и парасимпатикуса (*Giaroni et al., 1999, Goyal, 2000*).

Парасимпатичке моторне путеве чине нерви вагуса и сакрални нерви. Вагусни моторни путеви контролишу моторну и секретомоторну функцију горњег дела ГИТ-а, а сакрални нерви регулишу функцију дисталног колона и ректума. Парасимпатички преганглијски неурони су сви холинергички и имају ексцитаторне ефекте на мијентеричне неуроне преко никотинских, а у неким регионима и мускаринских, рецептора. Ови неурони успостављају бројне везе са ентеричким нервима у горњем делу ГИТ-а, дисталном колону и ректуму. Међутим, у танком цреву преганглијски неурони вагуса инервишу мале групе одређених мијентеричних неурона, који могу представљати командне неуроне-генераторе образаца контракције. Ове разлике у интезитету инервације парасимпатичким преганглијским влакнима огледају се у томе да централни нервни систем има много већи директан утицај на горње (једњак и

желудац) и најдисталније (сигма и ректум) делове ГИТ-а, а знатно мање директно контролише функције танког црева и колона (*Berezin et al., 1990, Iino et al., 2004, Sanders, 2000*).

Адренергичка постганглијска влакна превертебралних ганглиона регулишу функције секретомоторних неурона који садрже вазоактивни интестинални полипептид, пресинаптичких холинергичких нервних завршетака, субмукозних крвних судова и гастроинтестиналних сфинктера. Тела адренергичких нервних ћелија нису нађена у ентеричком нервном плексусу (*Llewellyn-Smith et al., 1984, Goyal and Hirano, 1996*).

Вагусни и спланхнички нерви носе сензитивне информације у централни нервни систем, и означени су као примарни аферентни неурони. Примарна аферентна влакна вагуса, који чине око 80% вагусног нерва, у глатко-мишићном слоју осетљиви су на механичко истезање црева, док су остали осетљиви на луминалну концентрацију глукозе, аминокиселина и дуголанчаних масних киселина (*Goyal and Hirano, 1996, de Lorijn et al., 2005*). Тела примарних аферентних неурона спланхникуса налазе се у ганглионима задњих коренова кичмене мождине, док се њихови завршеци налазе у зиду црева. Аферентни неурони носиоци су сензација бола у ГИТ-у и обично су мултимодални, тако да одговарају на интензивне механичке, термалне и хемијске стимулусе који оштећују ткиво (*Costa et al., 2000*).

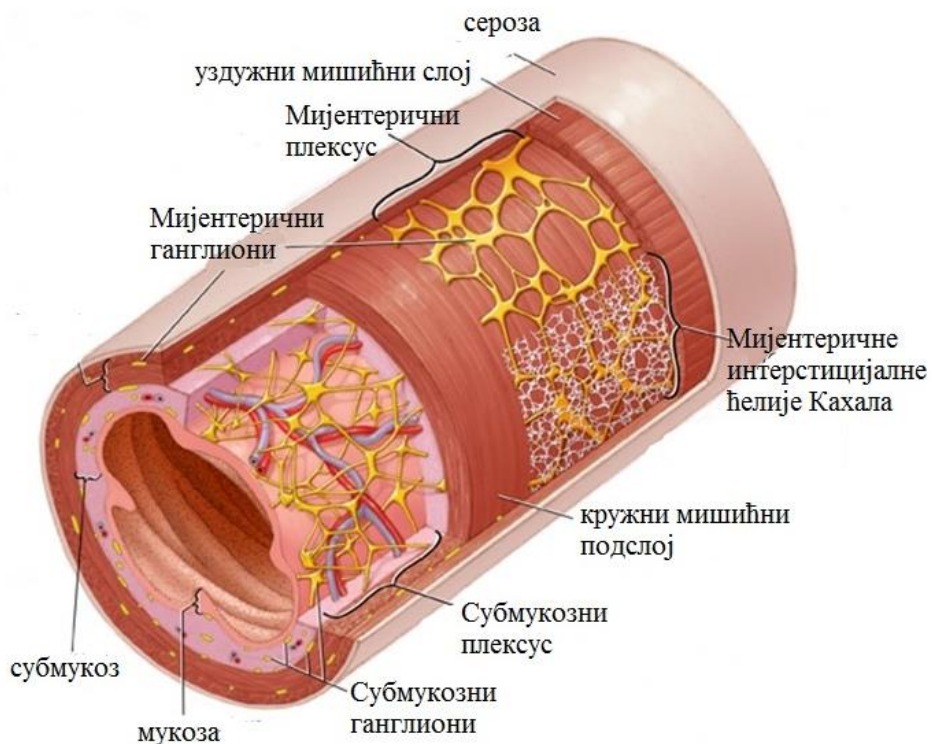
1.2.1. Ентерични нервни систем

Ентерични нервни систем контролише мотилитет, егзокрину и ендокрину секрецију, микроциркулацију ГИТ-а, и такође има улогу у регулацији локалних запаљенских и имунских процеса. Он садржи око 100 милиона неурона, отприлике исти број као и кичмена мождина (*Wood et al., 1999*). Испитивања функционалне и хемијске разноврсности ентеричних неурона показала су сличност ЕНС са централним нервним системом, због чега се за ЕНС може рећи да представља измештени део централног нервног система (ЦНС) који је задржао комуникацију са њим преко симпатичких и парасимпатичких аферентних и еферентних неурона. Заједно са овим везама ЕНС обезбеђује контролу свих функција ГИТ-а (*Goyal and Hirano, 1996*).

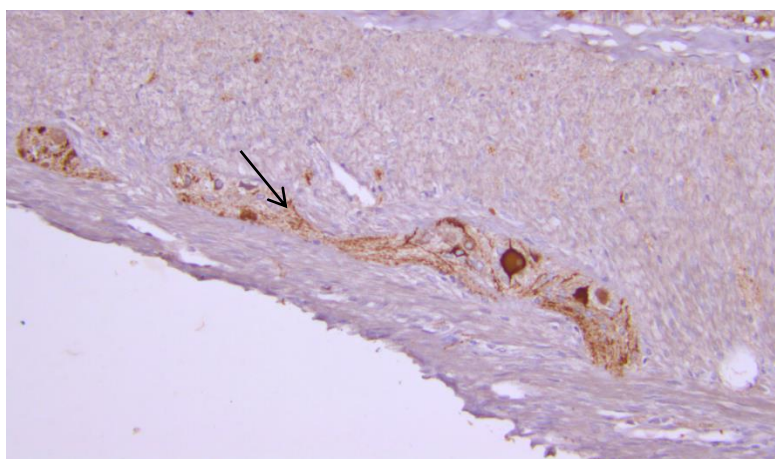
Тела нервних ћелија у ЕНС-у груписана су у мале ганглионе повезане сноповима нервних продужетака образујући два главна плексуса, мијентерични и субмукозни (слика 7.). Ентерични ганглиони се састоје од густо упакованих тела нервних ћелија, терминалних нервних влакана и глијалних ћелија са својим продужетцима. Глијалне ћелије су бројније од ентеричних неурона, подсећају на астроците централног нервног система, а њихови ламинарни продужеци обавијају већи део површине тела ентеричних нервних ћелија. Ентеричне глијалне ћелије продукују интерлеукине и експримују *MHC II* комплекс антигена у одговору на стимулацију цитокинима, што сугерише да имају улогу у модулацији запаљењског одговора у цревима (*Ochoa-Cortes et al., 2016*). ЕНС саджи три функционална типа неурона: сензорне, интер-, и моторне неуроне. Сензорни неурони садрже рецеторске регионе специјализоване за детекцију термичких, хемијских и механичких промена. Интернеурони су повезани синапсама у мреже које обрађују сензорне информације и контролишу понашање моторних неурона. Моторни неурони су финални путеви за трансмисију контролних сигнала ка ефекторном ћелијама (*Ward et al., 1997, Ward and Sanders, 2001*).

Структура, функција и неурохемија ентеричних ганглиона значајно се разликује од других аутономних ганглиона, који углавном функционишу као релејни дистрибутивни центри за сигнале који се преносе из централног нервног система. За разлику од њих, ганглиони ентеричног нервног система су међусобно повезани образујући нервни систем са механизмима за обраду и интеграцију информација, сличан оном у мозгу и кичменој мождини, због чега је и назван „други мозак“ или „мозак црева“ (*Wood et al., 1999*).

Мијентерични или Ауербахов плексус (*plexus mienthericus Auerbachi*) пружа се целом дужином црева и лежи између два главна мишићна подслоја, кружног и уздужног (слика 8.). Његова примарна улога је моторна инервација оба мишићна подслоја и секретно-моторна инервацију слузокоже, а такође постоје бројни продужеци мијентеричног плексуса ка субмукозним ганглионима и ка ентеричним ганглионима жучне кесе и панкреаса. Знатан број продужетака мијентеричних неурона пружа се и ка симпатичким ганглионима (*Llewellyn-Smith et al., 1984, Wang et al., 2003*).



Слика 7. Организација ентеричног нервног система (Standring, 2005)



Слика 8. Ганглиони мијентеричног плексуса (стрелица), између кружног и уздужног мишићног подслоја танког црева, *NF-M* имунохистохемија x 200

Субмукозни или Маиснеров плексус (*plexus submucosus Meissneri*), налази се у субмукози између кружног мишићног подслоја и ламине мускуларис слузокоже.

Субмукозни плексус најбоље је развијен у танком цреву, где игра важну улогу у контроли секреције. Поред тога што инервишу жлездани епител, неурони субмукозног плексуса инервишу мишићни слој слузокоже, ендокрине ћелије црева и субмукозне крвне судове (*Sanders, 1998*).

Примарна циљна места дејства ентеричних неурона су: глатке мишићне ћелије одговорне за мотилитет, мукозне секреторне ћелије, гастроинтестиналне ендокрине ћелије, микроваскулатура која одржава проток крви у мукози у току цревне секреције и имуномодулаторне и инфламаторне ћелије, укључене у мукозне имунолошке, алергијске и запаљењске одговоре (*Ochoa-Cortes et al., 2016*). Новија истраживања сугеришу да интризични примарни аферентни неурони мијентеричног плексуса инервишу субпопулацију интерстицијалних ћелија Кахала у танком цреву (*Zhu et al., 2014*).

1.2.2. Перисталтичке контракције

Моторни неурони ЕНС-а састоје се из ексцитаторних и инхибиторних неурона који преко различитих неуротрансмитера регулишу мишићну контракцију и мукозну секрецију. Ацетилхолин и супстанца П су главни неуротрансмитери које ослобађају ексцитаторни моторни неурони у изазивању контракција мишића, а секреција цревних жлезда контролисана је преко ацетилхолина и вазоактивног интестиналног пептида. Инхибиторни моторни неурони супримирају контрактилну активност мускулатуре црева преко неуротрансмитера аденозин трифосфата, вазоактивног интестиналног пептида, активирајућег пептида, питуитарне аденилат циклазе и азот монооксида (*Costa, 2006, Ward et al., 2000*).

Цревна мускулатура понаша се као самоексцитабилни електрични синцицијум сачињен из интерстицијумских ћелија Кахала, које функционишу као пејсмејкери, и масе мишића, који производе снагу за покретање садржаја, а функционални значај инхибиторних моторних неурона повезан је са специјализованом физиологијом цревне мускулатуре (*Ward et al., 1998*). Интерстицијумске ћелије Кахала су не-неурални пејсмејкери који стварају електричне споре таласе, одговорне за самоексцитабилност читавог система (*Pluja et al., 2001, Ward and Sanders, 2006, Zhu et al., 2005*). Међутим,

циркуларне мишићне ћелије не одговарају контракцијом на сваки пејсмекерски циклус, тако да се акциони потенцијали и контракције не шире у свим правцима унутар синцицијума, нити читавом његовом дужином (*Huizinga, 1998, Hudson et al., 2006*). Мишићне ћелије кружног подслоја могу одговорити мишићним пејсмекерима (електрични спори таласи) само када су инхибиторни неурони тог сегмента "искључени" деловањем других неурона контролног центра (*Fujita et al., 2001, Ward et al., 1998*). Активност инхибиторних моторних неурона одговорна је за одређивање правца и дужине пропагације ширења контракција, односно акциони потенцијал и следствене контракције могу се ширити само у овим инхибираним регионима мускулатуре (*Conklin and Du, 1990, Jimenez et al., 1999*).

1.3. РАЗВИЋЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА

Гастроинтестинални тракт развија се од примитивног црева; епител и жлезде ГИТ-а су ендодермалног порекла, везивно-ткивне структуре и мишићни слој ГИТ-а су мезодермалног порекла (спланхноплеурални мезодерм), док је ентерични нервни систем ектодермалног порекла (*Nikolic et al., 2007*).

Током треће недеље ембрионалног развића, латеролатералним и цефалокаудалним савијања ембриона, ендодерм се трансформише у структуру цевастог облика, ендодермну цев која посредством вителусног или омфаломезентеричног канала комуницира са жуманчетном кесом. Када спланхноплеуларни мезодерм обавије ендодермну цев она постаје примитивно црево, које је на свом предњем крају ограничено орофарингеалном мембраном, а на задњем клоакалном мембраном. Посматрајући у цефало-каудалном смеру, примитивно црево се дели на предње, средње и задње (*Nikolic et al., 2007, Carlson, 2004*).

Предње црево се протеже од орофарингеалне мембране до велике дуоденалне папиле, Ватерове (*Vater*) ампуле, и од њега се развија део усне дупље, ждрело, једњак, желудац и почетни део дуоденума (*Sadler, 2004*).

Од средњег црева, које преко вителусног канала са своје вентралне стране комуницира са жуманчетном кесом, развија се дистални део дуоденума, јејунум, илеум, цекум, апендикс, асцендентни и две трећине трансверзалног колона (*Sadler, 2004*). Задње црево се завршава клоакалном мембраном, а након њеног нестајања комуницира са амнионском шупљином. Деривати задњег црева су лева трећина трансверзалног колона, десцендентни колон, сигмоидни колон и ректум (*Carlson, 2004*). Сви процеси хистиогенезе ГИТ-а дешавају се по правилима проксимално-дисталног градијента, који подразумева да све промене које настају у дигестивном каналу захватају прво проксималне, па тек онда дисталне делове (*Carlson, 2004, Sadler, 2004*).

1.3.1. Развиће желуца

Желудац се развоја од предњег црева, каудално од једњака. Изражено је проширено у односу на околне сегменте ГИТ-а, а пошто његова дорзална ивица брже расте од вентралне, на њему се разликују велика и мала кривина. У току феталног развића, у периоду од шесте до дванаесте недеље, желудац ротира за 90 степени у

правцу кретања казаљке на сату. При томе желудац се помера из сагиталне у фронталну раван тако да је велика кривина на левој, а мала кривина на десној страни. Истовремено се желудац ротира и око сагиталне осе, па се кардија помера лево и доле, а пилорус према десно и горе (*Nikolic et al., 2007, Hwang et al., 2010*).

Епител желуца настаје од ендодерма и у почетку од једнослојног постаје вишеслојан, па потом дефинитивно једнослојан цилиндричан. Током трећег месеца развића јављају се зачеци желудачних жледи, неуроендокрине ћелије жлезди диферентују се у периоду од 8. до 12. недеље, а ивичне и главне ћелије у њима се диферентују крајем трећег и почетком четвртог месеца (*Sadler, 2004*).

Мишићни слој желуца и везивно-ткивне структуре настају од спланхноплеуралног мезодерма. Током осме и девете недеље гестације у краниокаудалном смеру миобласти формирају кружни мишићни подслој који у телу желуца бива организован у дефинитивне снопове током средине четвртог месеца, а у региону антрума и пилоруса мало касније, у периоду око 4. и 5. месеца гестације. Спољашњи уздужни мишићни подслој појављује се истовремено дуж читавог желуца током 11. и 12. недеље гестације, а дефинитивну морфолошку и хистолошку зрелост постиже тек у седмом месецу феталног развића (*Carlson, 2004*). Мезодерм око желуца се редукује у две танке мембране које образују дорзални и вентрални мезогастријум (*Nikolic et al., 2007*).

Покрети желудачне мускулатуре успостављају се око 4. и почетком 5. месеца гестације, а пражњење желуца најраније је запажено око 31. недеље гестације (*Moore and Persaud, 2003*).

1.3.2. Развиће танког црева

Танко црево развија се од дисталног дела предњег и већег дела средњег црева. У четвртој недељи гестације црево има облик праве цеви која током пете недеље интензивним растом црева, које је причвршћено за задњи трбушни зид дорзалним мезентеријумом, формира интестиналне петље. Интестинална петља је својим конвекситетом окренута ка вентралној страни ембриона и у централном делу је повезана са жуманчаном кесом преко вителусног канала који перзистира до десете недеље гестације. Истовремено са растом током пете недеље започиње и ротација црева за 90 степени, па се кранијални крај помера у десно, а каудални у лево од средишње линије тела. Интензивном пролиферацијом силазног дела цревне петље у

шестој недељи гестације, због недостатка простора у трбушној шупљини, стварају се прве цревне вијуге унутар целома пупчане врпце (физиолошка умбиликална хернија), па се затим у десетој недељи гестације, када абдоминална шупљина постане довољно велика, најпре врши ретракција танког црева, а затим колона (Sweeney, 1998). Дефинитивни положај танког црева поствља се ротацијом за још 270, иницијално 90 степени током хернијације и финално 180 степени током ретракције у трећем месецу гестације. Издуживање црева се наставља све до рођења, када она имају хиљаду пута већу дужину у односу на ону у петој недељи гестације (Carlson, 2004, Malas et al., 2004a).

Услед интензивне пролиферације епитела танког црева крајем ембрионалног периода, епител танког црева постаје вишеслојан и долази до потпуног зачепљења његовог лумена. Након тога, процесом апоптозе, долази до појаве вакуола, реканализовања и поновног успостављања лумена најпре у дуоденуму, а касније и у осталим деловима танког црева. Том приликом формира се једнослојан цилиндричан епител (Nikolic et al., 2007).

Мишићни слој и везивно ткиво танког црева настају од спланхноплеуралног мезодерма. Кружни мишићни подслој може се разликовати код фетуса старог око 10 недеља, док лонгитудинални подслој постаје јасније диферентован тек око 13. недеље. Мијентерични плексус се развија у деветој, а субмукозни у тринаестој недељи гестације (Carlson, 2004, Radenkovic et al., 2017).

1.3.3. Развиће дебелог црева

Дебело црево развија се од завршног дела средњег и од задњег црева. Током ретракције и ротације црева која се дешава у трећем месецу гестације, дебело црево се поставља испред односно дорзално у односу на танко црево и заузима конфигурацију обрнутог латиничног слова „U“ (Sweeney, 1998). Значајни раст дебелог црева дешава се у другој половини феталног развића (Nikolic et al., 2007). У осмој недељи ембрионалног развића, због непропорционалног споријег раста терминалног дела цекума у односу на остатак црева, појављује се апендикс, као продужетак на врху цекума (Malas et al., 2004b).

Ендодерм који облаже узан, пукотинаст лумен колона најпре је у виду вишеслојног епитела, да би се до 14. недеље гестације трансформисао у једноредан цилиндричан. У

региону цекума и ректума појављује се серија уздужних набора, који убрзо захватају површину читавог ректума. Набори се затим сегментишу у цревне ресице које су присутне у колону све до пред крај феталног периода, када се најпре смањују, а затим потпуно исчезавају. Између ресица слузокожа инвагинише у испод лежећи мезенхим и образује цревне жлезде, чији се број непрестано увећава (*Sadler, 2004*).

Мишићни слој дебелог црева формиран је у осмој недељи гестације, а матурација и специфична организација уздужног мишићног подслоја у теније и хаустре дешава се у периоду од 11. до 12. недеље гестације, почевши од асцендентног ка сигмоидном колону (*Malas et al., 2004a, Moore and Persaud, 2003*).

1.3.4. Развиће ентеричног нервног система

Ентерични нервни систем развија од нервног гребена, и то примарно из ћелија његовог вагусног сегмента, а мањим делом из ћелија његовог сакралног сегмента. Ћелије вагусног сегмента нервног гребена мигрирају у кранијални део примитивног црева, одакле се њихова миграција наставља ка каудалним деловима, све до задњег црева (*Young et al., 2000*). Ћелије сакралног дела нервног гребена учествују у изградњи мањег дела ентеричног система задњег црева (*Young et al., 2000, Carlson, 2004*).

Миграција неуробласта кроз ГИТ иде у краниокаудалном смеру тако да су они у дуоденуму присутни у седмој недељи гестације, у првој половини колоне у осмој недељи гестације, а у ректуму 12. недеље гестације (*Radenkovic, 2012, Radenkovic et al., 2017*). Неуробласти мијентеричког плексуса сазревају раније током гестације већ од 9. недеље, у односу на неуроне субмукозног плексуса који сазревају од 13. недеље, а такође раније сазревају неурони у проксималним деловима црева него они у дисталним деловима (*Goyal and Hirano, 1996, Young et al., 2000, Radenkovic et al., 2017*). Након емиграције ћелија нервног гребена, долази до још једног таласа емиграције нуралних ћелија, овог пута са вентралне стране кранијалног дела неурвне цеви (ВЕНТ). Оне мигрирају дуж кранијалних нерава, укључујући и нервус вагус, тако да су идентификоване у циркуларном мишићном слоју предњег црева, од кога настаје једњак, желудац и почетни део дуоденума (*Dickinson et al., 2004, Radenkovic, 2012*). Ганглиони ентеричног плексуса задњег црева стварају се додатним учешћем сакралног сегмента нервног гребена. Индуктивни фактори који делују на рецепторе са тирозин-киназном активношћу имају значајну улогу за миграцију и диференцијацију неуробласта у цревима (*Torihashi et al., 1999*).

1.4. ИНТЕРСТИЦИЈАЛНЕ ЋЕЛИЈЕ КАХАЛА

Интерстицијалне ћелије Кахала (ИЋК) су специјализоване ћелије мезенхималног порекла, које формирају мрежу, распоређене унутар мускулатуре ГИТ-а, способне за генерисање и пропагацију електричних спорих таласа (*Ward et al., 1994, Komuro, 2006*). Поред улоге пејсмејкера и регулације контракције његовог мишићног слоја, ИЋК су укључене у ентеричну неуротрансмисију и као рецептори истезања („*stretch*“ рецептори) у ГИТ-у (*Burns et al., 1996, Ward et al., 2000, Beckett et al., 2002, Suzuki et al., 2003*).

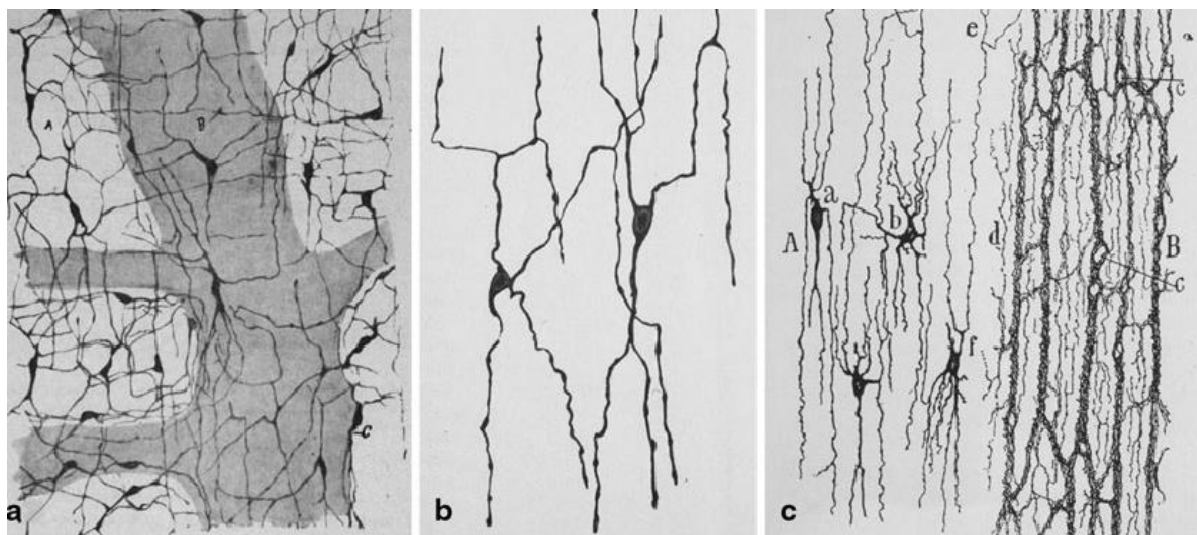
Иако су ове ћелије први пут описане пре више од сто година, тек у последње две деценије показан је њихов значај у регулацији глатко-мишићне активности ГИТ-а, дефинисана је њихова морфологија, порекло и функција. Од тада, ИЋК су у фокусу многих истраживања, нарочито истраживања патогенезе бројних поремећаја мотилитета ГИТ-а и дијабетесне гастроентеропатије.

1.4.1. Историјски преглед

Добитник Нобелове награде, Сантиаго Рамон Кахал (*Santiago Ramon Cajal*) (1852–1934) сматра се оснивачем неуронауке. Кахал (слика 9.) је први описао 1911. године интерстицијалне ћелије у танком цреву зеца, сматрајући их завршним ћелијама симпатичког нервног система (слика 10.), и назвао их „*cellules interstitielles*” или „*neurones sympathiques interstitiels*”. Кахал је бојењем на метилен плаво и Голци-сребром методом описао танку целуларну мрежу ових ћелија повезаних са терминалним гранама аутономних нерава у цревима (*Cajal, 1911, Cajal, 1893, Komuro, 2012*). С'обзиром на то да се у то време веровало да су поменуте хистохемијске методе бојења специфичне само за нерве, Кахал је поставио хипотезу да су ове ћелије примитивни неурони који су медијатори нервног импулса од терминалних крајева симпатичких влакана до глатко-мишићних ћелија (*Cajal, 1911, Komuro, 2012*).



Слика 9. *Santiago Ramon Y Cajal* (1852-1934), године 1906. добио је Нобелову награду за медицину (*Komuro, 2012*)



Слика 10. Оригинални Кахалови цртежи интерстицијалних ћелија у ГИТ-у зеца (*Komuro, 2012*)

Након Кахаловог открића, ове ћелије описиване су под различитим именима, док их Александар Догил (*Alexander Dogiel*) није назвао „интерстицијалне ћелије Кахала“ у част великог научника, називом који се још увек користи (*Thuneberg, 1999*).

Са развојем електронске микроскопије, уследила су ултраструктурна истраживања ИТК, али је цитолошка дефиниција и порекло ових ћелија и даље остала неразјашњена. На основу електроно-микроскопског испитивања Такси (*Taxi*) 1964. године дефинише ИТК као неуроиде, међуформа ентероглијалних ћелија, сличне фибробластима који су нервног порекла (*Taxi, 1964*), док 1969. год. Имезуми (*Imaizumi*) и Фаусоне Пелегрини (*Faussone-Pellegrini*) 1977. год. закључују да су ИТК примитивне глатко-мишићне ћелије (*Faussone Pellegrini et al., 1977, Imaizumi and Hama, 1969*). Ричардсон (*Richardson*) 1958. год., а затим Комуро (*Komuro*) 1989. год. сматрају да су ИТК ћелије сличне фибробластима (*Richardson, 1958, Komuro, 1989*).

Фаусоне Пелегрини (*Faussone-Pellegrini*) је прва предложила 1977. године на основу електроно-микроскопских истраживања, да ове ћелије представљају пејсмејкере ГИТ-а у мало познатом раду на италијанском језику (*Faussone Pellegrini et al., 1977, Faussone-Pellegrini et al., 2013*) тако да је њено истраживање остало непознато широј научној заједници. Модерно доба испитивања ИТК започео је Тунеберг (*Thuneberg*) 1982. год. електро-физиолошким студијама и радовима о пореклу ИТК (*Thuneberg, 1982*), постављајући хипотезу да су ИТК пејсмејкерске ћелије које спровode импулсе кроз мускулатуру ГИТ-а слично пејсмејкерским ћелијама срца. Лангтон (*Langton*) је 1989. године доказао Тунебергову хипотезу и показао у свом истраживању да ИТК стварају спонтано електричне таласе (*Langton et al., 1989*). Међутим, и даље је било нејасно да ли различите цитолошке особине код ИТК представљају морфолошке варијације истог ћелијског типа или скупове различитих врста ћелија. Разлог конфузије био је недостатак специфичне методе за бојење ИТК, и тешкоће повезивања ултраструктурних посматрања са традиционалним хистолошким описима (*Komuro, 2012*).

Значајан помак у погледу идентификације ИТК допринело је откриће Меда (*Maeda*) да неке популације ИТК експримирају протоонкоген *C-kit*, чиме је омогућено коришћење антитела за имунохистохемијско обележавање ИТК (*Maeda et al., 1992*).

У расветљавању функције ИТК нарочито су значајна истраживања Варда (*Ward*) и Хуизинге (*Huizinga*) на *knock-out* мутантима којима недостају поједини субтипови ИТК (*Huizinga et al., 1995, Ward et al., 1994*). Овим истраживањима показано је да су ИТК неопходне за нормално функционисање ГИТ-а и доказана је њихова функција.

Данас, ИТК заузимају централно место у истраживањима патогенезе разних поремећаја мотилитета, а недавно је и Интернационална радна група за гастро-неуромускулатурне болести уврстила хистопатолошку процену заступљености ИТК као дијагностички протокол код гастроентеропатија (*Knowles et al., 2009*).

1.4.2. Порекло и ембрионално развиће интерстицијалних ћелија Кахала

Интерстицијалне ћелије Кахала се развијају независно од ентеричких неурона и глија ћелија пореклом из нервног гребена (*Young, 1999*), и потичу углавном од Кит-позитивних мезенхималних прекурсора (*Young, 1999, Sanders et al., 1999*). Током развића ГИТ-а човека, *C-Kit* позитивне ћелије, морфолошки су различите од зрелих ИТК које се појављују на крају ембрионалног периода.

1.4.2.1. Диференцијација *C-kit* позитивних ћелија у гастроинтестиналном тракту

C-kit позитивне ћелије прво се појављују у једњаку и желуцу, затим у танком цреву и коначно у колону (*Wallace and Burns, 2005, Radenkovic et al., 2010b, Abramovic et al., 2014*) ростокаудалним градијентом дуж дигестивне цеви, на исти начин као што ћелије нервног гребена (ТНГ) колонизују дигестивну цев. Управо на нивоу миграционог пута ТНГ, одмах око ланца који формирају ТНГ током миграције дуж дигестивне цеви, појављују се *C-kit* позитивне ћелије, тачно од тачке где је почела диференцијација ганглија МП и дистално од тог места, у правцу миграције ТНГ (*Radenkovic et al., 2017*). Заједничко проксимално место диференцијације ганглиона МП и *C-kit* позитивних ћелија смештено је на задњем зиду једњака (*Radenkovic et al., 2017*). Ове *C-kit* позитивне ћелије морфолошки су различите од зрелих ИТК, многобројне су и веома сличне ћелијама бластема, са малим плеоморфним телом, које садржи велико једро и бројне али кратке цитоплазматске наставке. Оне чине широк појас ћелија спољашњег дела зида једњака, желуца и почетног дела дуоденума и окружују ланац ТНГ који представља будуће МП ганглије (*Wallace and Burns, 2005, Radenkovic et al., 2010a, Radenkovic et al., 2010b, Radenkovic, 2012, Abramovic et al., 2014*). На тај начин промењено је окружење свих ТНГ у ланцу миграције, изузев за фронталну групу ћелија (ново-пролиферисане ТНГ), које су једине остале у директном контакту са мезенхималним ћелијама. Управо на фронталном делу ланца ТНГ-а налази

се место максималне ГДНФ-а (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) експресије (*Natarajan et al., 2002, Wang et al., 2010*), и најизразитије померање у ростокаудалном правцу и продужавање миграционог таласа. *C-kit* позитивне ћелије вероватно смањују продукцију ГДНФ-а, и пошто окружују низ ЋНГ на бочним странама, оне делују као нека врста „левка“ који усмерава наставак миграционог ланца у каудалном смеру. Ћелије нервног гребена у ланцу успоравају своју миграцију и почињу да се диферентују у неуроне и глија ћелије и групишу заједно у зачетак ганглија МП.

Појава *c-kit* позитивних ћелија у једњаку, желуцу и првом диелу дуоденума, прати овај описани образац (*Radenkovic et al., 2010b, Radenkovic et al., 2010a, Radenkovic, 2012*). У остатку танког црева, све до цекума, *C-kit* позитивне ћелије се појављују на сличан начин, али у облику веома уског ланца ћелија које леже у спољњем делу зида, одмах испод серозе, око мигрирајућих ЋНГ, тј. зачетка ганглиона МП (*Radenkovic, 2012, Abramovic et al., 2014, Wester et al., 1999, Faussonne-Pellegrini et al., 2007*). Разлика у појави *c-kit* позитивних ћелија у једњаку, желуцу и првом диелу дуоденума, у поређењу са остатком танког црева, могла би се објаснити присуством ВЕНТ ћелија које насељавају само предње црево (*Dickinson et al., 2004, Sohal et al., 2002*). Сматра се да ВЕНТ ћелије могу потенцијално допринети том већем броју *c-kit* позитивних ћелија у органима који се развијају из предњег црева. Смањен број *c-kit* позитивних ћелија дуж танког црева може бити резултат смањеног пролиферативног капацитета ЋНГ (*Gianino et al., 2003*).

У дебелом цреву *c-kit* позитивне ћелије се појављују на другачији начин, у облику два паралелна појаса ћелија, при чему се први налази око зачетка ганглиона МП, а други на субмукозној граници кружног мишићног подслоја, око зачетка ганглиона СМП (*Abramovic et al., 2014, Radenkovic and Abramovic, 2012*). Процес диференцирања *c-kit* позитивних ћелија, и њихов повратни утицај на успоравање миграције, диференцијације и груписања ЋНГ у зачетке ганглија, одвија се истовремено на два нивоа у регионима МП-а и СМП-а. Разлог њиховог симултаног двоструког диференцирања може се објаснити разликама у начину миграције ЋНГ у колону, у поређењу са остатком дигестивне цеви (*Wallace and Burns, 2005*). Вагусне ЋНГ су ретко расуте кроз мезенхим зида дебелог црева, и мигрирају у широком таласу који покрива скоро читав зид црева, од серозе до субмукозе, али је формирајући субмукозни регион слабо насељен (*Wang et al., 2010, Radenkovic and Abramovic, 2012*). Таква дистрибуција је могућа јер су мишићни слојеви и даље недиферентовани у дебелом цреву. Такође у дебелом цреву су ћелије из сакралног сегмента нервног

гребена укључене у развиће ЕНС (*Burns et al., 2000, Burns et al., 2002*), што може утицати на образац диференцијације *c-kit* позитивних ћелија, а недавно је показано да постоји још један додатни пут миграције ЋНГ у дебело црево директно од средњег у задње црево преко мезентеријума (*Nishiyama et al., 2012*).

1.4.2.2. Диференцијација интерстицијалних ћелија Кахала

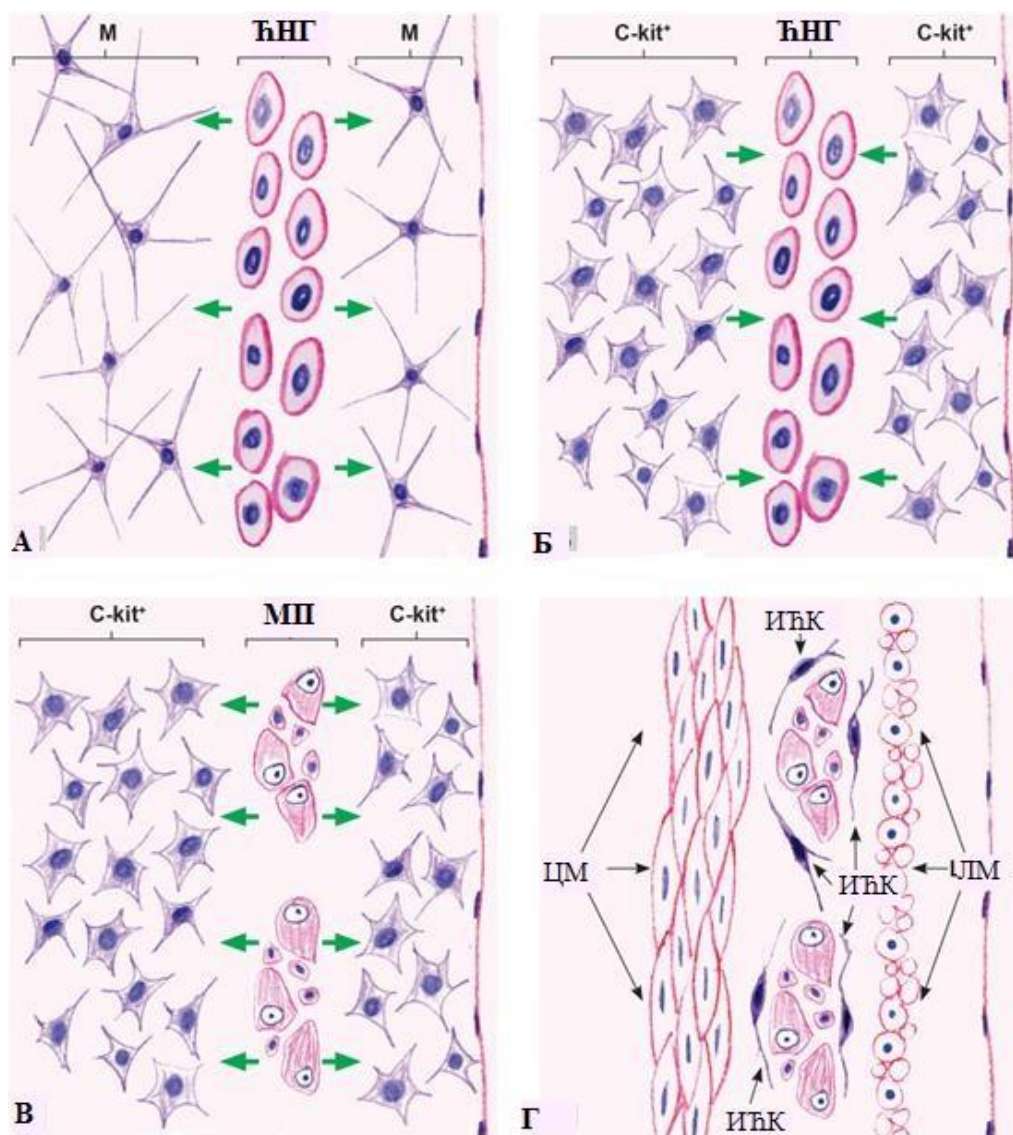
Ћелије нервног гребена имају одлучујући утицај на диференцијацију ИЋК у дигестивном тракту човека. У сложенем процесу реципрочне индукције ЋНГ-а и локалног мезенхима, први-диферентовани *c-kit* позитивни прекурсори представљају вероватно заједничке прекурсоре ИЋК и глатко-мишићних ћелија. Ови прекурсори могу утицати на диференцијацију ЋНГ-а у неуроне и глија ћелије. Такође, неурони индукују диференцијацију *c-kit* позитивних прекурсора који леже непосредно око њих у зреле ИЋК, док се преостали прекурсори, у одсуству Кит стимулације, диферентују у глатко-мишићне ћелије (*Radenkovic et al., 2017*).

Током ембрионалног развића ГИТ-а, ИЋК се појављују око 2-3 недеље након појављивања енетричког нервног система, одмах након диференцијације циркуларног мишићног слоја (*Wallace and Burns, 2005, Radenkovic et al., 2010a, Radenkovic et al., 2010b, Radenkovic and Abramovic, 2012, Radenkovic, 2012, Abramovic et al., 2014*). Од 10. недеље развића, број *c-kit* позитивних ћелија се знатно смањује и преузима морфолошке карактеристике зрелих ИЋК, какве су у каснијем феталном периоду и након рођења (*Radenkovic et al., 2010a, Radenkovic et al., 2010b, Radenkovic, 2012, Abramovic et al., 2014*). У периоду када се смањује број *c-kit* позитивних ћелија, појављују се и глатко-мишићне ћелије уздужног слоја, тако да се стиче утисак да се део *c-kit* позитивних ћелија диферентује у глатко-мишићне ћелије (*Radenkovic, 2012, Torihashi et al., 1997, Kluppel et al., 1998*). Ову хипотеза поткрепљују радови о ИЋК трансдиференцијацији, тј. чињенице да се у одсуству стимулације Кит рецептора ИЋК диферентују у глатко-мишићне ћелије, као и да постоје морфолошке и функционалне сличности између ИЋК и глатко-мишићних ћелија (*Torihashi et al., 1999, Mei et al., 2009*).

Сматра се да је Кит сигнализација неопходна за раздвајање мезенхимних прекурсора током диференцијације ИЋК (*Beckett et al., 2007, Torihashi et al., 1995*). ИЋК и глатко-мишићне ћелије имају заједничког прекурсора који испољава експресију

C-kit и *SMMHC* (*Smooth Muscle Myosin Heavy Chain*) рецептора (*Kluppel et al., 1998*). У ћелијама предодређеним за диференцијацију у глатко-мишићне ћелије гаси се експресија *C-kit*-а, и започиње синтеза протеина миофиламената, док ћелије предодређене за диференцијацију у ИТК, задржавају *C-kit* експресију и постнатално. Такође *C-kit* сигнализација неопходна је и постнатално за нормалан развој, пролиферацију, матурацију, умрежавање, одржавање функције и опстанак ИТК фенотипа у ГИТ-у (*Beckett et al., 2007*). Лиганд Кит рецептора је цитокин назван *stem cell factor* (*SCF*), познат и под именом *steel factor* (*SF*), фактор стимулације раста мастоцита или као Кит-лиганд (*KL*). Код мутираних, хетерозиготних мишева (*Sl/Sl^d*, код којих је експресија *SCF* делимично оштећена) изостаје диференцијација ИТК (*Sanders et al., 1999, Ward et al., 1994*). ИТК се могу развити код мишева са генетским дефектом експресијом *C-kit*-а, и њихов број се не разликује од нормалних јединки у првих пет дана постнатално, али након тога њихов број драстично опада (*Young, 1999, Kluppel et al., 1998, Torihashi et al., 1995*). На основу овога, закључено је да *SCF*/Кит сигнални пут није неопходан за диференцијацију ИТК из заједничке прекурсорне ћелије, већ за одржавање њиховог фенотипа, раст и пролиферацију постнатално.

Највероватније се неке од ових *c-kit* позитивних ћелија диферентују у ИТК, а нарочито оне које леже непосредно уз ганглионе МП, тако да се ИТК-мијентеричног плексуса (ИТК-МП) прво појављују у једњаку, желуцу и танком цреву (*Wallace and Burns, 2005, Radenkovic et al., 2010b, Abramovic et al., 2014, Wester et al., 1999*). Оне леже на граници ганглиона МП (слика 11.), у потпуности окружујући их својим телом и наставцима, али се не налазе у ганглионима. Експериментални подаци показују да ентерични неурони експримирају *SCF* (*Torihashi et al., 1996, Wu et al., 2000, Young et al., 1998*). Експресија *SCF* неурона може изазвати диференцијацију *c-kit* позитивних ћелија у ИТК-МП које се налазе одмах око њих.



Слика 11. Могући образац интеракције и реципрочне индукције ННГ и мезенхимних ћелија у зиду примитивног црева. **А)** ННГ насељавају спољни део зида примитивног црева, а под дејством фактора раста (ГДНФ, ЕТ-3, БМП2/4...) које секретују мезенхимне ћелије, брзо пролиферишу. Истовремено, ННГ индукују диференцијацију суседних мезенхимне ћелија у *c-kit* позитивне ћелије. **Б)** *c-kit* позитивне ћелије вероватно смањују продукцију ГДНФ и индукују диференцирање ННГ у неуроне (ћелије са неуронским фенотипом) и глија ћелије, што успорава њихову миграцију и груписање како би се формирао зачетак МП. **В)** Неурони, као један од извора *STF*-а, индукују диференцијацију *c-kit* позитивних ћелија, које се налазе одмах око њих, у ИЦК-МП. **Г)** остале *c-kit* позитивне ћелије се диферентују у глатко-мишићне ћелије, углавном уздужног слоја. М-мезенхималне ћелије; ННГ-ћелије неурвног гребена; *c-kit*+ *c-kit* позитивне ћелије; МП-миентерични плексус; ИЦК-интерстицијске ћелије Кахала; ЦМ-кружни мишићи; ЛМ-уздужни мишићи (Radenkovic et al., 2017).

Након диференцијације ганглиона МП, неурони мигрирају центрипетално кроз кружни мишићни подслој до субмукозне границе где се диферентују у ганглионе СМП, тако да се СМП појављује 2-3 недеље након МП. ИТК-субмукозног плексуса (ИТК-СМП) појављују се 2-3 недеље након диференцијације ИТК-МП (*Jiang et al., 2003, Wallace and Burns, 2005, Radenkovic et al., 2010a, Radenkovic et al., 2010b*). Овакав начин диференцијације ИТК-МП и ИТК-СМП дешава се кроз целу дигестивну цев сем у колону, где диференцијација ИТК прати другачији образац. ИТК-МП и ИТК-СМП се појављују истовремено у дебелом цреву, а разлог томе је што се *c-kit* позитивне ћелије истовремено диферентују на МП и СМП нивоима. Иначе, у свим деловима дигестивне цеви, ИТК са улогом пејсмејкера (ИТК-МП и ИТК-СМП) су први тип ИТК који се диферентује (*Ward et al., 1998, Faussone-Pellegrini et al., 2006, Pluja et al., 2001*).

Недавна студија указују на то да се у адултном цреву налазе прекурсори/матичне ћелије чија диференцијација може произвести не само ИТК, већ и глатко-мишићне ћелије и можда друге врсте ћелија које су укључене у одржавање ИТК мреже (*Lorincz et al., 2008*). Чен и сарадници су предложили хипотезу да неке *c-kit* позитивне ћелије задржавају карактеристике ИТК прогениторских ћелија након рођења, чиме се могу диферентовати у ИТК по потреби (*Chen et al., 2014*). Такође, показано је да су Кит позитивне ћелије коштане сржи способне да репопулишу танко црево у одговору на повреду црева (*Liu et al., 2010*).

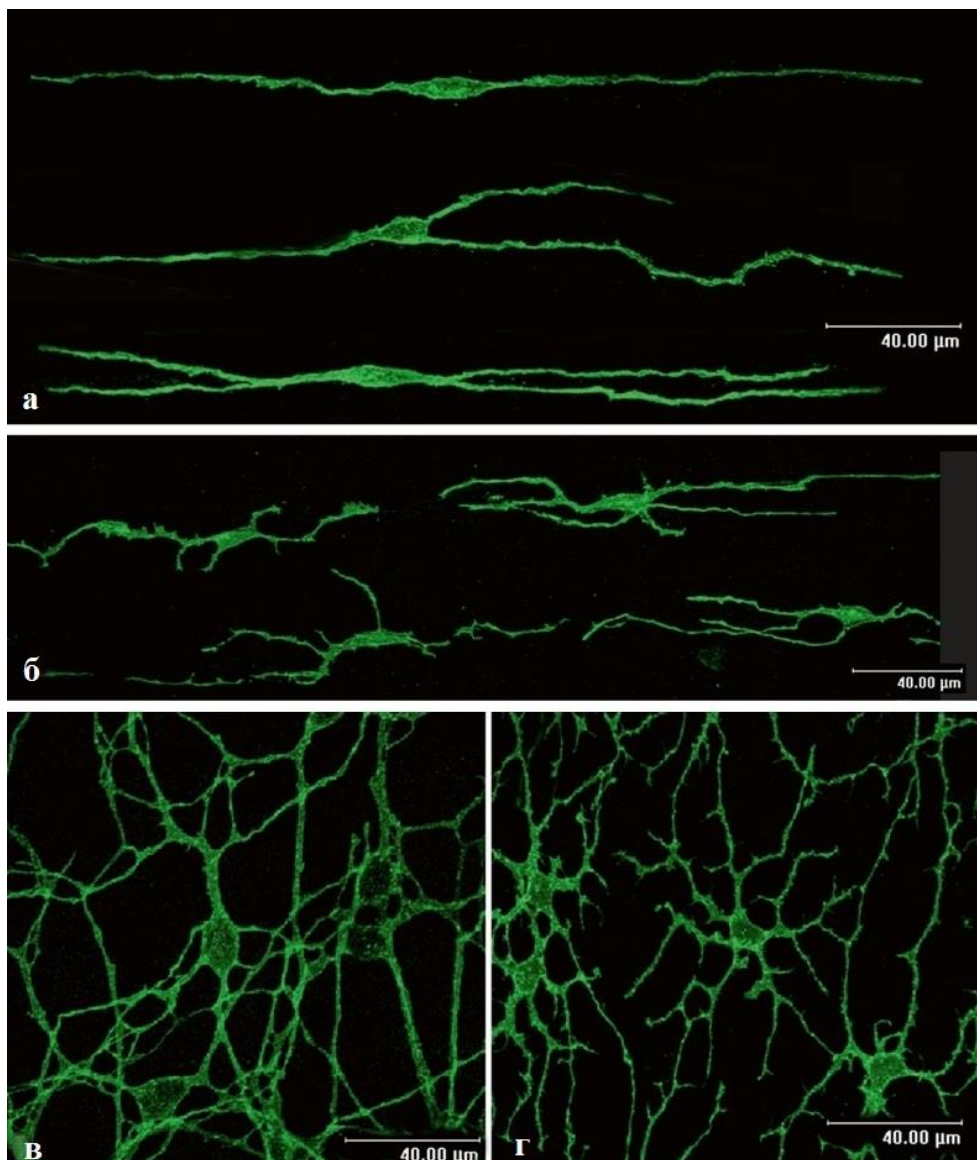
1.4.3. Морфолошке карактеристике, подела и дистрибуција интерстицијалне ћелије Кахала

Интерстицијалне ћелије Кахала су организоване у виду дводимензионалних и тродимензионалних мрежа и снопова међусобно повезаних ћелија, које остварују контакте са нервним плексусима и глатко-мишићним ћелијама. ИТК показују специфичну дистрибуцију, аранжман и ћелијски облик у зависности од своје локализације унутар различитих слојева зида ГИТ-а (*Komuro, 2006*). Постоји неколико критеријума класификације ИТК: а) на основу своје локализације ИТК се могу поделити на субмускуларне, интрамускуларне, мијентеричне и субсерозне; б) на основу морфолошких карактеристика ИТК се могу разврстати у биполарне и стелатне ћелије (слика 12.) в) на основу своје примарне функције ИТК се могу поделити на пејсмејкерске, медијаторе неуромускуларне неуротрансмисије, и механорецепторе (*Sanders and Ward, 2007, Yin and Chen, 2008, Al-Shboul, 2013*).

Тренутно најприхватљивија свеобухватна подела ИТК, коју је предложио Комуро, разврстава ИТК на више ћелијских типова на основу различитих образаца дистрибуције, локализације, морфолошких и функционалних особина (*Komuro, 2006*). Унутар мишићног слоја гастроинтестиналног тракта присутни су следећи подтипови ИТК:

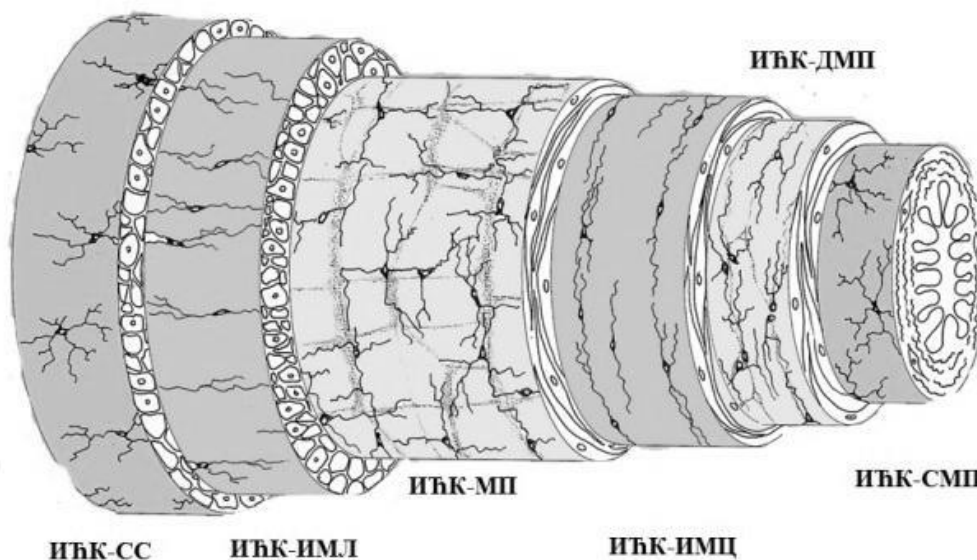
- **ИТК мијентеричног плексуса (ИТК-МП):** налазе око ганглиона мијентеричног плексуса између кружног и уздужног мишићног слоја желуца, танког и дебелог црева. ИТК-МП су мултиполарне, звездасте ћелије са 3-5 примарних цитоплазматских наставка који су у контакту са околним нервним структурама и глатко-мишићним ћелијама. Примарни цитоплазматски наставци се секундарно и терцијално гранају и такође се међусобно повезују са наставцима других ИТК-МП у тродимензионалну мрежу око ганглиона, али тако да наставци не залазе унутар ганглиона.
- **ИТК субмукозног плексуса (ИТК-СМП),** или раније називане ИТК-субмукозе (ИТК-СМ): мултиполарне ћелије које су међусобно повезане у ретку растреситу мрежу на граници субмукозног везивног ткива и циркуларног мишићног слоја. ИТК-СМП су присутне у низу паралелно са суседним глатко-мишићним ћелијама кружног подслоја, и садрже разгранате међусобно повезане цитоплазматске наставке (*Seki and Komuro, 2002, Horiguchi et al., 2001*).

- **интрамускуларне ИЋК (ИЋК-ИМ)** налазе се унутар циркуларног и лонгитудиналног мишићног слоја. ИЋК-ИМ су биполарне ћелије са два цитоплазматска наставка који полазе са супротних полова ћелије, оријентисане паралелно са суседним глатко-мишићним ћелијама. Могу се поделити по локализацији на ИЋК-ИМ кружног подслоја (ИЋК-ИМЦ) и ИЋК-ИМ уздужног мишићног подслоја (ИЋК-ИМЛ). На појединим местима ИЋК-ИМ се могу умрежавати у дуге линеарне ћелијске низове (*Velickov et al., 2016*). ИЋК-ИМЛ су сличног облика као ИЋК-ИМЦ али су мање бројне од њих кроз цео ГИТ.
- **ИЋК у септама (ИЋК-СЕП)** су мање бројне биполарне ћелије оријентисане перпендикуларно у односу на глатко-мишићне ћелије које обухватају више мишићних снопова, налазе се у везивно-ткивним септама које раздвајају мишићне снопове циркуларног мишићног слоја (*Mazet and Raynier, 2004*).
- **ИЋК дубоког мишићног плексуса (ИЋК-ДМП)** су мултиполарне ћелије које су присутне само у танком цреву, око ганглиона дубоког мишићног плексуса у циркуларном мишићном слоју.
- **ИЋК субсерозе (ИЋК-СС)** су спорадичне, сателитске ИЋК, звездастог облика које се налазе у субсерозном слоју танког и дебелог црева ГИТ-а пацова (*Thuneberg, 1982, Vanderwinden et al., 2000*).



Слика 12. Облици ИћК унутар мишићног слоја ГИТ-а заморца. А: биполарне ћелије унутар кружног мишићног подслоја желуца. Б: мултиполарне ћелије кружног мишићног подслоја танког црева. В: Мултиполарне ћелије које формирају тродимензионалну мрежу око ганглиона мијентеричног плексуса дебелог црева. Г: мултиполарне ћелије на граници субмукозе и мишићног слоја колона. Конфокална скенинг имунофлуоресцентна микроскопија (Komuro, 2012).

Локализација различитих ИћК подтипова шематски је приказана на слици 13. Ћелијски облик и аранжман сваког ИћК подтипа углавном је одређен њиховим односом са локалним нервним плексусима, оријентацијом глатко-мишићног слоја и учесталашћу умрежавања ИћК између себе (Komuro, 2006).



Слика 13. Дистрибуција и ћелијски типови ИЋК у зиду црева. ИЋК-СС (ИЋК субсерозе); ИЋК-ИМЛ (интрамукуларне ИЋК лонгитудиналног подслоја); ИЋК-МП (ИЋК мијентеричног плесуса); ИЋК-ИМЦ (интрамукуларне ИЋК циркуларног слоја); ИЋК-СМП (ИЋК субмукозног плесуса); ИЋК-ДМП (ИЋК дубоког мишићног плесуса) (Koturo, 2012).

Иако су ИЋК готово униформно распоређене кроз мускулатуру ГИТ-а, постоје регионалне разлике дистрибуције ИЋК унутар различитих органа ГИТ-а, и унутар различитих делова истог органа (Koturo, 2006). Посебно у желуцу постоје регионалне разлике дистрибуције ИЋК. ИЋК-ИМЦ и ИЋК-ИМЛ су густо заступљене кроз танки кружни и уздужни мишићни слој кардије, фундуса и дела корпуса желуца, док ИЋК-МП потпуно изостају у овом региону. ИЋК-МП присутне су у нижим деловима корпуса, антрума и пилоруса, док број ИЋК-ИМЦ и ИЋК-ИМЛ опада (Mazet and Raynier, 2004).

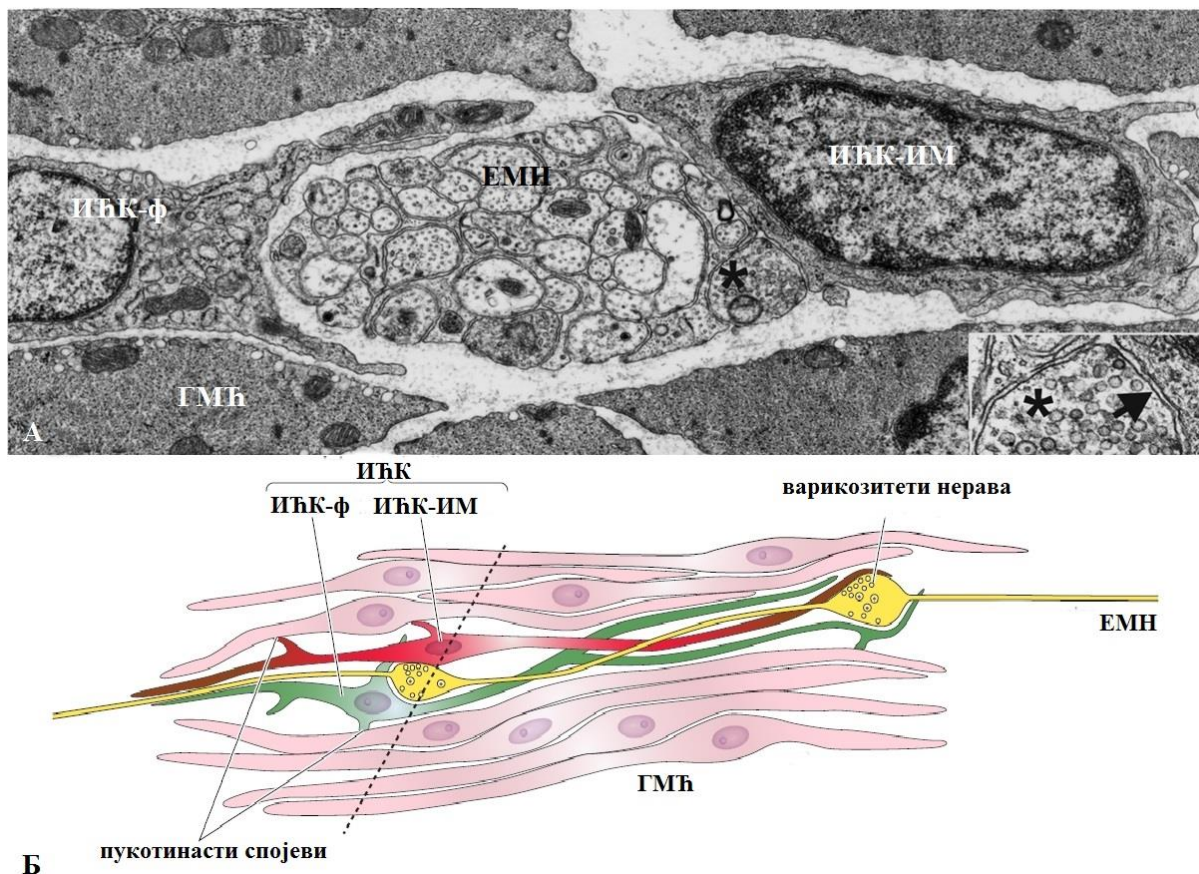
1.4.4. Ултраструктурне карактеристике интерстицијалних ћелија Кахала

Сви ИЋК субтипови имају заједничке ултраструктурне карактеристике као што су: присуство бројних митохондрија, изразити интермедијарни филаменти, умерено развијен Голџи апарат, гранулисани и глатки ендоплазматски ретикулум, блиски контакт са нервним вариозитетима где формирају синапсе са нервним влакнима. Важна ултраструктурна карактеристика ИЋК је формирање комуникантних веза међусобно, са другим суседним ИЋК, као и са глатко-мишићним ћелијама (*Komuro et al., 1999*). Пукотинасти спојеви између глатко-мишићних ћелија и ИЋК остварују електричну повезаност ових ћелија и омогућују да се туника мускуларис ГИТ-а понаша као један мултицелуларан електрични синцицијум (слика 14.). Промене електричне спроводљивости једног типа ћелија синцицијума утичу на електричну екситабилност осталих упарених типова ћелија (*Sanders et al., 2014b*). Поједини типови ИЋК поседују особине типичне за глатко-мишићне ћелије као што су присуство базалне ламине која је испрекидана, присуство кавеола, густих тела и цистерни локализованих тик уз мембрану (*Tamada and Komuro, 2012*). ИЋК такође формирају блиске контакте (< 20 nm) са нервним завршецима (*Berezin et al., 1990, Torihashi et al., 1993*) где се експримирају рецептори за различите неуротрансмитере (*Publicover et al., 1992, Rumessen et al., 1993, Shuttleworth et al., 1993, Young et al., 1993, Sternini et al., 1995, Young et al., 1996, Portbury et al., 1996*), што указује на формирање веза сличних синапси између ИЋК и нерава. Електронска микроскопија и шематски приказ синцицијума глатко мишићне ћелије-ИЋК-нервни завршеци (МИН) приказан је на слици 14. Овај блиски контакт нервних завршетака и ИЋК указује на моторну инервацију ИЋК (*Sanders et al., 2014b*). Ремоделовање или губитак било које компоненте овог синцицијума, или губитак повезаности његових елемената (губитак пукотинастих спојева) доводи до абнормалне моторне функције ГИТ-а (*Sanders et al., 2014b*).

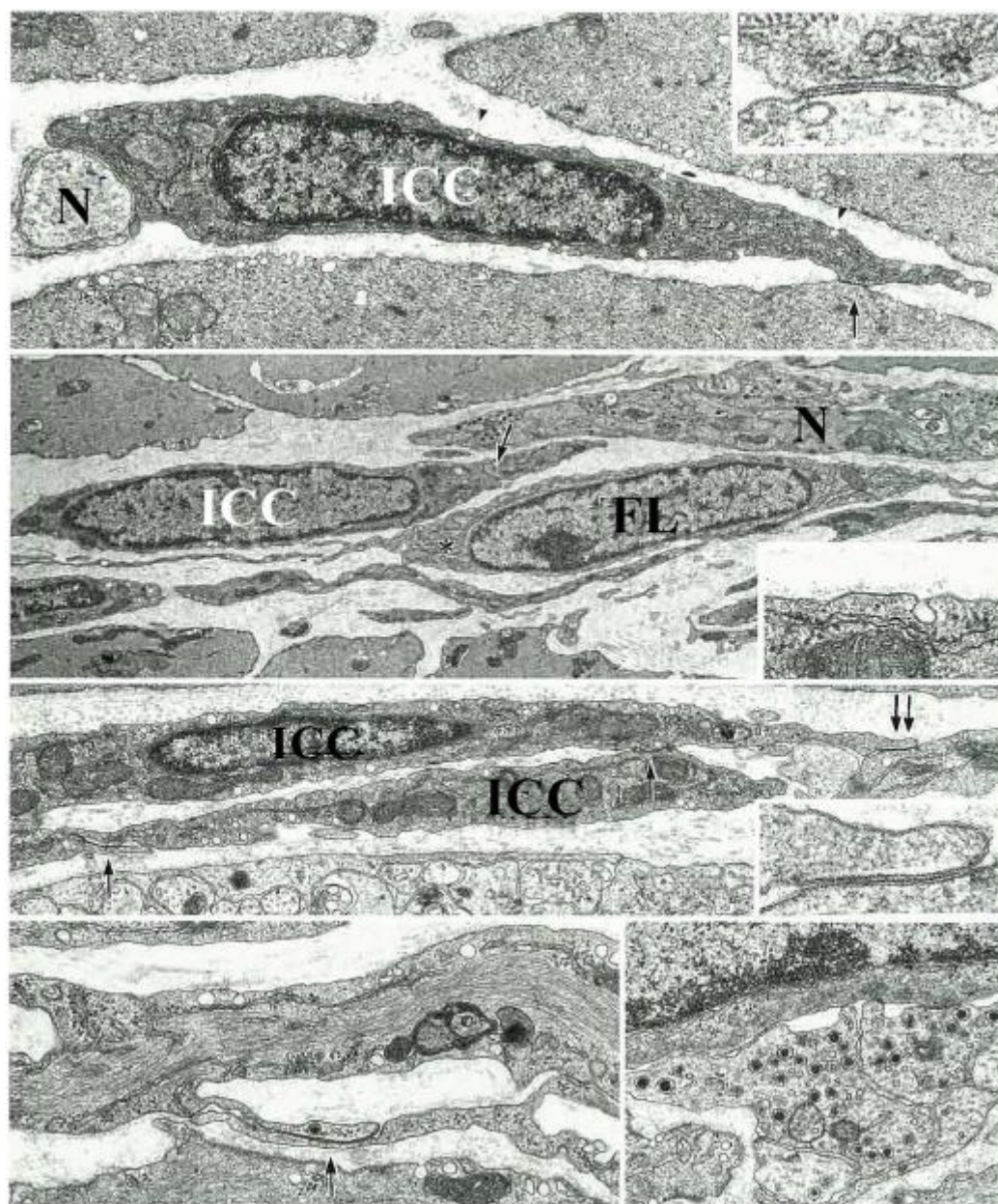
ИћК могу бити вретенасте издужене ћелије са два цитоплазматска наставка који полазе са супротних крајева тела ћелије, или звездасте ћелије дијаметра 20 μm са до пет цитоплазматских наставка који се секундарно и терцијално гранају и који се спајају са телом или наставком суседних ИћК (*Tamada and Komuro, 2012*). Једно ИћК је еухроматично, овално, са једним до два једарца, и са мало згуснутог хроматина на периферији. Бројне издужене митохондрије присутне су у свим деловима цитоплазме, а нарочито нагомилане на почетку и на месту рачвања цитоплазматских наставка. Снопови танких филамената налазе се периферно, док су виментински интермедијални филаменти изражајни у телу и наставцима ћелије (*Komuro et al., 1999, Komuro, 2006, Farrugia, 2008, Faussone-Pellegrini et al., 2013*).

Упркос заједничким ултраструктурним особинама постоје одређене морфолошке разлике ИћК. У зависности од локализације ИћК се међусобно разликују, по присуству базалне ламине и израженог низа кавеола, због чега наликују више фибробластима или глатко-мишићним ћелијама. На основу тога ИћК се могу поделити у три типа: а) први тип ИћК сличне фибробластима које имају слабо изражену, дисконтинуирану базалну ламину и одсуство израженог низа кавеола; б) други тип, интермедијарни тип, са присутном базалном ламином и мноштвом кавеола; в) трећи тип, ИћК које највише наликују глатко-мишићним ћелијама, са мноштво кавеола (*Komuro, 2012, Sanders et al., 2014b*).

ИћК имају сличне електроно-микроскопске особине као и глатке мишићне ћелије и фибробласти. За разлику од глатко-мишићних ћелија, ИћК не садрже миозинске филаменте, па се сврставају у не-контракtilне ћелије. Са друге стране, фибробласти не показују каволе, а ретко имају глатке ендоплазматске цистерне, интермедијалне филаменте или парцијалну базну ламину као ИћК (*Komuro et al., 1999, Komuro, 1999, Komuro, 2006*). Ултраструктурне карактеристике ИћК приказане су на слици 15.



Слика 14. Структуре компоненте МИН синцицијума. А: трансмисиона електронска микроскопија нервног снопа са околним ћелијама. У близини снопа аксона ентеричног моторног неурона (ЕМН) налази се три типа ћелија: глатко-мишићна ћелија (ГМЋ), ИЋК-слична фибробластима (ИЋК-ф) и интрамукуларне ИЋК сличне глатко-мишићним ћелијама (ИЋК-ИМ). Бар=0,5 μm . Детаљ на слици приказује варикозитети аксона ентеричког моторног неурона (звездица) и близак контакт са ИЋК, <20 nm (црна стрелица). Бар 0,2 μm . Б: Шематски приказ повезивања МИН синцицијума. Испрекидана линија показује пресек са слике (А). Глатко-мишићне ћелије (ГМЋ), ИЋК (ИЋК-ф и ИЋК-ИМ) су распоређене око ексцитаторних и инхибиторних аксона ентеричних моторних неурона (ЕМН). (Sanders et al., 2014b).



Слика 15. Електрономикрографије ИћК из Атласа интерстицијалних ћелија Кахала у гастроинтестиналном тракту. ИћК (*ICC*) се карактеришу електроно-густом цитоплазмом, присуством кавеола (врх стрелице), пукотинастим спојевима (стрелице) са глатко-мишићним ћелијама и блиским контактом са нервним терминалима (*N*). ИћК слична фибробластима (*FL*) у близини нерва. Увећање $\times 47000$ (Komuro, 2012)

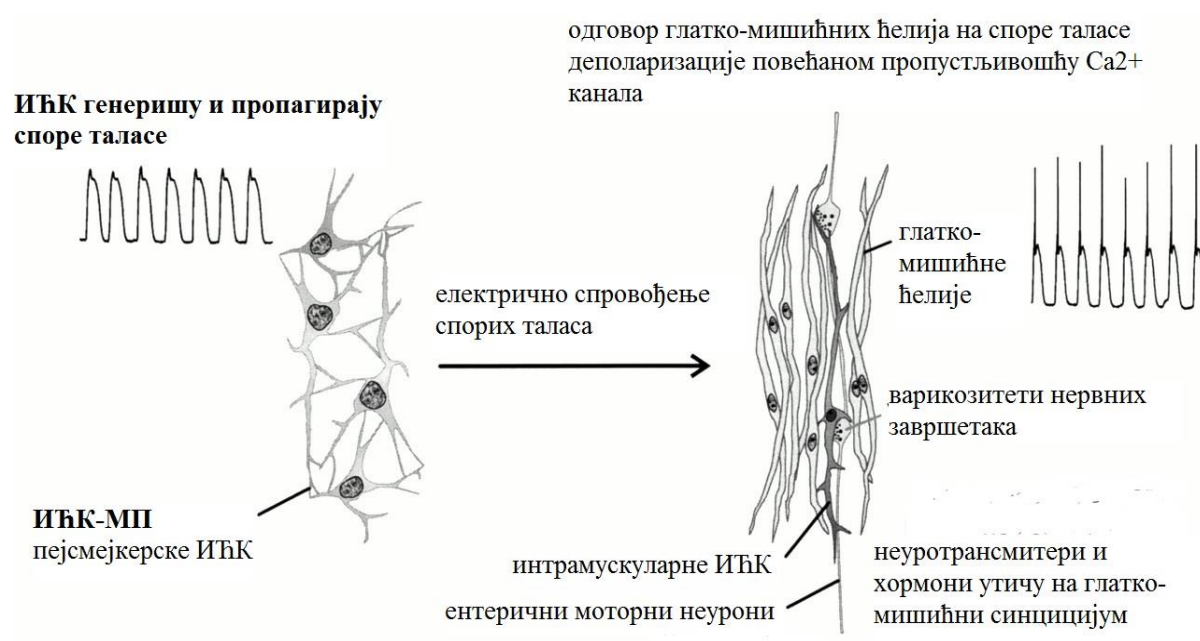
1.4.5. Функција интерстицијалних ћелија Кахала

Иако ИЋК представљају само 5% ћелијске популације мишићног слоја ГИТ-а, неопходне су за успостављање и адекватно функционисање гастроинтестиналног мотилитета. Први докази улоге ИЋК у контроли ГИТ мотилитета показани су на „knock-out“ животињским моделима са блокираним Кит рецептором. Ове животиње су развиле озбиљну дисфункцију покретљивости ГИТ-а са губитком споро-таласне фазе перисталтичких покрета (*Huizinga et al., 1995, Ward et al., 1994*). ИЋК-МП подтипови формирају мреже одговорне за гастроинтестиналну моторну контролу и контракцију интестиналне мускулатуре (*Huizinga and Lammers, 2009, Hwang et al., 2009*), док ИЦЦ-ИМ подтип служи као посредник моторичке неуротрансмисије (*Ward et al., 2000, Suzuki et al., 2003, Sanders et al., 2014a, Ward and Sanders, 2006, Sanders et al., 2014b*). ИЋК такође играју улогу у аферентној неуралној сигнализацији и делују као механорецептори (*Thuneberg and Peters, 2001, Won et al., 2005, Garcia-Lopez et al., 2009*). Спонтана пејсмејкерска активност коју генеришу ИЋК спроводи се на глатко-мишићне ћелије и омогућује електричне споре таласе и фазну контракцију, а такође ИЋК спроводе нервни сигнал ка глатко-мишићним ћелијама и на тај начин модулишу контракције мускулатуре (*Sanders et al., 2014b*).

1.4.5.1. Интерстицијалне ћелије Кахала у улози пејсмејкера, генератора електричне ритмичности и пропагације спорих таласа

Интерстицијалне ћелије Кахала представљају изворе такозваних спорих таласа перисталтичке контракције. Спори таласи глатко-мишићне мускулатуре представљају периодичне осцилације мембранског потенцијала, континуирани циклуси деполаризације и реполаризације различите фреквенце, односно рапидни пик и дужи фазни плато са следственом реполаризацијом (*Sanders et al., 2014b*). Ове флукутације мембранског потенцијала имају карактеристичну фреквенцу у сваком органу ГИТ-а, и за сваку животињску врсту, између 3 до 50 циклуса по минути (*Al-Shboul, 2013*). Спори таласи изазивају алтерације кратког периода високе и ниске екситабилности, где период високе екситабилности одговара плато фази спорих таласа. Сматра се да ИЋК-МП представљају пејсмејкере интризичних фазних контракција (слика 16.), док ритмичне

контракције, које настају независно као одговор на истезање услед повећаног интралуминалног притиска, имају свој пејсмејкер у ИТК-СМП (*Huizinga et al., 2011*). Код пацова ИТК-СМП показане су само у цекуму и колону, упркос чињеници да се СМП налази у ГИТ-у готово целом дужином (*Tamada and Komuro, 2012*). ИТК-СМП су поред пејсмејкерске улоге укључене и у регулацију специфичних функција мукозе колоне као што су секреција, апсорпција и транспорт течности (*Tamada and Komuro, 2011*).



Слика 16. Организација електричне активности у контракцији гастроинтестиналне мускуларуре (*Sanders, 2000*).

Примарна улога ИТК-МП је генерисање спорих таласа деполаризације чиме одређују пропацију и трајање фазе контракције мускулатуре ГИТ-а. Глатко-мишићне ћелије имају мирујући потенцијал између -80 до -40 mV, што је ван домета волтажне зависних Ca^{2+} канала, тако да оне нису у могућности да генеришу акциони потенцијал. Такође, спори таласи перисталтике су не-неурогени, што је доказано блокирањем нервне функције тетрадоксином који није реметио споре таласе. Инфлукс Ca^{2+} у ИТК је иницијални корак активације спорих таласа. Следствена деполаризација изазива активну пропацију спорих таласа кроз мрежу ИТК, од ћелије до ћелије, у правцу ширења таласа. Како се спори таласи пропагирају кроз мрежу ИТК, пасивно се преносе на глатко-мишићне ћелије које су већ електрично упарене са ИТК преко

пукотинастих спојева. На овај начин отварају се L - Ca^{2+} канали глатко-мишићне ћелије чиме започиње процес контракције (*Sanders et al., 2014b*).

У пропагацији спорих таласа ИТК учествују T - Ca^{2+} канали, по чему се они разликују од ритмичних електричних таласа глатких мишића и срца, у чијем преношењу учествују калцијумски L -канални (*Takaki, 2003*). Фреквенца спорих таласа одређује фреквенцију контракције глатких мишића, док је снага контракције глатко-мишићних ћелија одређена њиховом амплитудом (*Farrugia, 2008*).

1.4.5.2. Интерстицијалне ћелије Кахала као медијатори неуротрансмисије у гастроинтестиналном тракту

Управо је функција ИТК, као посредника у неуротрансмисији, била прва идентификована функција ИТК (*Burns et al., 1996*). ИТК остварују блиске контакте како са ексцитаторним холинергичким, тако и са инхибиторним нитринергичким нервним влакнима (*Ward et al., 2006, Ward and Sanders, 2006, Kito, 2011*). Електроно-микроскопска истраживања показала су да ИТК остварују врло близак контакт налик синапси (мање од 20nm) са варикозитетима моторних неурона ЕНС, док су, са друге стране, ИТК повезане пукотинастим спојевима са глатко-мишићним ћелијама (*Komuro et al., 1999, Sanders et al., 2014b*). Поред тога, уочено је да нервнимоторних неурона ЕНС-а не остварују блиске контакте нити синаптичке специјализације са глатко-мишићним ћелијама (*Sanders et al., 2014b*). Такође, имунохистохемијским методама доказано је постојање специфичних синаптичких молекула и рецептора за неуротрансмитере на споју ИТК и моторних неурона ЕНС-а који их директно инервишу (*Kito, 2011*). На основу поменутих студија, сматра се да су ИТК, које су функционално уметнуте између моторних неурона ЕНС и глатко-мишићних ћелија, неопходне за деловање холинергичке и нитринергичке неуротрансмисије и неуромодулације.

1.4.5.3. Улога интерстицијалних ћелија Кахала у аферентној сигнализацији

Интрамукуларни завршеци аферентних влакана (ИМА) глатко-мишићног ткива ГИТ-а гранају се у комплексне низове терминалних процеса који се пружају паралелно са глатко-мишићним ћелијама, и у вези су са ИТК-ИМ (*Powley et al., 2008, Sanders et al., 2014b*). Ова влакна су такође удружена са еферентним влакнима инхибиторних моторних неуронима преко *nNOS (neuronal nitric oxide synthases)*, са ексцитаторним моторним неуронима преко ацетил-холина, и симпатичким влакнима преко тирозин-хидроксилазе (*Sanders et al., 2014a*). Варикозитети ИМА формирају контакте сличним синапси са ИТК-ИМ (*Huizinga et al., 2008b, Powley and Phillips, 2011*). Функција комплекса ИТК-ИМ и аферентних интрамукуларних завршетака још увек није разјашњена. Доказано је да вагусна аферентна влакна учествују у аксонском рефлексу, чији аксон носи сензорне и ефекторне сигнале, без успостављања синапсе или помоћи интеграционог центра (*Wei et al., 1995*). Бројни ламеларни варикозитети ИМА дистрибуирани око ИТК, највероватније инервишу ИТК и на тај начин омогућају интеграцију сензорно-моторне функције сензорним аферентним неуронима (*Sanders et al., 2014a*).

Такође, показано је да и интризични примарни аферентни неурони (ИПАН) инервишу ИТК-МП у танком цреву. ИПАН су мијентерични неурони чији наставци залазе у ламину проприју како би преносили механичке и хемијске надражаје из луминалног садржаја црева, и на тај начин учествују у аферентној грани гастро-интестиналног рефлекса (*Furness, 2012*). Ови неурони остварују блиски контакт са ИТК-МП, и деполаризација ових неурона је у корелацији са модулацијом уласка Ca^{2+} у ИТК-МП (*Zhu et al., 2014*).

1.4.5.4. Интерстицијалне ћелије Кахала као механорецептори

Поред нерава и глатко-мишићних ћелија, ИТК могу имати сензорну улогу у трансдукцији механичких надражаја и омогућити *feedback* који утиче на мотилитет. Улога ИТК као рецептора истезања (*stretch receptors*) заснована је на морфолошким и функционалним истраживањима, где се претпоставља да се истезање глатко-мишићних ћелија преноси на ИТК-ИМ помоћу посебних спојева по типу канала и жлеба (*peg-and-socket junctions*) (Thuneberg and Peters, 2001). Могући молекуларни механизам који условљава ове функције ИТК-ИМ је активација фосфолипазе А₂ (PLA₂) која ослобађа арахидонску киселину (Won et al., 2005). Након истезања глатко-мишићне ћелије, ИТК изазива пролазну деполаризацију мишићних ћелија и повећање фреквенце спорих таласа перисталтичких контракција (Mazet and Raynier, 2004), те се претпоставља да и други ИТК подтип, пејсмекерске ИТК, експримирају механосензитивну спроводљивост Na⁺ и тиме регулише фреквенцу спорих таласа (Sanders et al., 2014b).

1.4.6. Идентификација интерстицијалних ћелија Кахала

Рутинским (хематоксилин-еозин) ХЕ бојењем није могуће показати и идентификовати ИТК. У мишићном слоју ГИТ-а, глатко-мишићне ћелије су у изобиљу и лако се идентификују на основу свог облика, док су ИТК ретко заступљене (5-10% запремине мишићног слоја (Sanders et al., 2014b) и тешко их је идентификовати са сигурношћу јер се преклапају са густим глатко-мишићним ћелијама.

ИТК се идентификују помоћу експресије CD117(*C-kit*), мембранског рецептора са тирозин-киназом активношћу (Takaki, 2003, Ward, 2000, Long et al., 2004).

Садашња дефиниција ИТК у гастроинтестиналном тракту захтева експресију *C-kit* рецептора на површини ћелије, и постојање најмање два ћелијска наставка (Farrugia, 2008). Антитела на *C-kit* протеин селективно обележавају ИТК у свим деловима ГИТ-а различитих животињских врста и човека. Услов за постојање најмање два наставка, искључује мастоците, које су такође *C-kit*-имунореактивне ћелије. Мастоцити се диферентују од ИТК на основу њиховог кружног или овалног облика без цитоплазматских наставка, садржаја гранула и локализације.

Антитела на *NK1* рецептор (рецептор за супстанцу *P*) обележавају ИТК дубоког мишићног плексуса у танком цреву али и субпопулацију ентеричних неурона, тако да нису специфична за доказивање ИТК (*Young et al., 1996*).

Идентификација ИТК преко експресије антигена *CD34* данас је одбачена, јер су резултати истраживања показали да *CD34* позитивне ћелије нису ИТК, већ фибробласти у непосредној близини ИТК (*Komuro, 1990, Nakayama et al., 2000, Streutker et al., 2003, Vanderwinden et al., 1999*). Поједини субтипови ИТК такође експримирају *WT-1* (*Wilm's tumore gene 1*), *Na⁺/K⁺/2CL⁻* ко-транспортер (НКСС1), *neurokinin-1* рецептор и *CD44*, али није потврђена њихова селективна специфичност у ГИТ-у (*Chen et al., 2007, Al-Shboul, 2013, Wouters et al., 2006*).

Недавно је показано да је аноктамин1 (*Ano1*), протеин калцијум зависни хлоридног канала, нови селективни маркер свих класа ИТК у ГИТ-у човека и миша (*Gomez-Pinilla et al., 2009*).

1.4.7. Поремећаји мотилитета гастроинтестиналног тракта узроковани алтерацијама интестиналним ћелијама Кахала

ИТК имају кључну улогу у нормалном функционисању ГИТ-а, (пејсмекерска функција ИТК мијентеричног и субмукозног плексуса, неуромодулација и адекватна функцију сфинктера кардије и пилоруса), због чега промене у овим ћелијама могу бити узрок разних интестиналних поремећаја. Одсуство, редукован број или структурне алтерације подтипова ИТК су примећене у неколико поремећаја ГИТ-а код човека, као што су: ахалазија, болест гастро-езофагеалног рефлукса, гастропареза, инфантилна хипертрофична стеноза пилоруса, хронична интестинална псеудообструкција, Хиршпунгова болест, инфламаторна болест црева, успорен транзит дебелог црева и тешка констипација, као и код осталих поремећаја перисталтике ГИТ-а и гастроинтестиналних стромалних тумора (*Faussone-Pellegrini and Cortesini, 1985, Vanderwinden and Rumessen, 1999, Zarate et al., 2003, Gockel et al., 2008, Jain et al., 2003, Streutker et al., 2003, Rolle et al., 2002, Kindblom et al., 1998*). Многи поремећаји мотилитета ГИТ-а се могу довести у везу са променама у броју, структури и густини ИТК (*Mostafa et al., 2010*). Ове промене могу настати примарно, као део самог патолошког процеса, али могу настати и секундарно као оштећења настала различитим механизмима у току еволуције патолошког процеса, што је тешко утврдити на

садашњем нивоу истраживања (*Farrugia, 2008*). Без обзира на узрок, губитак ИЋК или поремећај њихове мреже доводи до дисфункције мотилитета, а можда и сензорних поремећаја, који доприносе клиничкој слици датог обољења.

1.5. ДИЈАБЕТЕСНА ГАСТРОЕНТЕРОПАТИЈА

Шећерна болест или дијабетес мелитус (ДМ) је хронични системски поремећај метаболизма глукозе који се карактерише хипергликемијом. Дијабетес погађа готово све делове ГИТ-а, али је тачна преваленца дијабетесне гастроентеропатије непозната, а главни разлог томе је то што се често симптоми гастроентеропатије приписују другим узроцима и пратећим обољењима (*Ordog et al., 2009, Yarandi and Srinivasan, 2014*). У литератури су присутни подаци да се компликације гастроинтестиналног мотилитета јављају чак код 50-70% оболелих након десетогодишње болести. Дијабетес мелитус тип 2 заступљенији је (90-95%) код оболелих од шећерне болести у односу на тип 1 (*Vinik et al., 2003, Boulton et al., 2005, Sfarti et al., 2010*).

Гастроентеропатија представља значајни здравствени проблем који је честа компликација дијабетес мелитуса и може се манифестовати као гастропареза, успорен интестинални транзит, констипација, дијареја и фекална инконтиненција, дисфагија, горушица, абдоминална нелагодност или бол, мучнина и повраћање. Дијабетес мелитус је повезан с смањењем базалног тонуса доњег езофагеалног сфинктера (ЛЕС), што доводи до појаве гастроезофагеалног рефлуксног поремећаја (*Nishida et al., 2004*). Саопштено је да је покретљивост једњака одложена са поремећеним перисталтичким покретима код пацијената са ДМ (*Kinekawa et al., 2001*).

У желуцу су уочени разни поремећаји мотилитета који се везују за ДМ. Дијабетес мелитус је повезан са брзим раним пражњењем желуца, нарочито у раним стадијумима болести, (*Choi et al., 2007b*), а као компликација ДМ чешће је присутно одложено пражњење желуца и гастропареза (*Camilleri, 2007, Intagliata and Koch, 2007*). Неадекватна релаксација гастричног фундуса је одговорна за рани осећај ситости и диспептичне симптоме (*Undeland et al., 1997*). Електрофизиолошке студије показале су дисритмије споро-таласне контракције, продужене пилоричне контракције и поремећену координацију између антурма и дуоденума (*Chen et al., 1996, Hasler et al.,*

1995). Ефекат дијабетеса на функције танког црева и колона није довољно проучаван, мада је код пацијената са ДМ запажена повећана преваленца констипације и дијареје. Почетна истраживања су указивала на то да се време транзита у цревима успорава код животињских модела са ДМ, што доводи до бактеријског прекомерног размножавања и последичне дијареје (*Sellin and Hart, 1992*), док су друге студије показале присуство убрзаног интестиналног транзита на експерименталним моделима (*Rosa-e-Silva et al., 1996*). Овај убрзани интестинални транзит приписан је аутономној неуропатији и ДМ-индукованој денервацији завршетка гранања симпатичних неурона. Продужено време интестиналног транзита је учестало, а констипација је честа појава код пацијената са ДМ (*Yarandi and Srinivasan, 2014*).

Механизам настанка дијабетесне гастроентеропатије је комплексан и мултифакторијална. Патогенеза дијабетесне гастроентеропатије обухвата промене не само на неуронима аутономног нервног система, већ захвата и глија ћелије, глатко-мишићне ћелије, ендотел капилара мијентеричног плексуса и ИЋК (*Ordog et al., 2009, Bagyanszki and Bodi, 2012*). Међусобна интеракција поменутих структура представља хистофизиолошку основу за перисталтичке контракције и нормално функционисање дигестивног тракта. Разумевање основних механизма дијабетесне гастроентеропатије важно је за развој терапијских процедура за овај чест проблем.

1.5.1. Интерстицијалне ћелије Кахала у дијабетесу мелитусу

Показано је да губитак или дисфункција ИЋК доводи до повишеног базалног тонуса доњег езофагеалног сфинктера са спонтаном контрактилном активношћу и поремећеном релаксацијом, дисаритмије желуца, гастропарезе, спорог интестиналног транзита, поремећених неуроефекторских механизма и измењене висцералне аферентне сигнализације код различитих обољења мотилитета човека и на експерименталним животињским моделима (*Sivarao et al., 2001, Dixit et al., 2006, Farre et al., 2007, Wang et al., 2009, Vanderwinden and Rumessen, 1999, He et al., 2001, Beckett et al., 2007*). Ови гастроинтестинални поремећаји сматрају се знацима дијабетичне гастроентеропатије код пацијената оболелих од дијабетеса мелитуса.

У студијама на животињским моделима ДМ са гастропарезом, показано је да су ИЋК измењене, смањен је се њихов број и недостаје њихово умрежавање. Смањење ИЋК мреже забележено је у корпусу и антруму желуца код *NOD* мишијева (*non-obese*

diabetic mice), који представља експериментални модел дијабетеса типа I (*Ordog et al., 2000, Horvath et al., 2006*). Такође, Ордог (*Ordog*) је доказао да се у желуцу пацова са ДМ, где је забележен губитак густине ИТК-а, углавном ИТК-МП, и даље јављају спори таласи, али неадекватне амплитуде и фреквенције, тако да се такви спори таласи нису могли пропагирати у целом мишићном слоју. У преосталим ИТК примећене су ултраструктурне промене, као што су промене ћелијских наставака и губитак контакта са суседним ганглијама ЕНС (*Ordog et al., 2000*). У мишевима са мутираним лептин рецептором (експерименталан модел тип II дијабетеса мелитуса), такође се јавља мањи губитак ИТК-МП и ИТК-ИМ целом дебљином мишићног слоја желуца, танког и дебелог црева (*Yamamoto et al., 2008*). Губитак ИТК-а је такође забележен у фундусу и корпусу желуца пацова са дијабетесом изазваним стрептозотоцином (СТЗ), нарочито смањење густине ИТК-ИМ у кружном и уздужном слоју мишића и губитак ИТК-СМ (*Wang et al., 2009*). Ванг (*Wang*) (*Wang et al., 2009*) је такође приметио присуство фибробластних ћелија у окружењу ИТК-МП, сматрајући их незрелим ИТК или ИТК које би могле бити укључене у поступак репарације ткива. Други аутори сматрају да ове ћелије попут фибробласта представљају посебан подскуп ГИТ ћелија које имају учешће у мотилитету (*Horiguchi and Komuro, 2000*). Смањење броја ИТК-МП је у вези са измењеним неадекватним спорим таласима перисталтике, док је смањење броја или промене ИТК-ИМ одговорно за поремећену релаксацију кардије, фундуса и антрума (*Wang et al., 2009*).

Промене у ентеричном нервном систему, глатко-мишићним ћелијама и смањење густине ИТК забележено је, слично моделима на животињама, код пацијената са ДМ и углавном са пратећом гастропарезом (*Pasricha et al., 2008, Forster et al., 2005, Iwasaki et al., 2006, Grover et al., 2011, Kim et al., 2012*). Форстер (*Forster*) и сарадници објавили су резултате биопсија желуца 14 пацијената са гастропарезом, укључујући девет пацијената са ДМ код којих је дошло до смањење броја ИТК-а (*Forster et al., 2005*). Слични налази, губитак ИТК и дегенерација преосталих ИЦЦ, приказани су у Гроверовој студији где је испитиван узорак целог зида желуца код 40 пацијената са гастропарезом, укључујући 20 пацијената са дијабетесом (*Grover et al., 2011*).

Смањена популација ИТК-а је показана и у другим деловима ГИТ-а, у танком и дебелом црево, у експерименталним моделима животиња са дијабетесом. За разлику од бројних студија које се односе на дијабетесну гастропарезу (*Wang et al., 2009, Ordog et al., 2000, Horvath et al., 2006, Yamamoto et al., 2008, Velickov et al., 2016*), студије које процењују ИТК код цревне дисфункције у дијабетесу су ретке, пре свега због

потешкоћа испитивања и доступних метода дијагнозе (потребно је анализирати мишићни зид црева који је дубље и не захвата се при биопсирању црева, а такође је тешко ендоскопски доћи до одговарајућих анатомских локација) (*Forrest et al., 2008, Imaeda et al., 1998*). Јамамото и сарадници, користећи *db/db* модел тип 2 ДМ, показали су редукован број ИТК-а у танком и дебелом цреву (*Yamamoto et al., 2008*). Сличан губитак ИТК је примећен у танком цреву и колону експерименталних животиња са дијабетесом (*Lammers et al., 2011, Lin et al., 2010*). Поред тога, губитак *C-kit* позитивних интрамукуларних ИТК описан је у дебелом цреву код седам пацијената који су патили од дијабетеса тип 2 и карцинома дебелог црева (*Nakahara et al., 2002*). Узорак добијен од 38-годишњег пацијента са 15-годишњом историјом слабо контролисаног дијабетеса и доказаном дијабетесном гастроентеропатијом показао је редукцију густине ИТК у миентеричном региону и смањење ИТК-ИМ јејунума (*He et al., 2001*).

Дијабетес мелитус значајно мења микрооколину ИТК-а, што угрожава опстанак ових ћелија. Механизам утицаја дијабетеса мелитуса на ИТК још увек није разјашњен. Промене ИТК-а код дијабетеса могу потенцијално произићи из хипергликемије и пратећег оксидативног оштећења ткива, редукције инсулина и сигнализације инсулину сличног фактора раста, аутоимуним одговором или комбинацијом поменутих чиниоца, као резултат неуравнотежености фактора неопходних за опстанак ИТК (*Huizinga et al., 2009, Ordog, 2008*).

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Бројна досадашња истраживања су показала да интерстицијалних ћелија Кахала (ИЋК) имају кључну улогу у нормалном функционисању гастроинтестиналног тракта (ГИТ) и одговорне су за успостављање адекватне перисталтике. Промене у заступљености, дистрибуцији и морфологији ИЋК у зиду ГИТ-а присутне су код бројних поремећаја мотилитета човека и експерименталних животиња. Дијабетес мелитус утиче на промене ИЋК у ГИТ-у, а сходно значају функције ИЋК за нормално одвијање перисталтике, губитак и промене у броју, дистрибуцији и морфологији ИЋК доприносе симптоматологији дијабетесне гастроентеропатије, која је честа компликација дијабетеса мелитуса.

Имајући у виду та сазнања, претпоставља се да ће код пацова са изазваним дијабетесом мелитусом доћи до промене у броју и дистрибуцији ИЋК, а то се може сматрати морфолошком основом у патогенези дијабетесне гастроентеропатије. За проверу ове претпоставке постављени су следеће циљеве истраживања:

1. Да се испита присуство, дистрибуција и заступљеност подтипова ИЋК у различитим анатомским сегментима зида ГИТ-а пацова контролне групе.
2. Да се утврди да ли постоји разлика у дистрибуцији и заступљености ИЋК у зиду ГИТ-а пацова са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетесом мелитусом, у односу на контролну групу.
3. Да се утврди да ли постоји разлика у броју, дистрибуцији, морфологији и организацији интрамукуларних подтипова ИЋК у сфинктерима (кардија-доњи езофагеални сфинктер и пилорус) код пацова са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетесом мелитусом, у односу на контролну групу.
4. Да се утврди да ли постоји разлика у морфолошким карактеристикама и организацији подтипова ИЋК мијентеричног и субмукозног плексуса код пацова са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетесом мелитусом, у односу на контролну групу.

5. Да се утврди дистрибуција и заступљеност нервних структура, тј. нервних влакана у различитим анатомским сегментима зида ГИТ-а контролне и групе пацова са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетесом мелитусом.

6. Да се утврди да ли постоји корелација заступљености ИТК и густине нервних влакана у ГИТ-у контролне и групе пацова са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетесом мелитусом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је спроведено у Истраживачком центру за биомедицину, на Медицинском факултету, Универзитета у Нишу; на Катедри за хистологију и ембриологију Медицинског факултета, Универзитета у Нишу и лабораторији за имунохистохемију катедре за хистологију и ембриологију, у оквиру интерног истраживачког пројекта Медицинског факултета, Универзитета у Нишу број:22.

3.1. Експериментална процедура

У експерименту су коришћени *Wistar* пацови мушког пола старости 10 недеља, чија је телесна маса, на почетку експеримента, била између 230-250 грама. Животиње су смештене колективно, у пластичне кавезе, у виваријуму Истраживачког центра за биомедицину, на Медицинском факултету, Универзитета у Нишу у условима са контролисаном температуром и влажношћу ваздуха, вентилацијом и одржаваним артефицијалним 12-часовним циклусима светло/мрак. Храна и вода су биле доступне *ad libitum* за време експеримента. Експеримент је изведен уз потпуно поштовање правила из Водича за бригу о лабораторијским животињама и њиховом коришћењу објављеном од стране Националне академије наука из Вашингтона и Правилником за рад са лабораторијским животињама Медицинског факултета Универзитета у Нишу. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора Медицинског факултета Универзитета у Нишу: број 01-10204-3.

Експериментални модел: Животиње су насумично подељене у 2 експерименталне групе (n=12-16), контролна и група са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетесом мелитусом (ДМ група). Након периода привикавања у трајању од недељу дана, помоћу интраперитонеалне ињекције свеже припремљеног раствора стрептозотина (*STZ*) у цитратном пуферу (45 mg/kg; *Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany*), која је дата 15 минута након интраперитонеалне ињекције никотинамида (*NA*) (110 mg/kg; *Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany*) индукована је поремећена

толеранција глукозе код животиња из групе ДМ. Животињама из контролне групе у описаном поступку убризган је цитратни пуфер и након тога физиолошки раствор.

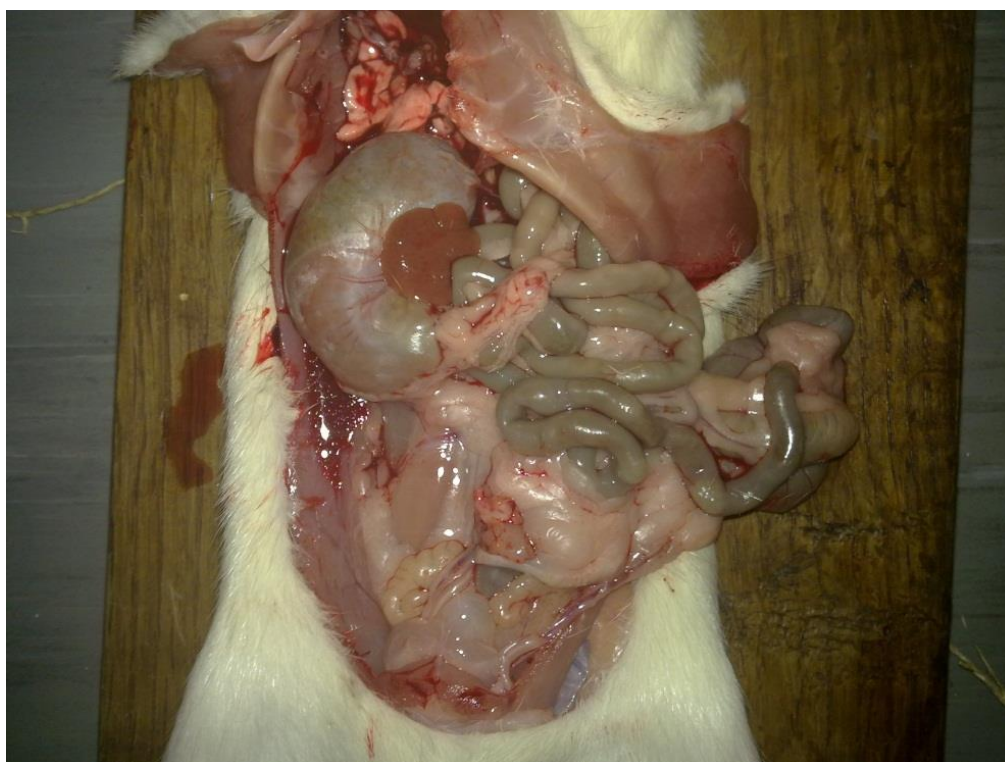
Дијагноза поремећене толеранције глукозе постављена је мерењем концентрације глукозе у венској крви. У циљу потврде постојања хипергликемије, крв је узимана из репне вене, након 2 сата гладовања, трећег и седмог дана након индуковања поремећене толеранције глукозе, помоћу аутоматизованог мерача гликемије *Accu-check Performa (Roche Diagnostics, USA)*. Животиње из ДМ групе са гликемијом између 8,3 и 12 mmol/L су успешно развиле модел поремећене толерације глукозе, док су остале одстрањене из експеримента тако да је у експеримент ушло 12 животиња по групи (n=12). Телесна маса животиња је континуирано праћена, при чему су мерења обављана једном недељно у размаку од 7 дана, као и на дан жртвовања. Животиње су мерене на ваги, након ноћног гладовања.

Након 6 недеља од почетка експеримента, животиње су жртвоване ексангвинацијом после билатералне торакотомије у дубокој анестезији (*Ketamidol, Richter pharma ag*; 100 mg/kg, ip). Крв је узета пункцијом срца (терминалном). Пре жртвовања, животињама је одређена гликемија, под истим условима као и на почетку експеримента и то након два и осам сати гладовања.

У циљу провере резултата са апарата *Accu check* за вредности глукозе 8 сати након гладовања, мерена је вредност серумске глукозе (по жртвовању). Серум и плазма су издвојени центрифугирањем (15 минута на 3000 g) и чувани на -20°C, до обављања биохемијских анализа. Na-EDTA је коришћен као антикоагуланс. Концентрација серумске глукозе одређивана је употребом методе хексокиназа/глукозо-6-фосфат дехидрогеназа на аутоматском клиничком хемијском аналјзеру (*Dimension RxL Max, Dade Behring Siemens, Marburg, Germany*), уз употребу оригиналних реагенаса (*Siemens Healthcare Diagnostics*).

3.2. Узорковање матерјала

Након жртвовања експерименталних животиња и отварања абдомена узиман је цео ГИТ у блоку, пресецањем дисталног једњака испод дијафрагме и ректума, и испиран у физиолошком раствору (слика 17.). Скалпером су затим узорковани различити анатомски сегменти ГИТ-а и испиран њихов садржај физиолошким раствором. Желудац је дистално пресецањем заједно са почетним делом дуоденума, а затим вршен уздужни пресек по великој кривини желуца. Посебно је издвајан почетни део желуца (кардија и фундус), средишњи део корпуса и пилорус са проксималним делом дуоденума. Поред узорка дуоденума узета су по три узорка јејунума и илеума, један узорак цекума и по два узорка проксималног и дисталног колона (укупно по 15 узорка ГИТ-а по експерименталној животињи). Сви узорци су посебно фиксирани у унапред припремљеним и шифрираним посудама са 10% пуферисаним формалином или буеном.



Слика 17. Узорковање ГИТ-а експерименталне животиње у блоку

3.3. Лабораторијска обрада ткивних узорака

Узорци ткива (делови органа ГИТ-а) припремани за светлосно-микроскопско испитивање након 24ч.фиксације (у 10% пуферисаном формалину и буену) су рутинском процедуром (растући низ концентрација етанола, хлороформ, парапласт) ручном обрадом доведени до парафинских калуца. Носачи парафинских блокова су унапред били припремљени и шифрирани. Помоћу микротоме од парафинских калуца прављени су пресеци дебљине 4-5 μ m.

Сви узорци су сечени у комплетној серији, при чему су узорци желуца сечени уздужно, а узорци црева уздужно и попречно. По један пресек од сваког узорка бојен је рутинском ХЕ (хематоксилин-еозин) методом ради идентификације структура и опште оријентације, а за Ц-кит имунохистохемијско испитивање коришћено је по 3 пресека направљених на различитим дубинским нивоима (размак између пресека 20 μ m, степеничаста серија).

3.4. Имунохистохемијске методе

Исечци за имунохистохемијску анализу депарафинисани су у ксилолу 20 минута, након 24ч. инкубације у термостату на температури 60°C. Рехидратација исечака вршена је у опадајућим концентрацијама раствора етанола (100% етанол 5 минута, 96% етанол 10 минута, дестилована вода 10 минута). Демаскирање антигена примењено је кувањем у воденом купатилу на 95°C у комерцијалном раствору *EnVisiontmFLEX target retrieval DM828*, (50x), каталoшки број: K8000/K8002, (*Dako, Denmark*) 30 минута, након чега су испирани комерцијалним раствором *EnVisiontmFLEX WASH BUFFER DM 831* (20x), каталoшки број: K8000/K8002, (*Dako, Denmark*). Ендогена пероксидаза блокирана је 3% раствором H₂O₂ у тајању од 10 минута. Примарна антитета су растварана у комерцијалном раствору за разблажење антитета *Antybody Diulent EnVisiontmFLEX DM830* каталoшки број: K8006, (*Dako, Denmark*). Листа коришћених антитета, произвођач, њихова разблажења и начин инкубације дати су у табели 1.

Табела 1. Коришћена антитела, њихови произвођачи, разблажења и инкубација

Примарно антитело	Произвођач/каталожки број	Разблажење примарног антитела	Инкубација
<i>C-kit (Rabbit monoclonal c-kit antibody)</i>	<i>Abcam (Cambridge, UK) Ab32363</i>	1:100	24ч. на 4 °C
<i>NF-M (Rabbit polyclonal anti Neurofilament Medium antibody)</i>	<i>Abcam (Cambridge, UK) Ab9034</i>	1:1000	24ч. на 4 °C
<i>Desmin (Monoclonal Mouse Anti-Human Clone D33)</i>	<i>Daco (Denmark) MO760</i>	1:100	1.5ч. на собној температури

Након примене секундарног антитела *EnVisiontmFLEX SM802*, каталожки број: K8000, (*Dako, Denmark*) у трајању од 45 минута на собној температури, имуни комплекси визуелизовани су помоћу система *DacoREALEnVisiontm Detection System*, каталожки број: k5007 (*Dako, Denmark*). Између наведенох корака, препарати су испитани *EnVisiontmFLEX WASH BUFFER DM 831 (20x)*, каталожки број: K8000/K8002, (*Dako, Denmark*). Као хромоген коришћен је диаминобензидин (ДАБ) и контрастирани Мајеровим хематоксилином (*Mayer*), након чега су препарати дехидратисани кроз серију етанола са растућом концентрацијом (96%, 100%), просветљивани у ксилолу и монтирани коришћењем канада балсама и покровних стакалца. Позитивна контрола за *c-kit* имуну реактивност је бојење мастоцита у органима ГИТ-а пацова, за десмин и *NF-M* апендикс фетуса човека. Резултат бојења: браон (оксидисани продукт диаминобензидина и пероксидазе)-места везивања одговарајућег антигена и за њега специфичног антитела; плаво (хематоксилин)-једра и мембране ћелија.

3.5. Хисто-морфолошка и морфометријска анализа

За микроскопску анализу и фотографисање коришћен је микроскоп *Olympus BX50* опремљен дигиталном камером *Leica DFC 295 (Leica Micro-System, Reuil-Malmaison, France)*. Са сваког препарата начињен су фортографија микроскопских видних поља, која се нису преклапала и на којима се јасно видео циркуларни и или лонгитудинални мишићни слој на увећању 200x, док је за анализу детаља или процену заступљености ћелија са препарата чији су зидови тањи, користило увећање x400. Број фотографисаних микроскопских поља за сваки узорак ГИТ-а и за савки параметар понаособ одређиван је формулом $N=(10 \times SD/X)^2$, где је SD-стандардна девијација, X-средња вредност резултата мерења одговарајућег параметра добијених са пилот испитивања на 20 видних поља тог узорка (*Kališnik M, 2002*).

За квантитативну, морфометријску анализу *C-kit* имунореактивних ћелија и *NF-M+* нервних влакана коришћен је програм *Image-J*, верзија 1.46r (*National Institute of Health, USA*).

Процена густине/заступљености ИТК свих типова укупно и ИТК-ИМц и ИТК-ИМл по mm^2 одређивано је израчунавањем нумеричке ареалне густине (N_A) по формули $N_A=(100000 \times N)/P$, где је N број избројених ИТК ћелија у мишићном слоју, а P је површина мишићног слоја (или површина само циркуларног мишићног подслоја за N_A ИТК-ИМц). За бројање ћелија коришћен је датумак *ImageJ* програму намењен бројању ћелија (*cell-counter plug in*), док је за израчунавање површине коришћена опција „*area*“ након калибрације одговарајућег микроскопског увећања. Ћелије су бројане ручно, како би се са сигурнишћу искључили мастоцити, који су такође *c-kit* имунореактивне ћелије, али се од ИТК јасно разликују, по величини, облику, недостатку продужетака и локализацији.

Мрежа ИТК-МП које окружују мијентерични плексус процењује се по препорукама Интернационалне радне групе за гастроинтестиналне неуромускулаторне болести семиквантитативном методом по Брарер-Имкеру (*den Braber-Ymker et al., 2016*), тако што се израчунава проценат окружености ганглиона МП. Процент циркуференце ганглиона МП (попречно, уздужно или трансверзално пресечених) који је окружен *c-kit* имунореактивним ћелијама рангира се од 0 до 100%, тако да степен од 0 процента представља одсуство ц-кит позитивних ћелија око ганглиона МП, док степен од 100% представља *C-kit+* ИТК-МП које у потпуности својим телом и наставцима окружују МП.

За одређивање густине нервних влакана израчунавана је волуменска густина NF-M позитивних влакана у мишићном слоју изражено у процентима. Волуменска густина нервних влакана израчунавана је помоћу додатка за програм *ImageJ*, где се опцијом „*threshold*“ у обележеном пољу издваја и мере само NF-M позитивне структуре, изузимајући ганглионе, и вредности приказују у процентима површине мишићног слоја.

Сви резултати мерења су бележени у одговарајуће, унапред припремљене *excel* табеле.

3.6. Статистичка анализа

У обради података коришћена је стандардна дескриптивна и аналитичка статистичка методологија. Сва атрибутивна обележја посматрања описана су апсолутним и релативним бројевима. За опис нумеричких облика посматрања користили смо мере средње вредности и стандардну девијацију. Дескриптивном статистичком анализом приказани су следећи статистички параметри: аритметичка средина, стандардна девијација, распон минималне (*min*) и максималне вредност (*max*), апсолутна фреквенција (*N*) и индекс структуре (%).

Аналитичком статистичком методологијом измерена је статистичка значајност међусобних разлика просечних вредности одређених обележја код свих испитаника и раздвојено на групе. У зависности од природе расподеле нумеричких обележја посматрања на основу испитивања нормалности дистрибуције, извршени су избори тестова за нумеричка обележја посматрања. Коришћени су параметријски или непараметријски тестови (ако је коефицијент варијације (*CV*) >30%).

Поређење средњих вредности нумеричких обележја између две независне групе испитаника вршено је Студент-овим т-тестом или *Mann-Whitney U*-тестом. Поређење вредности нумеричких обележја између три и више група испитаника вршено је анализом варијансе (*ANOVA* са *Dunnet post hoc*-тестом) или непараметријским *Kruskall-Walis* тестом са *MW* као *post hoc* тестом)

За мерење повезаности одређених обележја урађена је корелациона анализа. У корелационој анализи коришћен је *Spearman*-ов коефицијент корелације пошто расподела није нормална.

Статистичка анализа је урађена коришћењем *Excel* програм из *Microsoft Office* програмског пакета и *SPSS* програма у верзији 18.0. Као праг статистичке значајности коришћен је ниво грешке процене мањи од 5% ($p < 0,05$). Резултати статистичке анализе приказани су табеларно и графички.

3.7. Софтверски програми коришћени за обраду података

Програм *Microsoft Word* 2010 коришћен је за обраду текста. За чување референци, њихово сортирање и цитирање коришћен је (*reference manager*) програм *EndNote* 6. Подаци добијени у току истраживања су уношени у табеле припремљене у програму *Microsoft Excel* из *Microsoft Office* програмског пакета 2010. За статистичку анализу коришћен је програм *SPSS* 18.0.

За стандардну обраду слике употребљаван је програм *Photo Scape* , док је за потребе специфичне обраде појединих слика коришћен програм *Adobe Photoshop* 8. За одређивање нумеричке ареалне густине ИТК и волуменске густине нервних структура коришћен је програм *ImageJ*.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Вредности гликемије и телесне масе експерименталних група

Вредности гликемије два сата након храњена ДМ групе (11.18 ± 0.73 mmol/L) значајно су веће ($p < 0,001$) у односу на контролну групу (6.58 ± 0.61 mmol/L). Појединачне вредности гликемије два и осам сати након храњења, на крају експеримента, приказане су у табели 2.

Табела 2. Вредности гликемије 2 и 8 сати након храњења контролне и ДМ групе пацова, изражено у mmol/L.

Контролан група $n=12$		ДМ група $n=12$	
након 2ч./mmol/L	након 8ч. /mmol/L	након 2ч. /mmol/L	након 8ч. /mmol/L
7	4,7	10,5	7
7,3	4,5	11,4	6,3
5,6	5	11,9	6,5
6	4,9	10,4	6,7
6	5	10,2	6,3
7,3	4,8	11,2	6,8
6,5	4,5	10,5	5,9
7	5	10,4	6,6
6,5	4,6	12	7
6,8	4,8	11,8	7
7,2	4,7	12	6,5
5,8	4,5	11,9	6,9

n - број експерименталних животиња

У ДМ групи пацова нема сигнификантне разлике у телесној маси ($p > 0,05$) у односу на контролну групу, ипак код пацова ДМ групе примећена је умерена полидипсија и полифагија. Телесне масе на почетку и крају експерименталне процедуре приказане су у табели 3. У табели 4. приказана је статистичка анализа вредности гликемија и масе експерименталних животиња на крају експеримента.

Табела 3. Телесна маса експерименталних животиња на почетку (маса I) и крају (маса II) експерименталне процедуре, изражено у грамима.

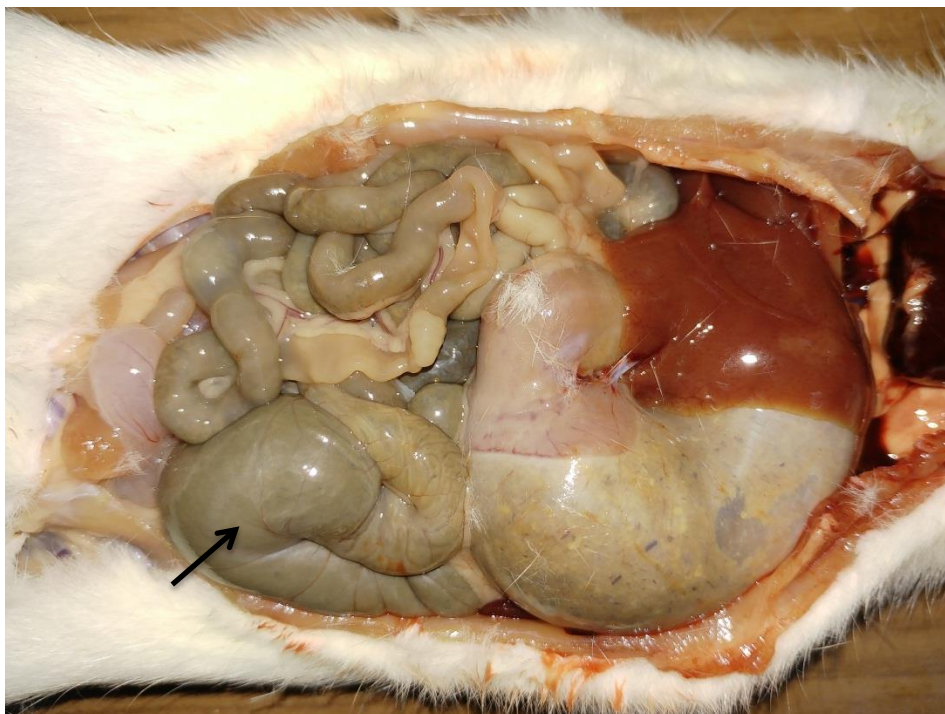
Контролна група		ДМ група	
маса I	маса II	маса I	маса II
g			
230	400	230	410
220	400	240	410
240	380	240	400
220	410	240	410
230	410	240	400
240	400	240	410
230	400	250	460
240	400	240	410
230	380	230	380
240	380	220	400
240	410	230	380
230	400	230	410

Табела 4. Просечне вредности гликемије 2 и 8 сати након оброка, и телесне масе на крају експеримента

параметар	група	<i>N</i>	<i>X</i>	<i>S.D</i>	<i>CV</i>	t-тест
гли. 2ч mmol/L	контрола	12	6.58	0.61	9.25	t=16.718
	ДМ	12	11.18	0.73	6.56	p=0.000
гли. 8ч mmol/L	контрола	12	4.75	0.20	4.16	t=16.366
	ДМ	12	6.63	0.34	5.19	p=0.000
маса II g	контрола	12	397.50	11.38	2.86	t=1.372
	ДМ	12	406.67	20.15	4.96	p=0.184

N-број експ. животиња, *X*-средња вредност, *SD*-стандардна девијација, *CV*-корелација варијације

Код три експерименталне животиње из ДМ групе макроскопском анализом примећена је дистензија колона средњег степена (слика 18.).

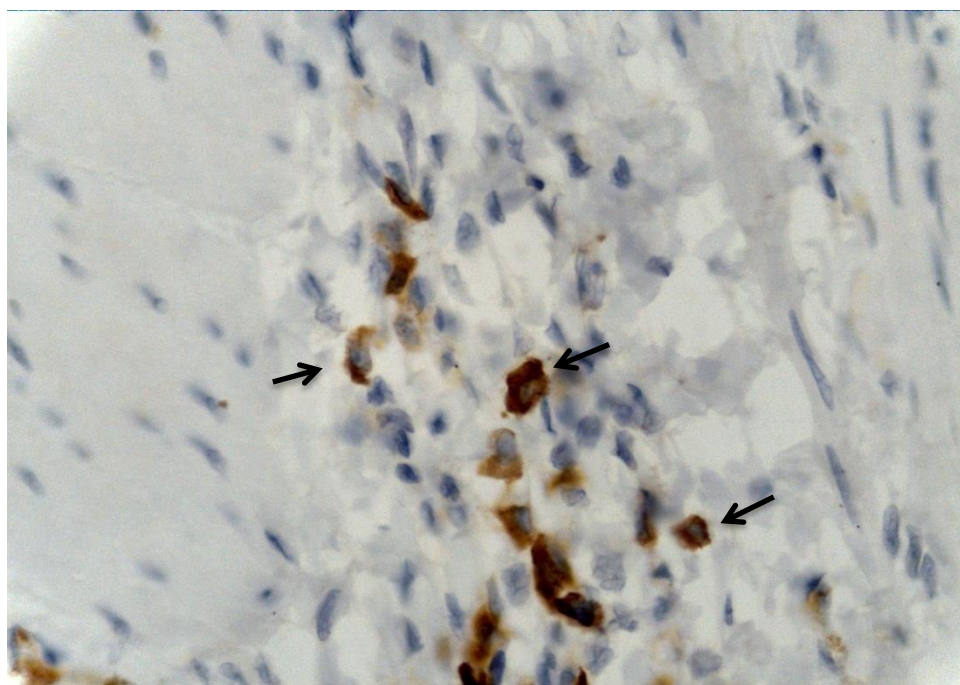


Слика 18. Макроскопска анлаза ГИТ-а пацова ДМ групе. Дистензија колона средњег степена (стрелица).

4.2. Хистолошка и морфометријска анализа

4.2.1. Присуство и дистрибуција подтипова интерстицијалних ћелија Кахала у различитим анатомским сегментима зида гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе

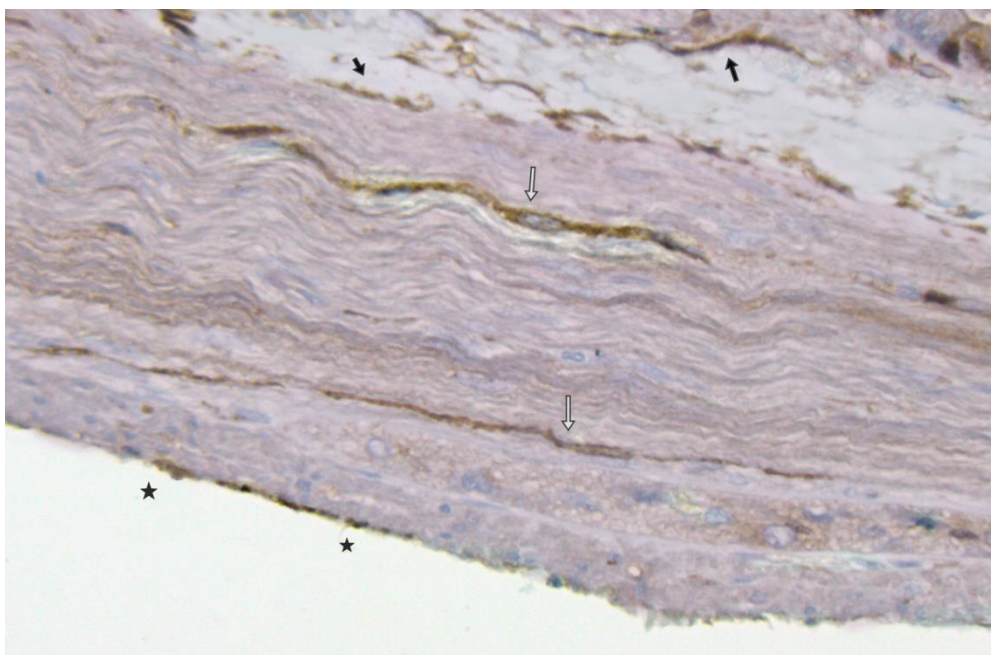
На хистолошким пресецима органа ГИТ-а уочавају се четири слоја, идући од лумена ка површини: мукоза, субмукоза, мишићни слој који се састоји од циркуларног и лонгитудиналног подслоја и сероза. На имунохистохемијским препаратима бојеним *C-kit*-ом, уочавају се два типа *C-kit* имунореактивних ћелија. Први тип представљају ИТК, које су издужене, танке вретенасте или звездасте мултиполарне ћелије, са најмање два цитоплазматска продужетка. Други тип *C-kit*-имунореактивних ћелија су мастоцити, овалне ћелије са великим округлим једром без цитоплазматских наставка, које се налазе у свим слојевима зида ГИТ-а (слика 19.).



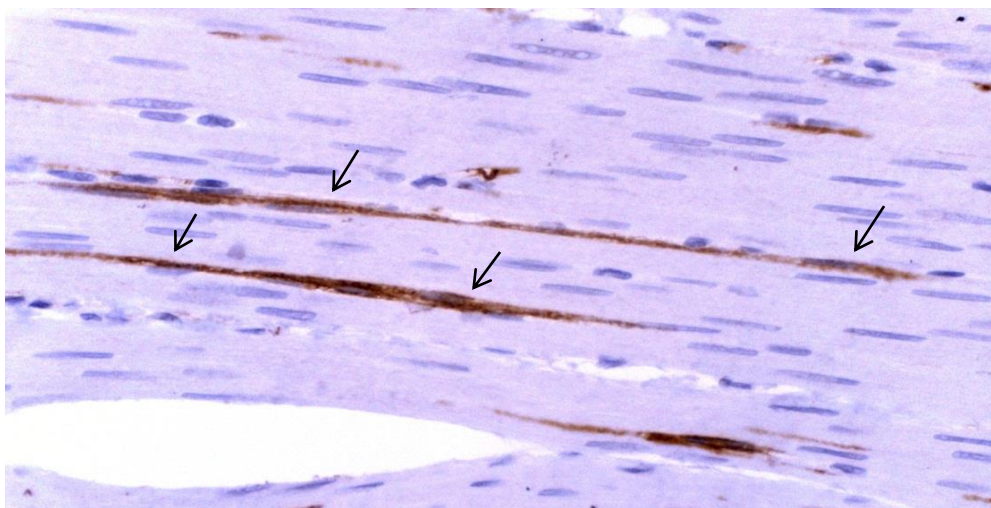
Слика 19. *C-kit* имунореактивни мастоцити (стрелице) у субмукози желуца контролне групе (*c-kit* имунохистохемија x400).

На попречним и уздужним пресецима са свих анатомских локализација ГИТ-а контролне групе, *C-kit* имунореактивне ћелије, које одговарају ИТК, биле су присутне у циркуларном и лонгитудиналном мишићном слоју, у пределу мијентеричног плексуса, а на субмукозној граници према мишићном слоју само у цекуму и колону. Унутар *laminae muscularis mucosae* нису нађене ИТК, а неке ИТК субмукозног плексуса леже у непосредној близини мукозе. Такође спорадично су биле присутне ИТК на спољној граници субсерозе.

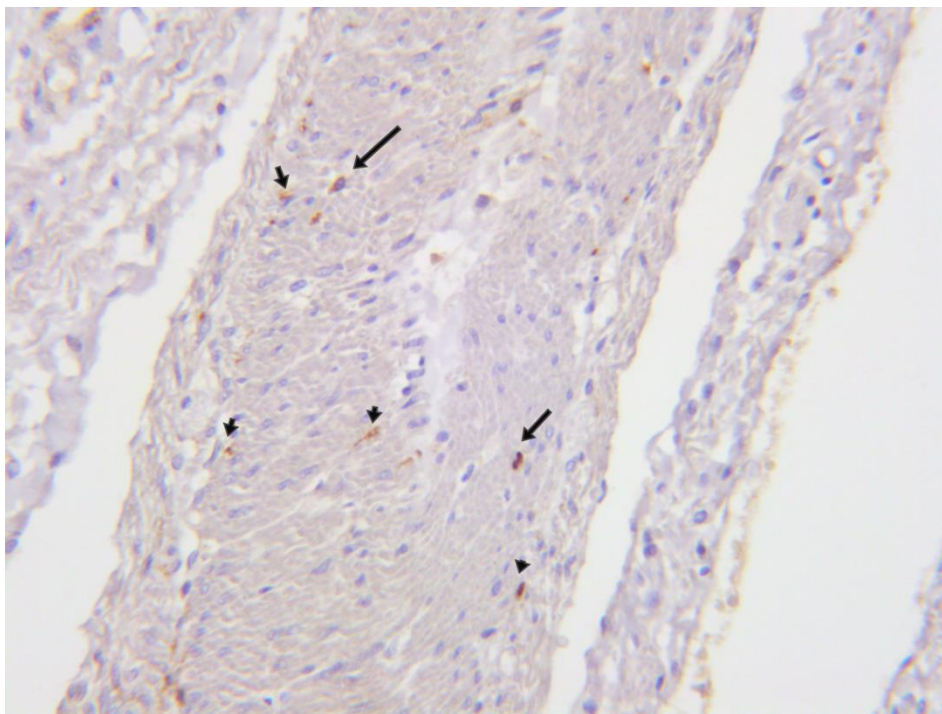
Интерстицијалне ћелије Кахала у циркуларном мишићном слоју, на попречним пресецима, пружале су се између глатко-мишићних ћелија, паралелно њиховој осовини. Ове ћелије су издуженог вретенастог облика, са два дуга цитоплазматска наставка који полазе са супротних крајева тела ћелије (слика 20.). На већини цитоплазматских наставка *C-kit* имунореактивних ћелија циркуларног слоја могло се уочити и њихово гранање, а неки од наставка били су повезани са одговарајућим наставцима суседних ћелија. Ове ћелије су углавном биле појединачне, расуте кроз целу дебљину кружног мишићног слоја, док је у пределу кардије, пилоруса и циркуларног слоја цекума и колона уочено њихово линеарно умрежавање (слика 21.). На основу своје локације и облика ове ћелије одговарају ИТК-ИМЦ. На уздужним пресецима узорака ГИТ-а ИТК-ИМЦ, које су оријентисане паралелно глатко-мишићним ћелијама кружног мишићног слоја, уочавају се као кружни попречни пресек тела *C-kit* имунореактивне ћелије, или тачкасти пресеци њихових цитоплазматских наставка (слика 22.).



Слика 20. *C-kit* имунореактивне ћелије у уздужном пресеку мишићног слоја проксималног колона контролне групе: виде се две издужене биполарне ИЋК-ИМЦ (беле стрелице), ИЋК-СМП (црне стрелице), сателитске ИЋК-СС (звездица). *C-kit* имунохистохемија x400.

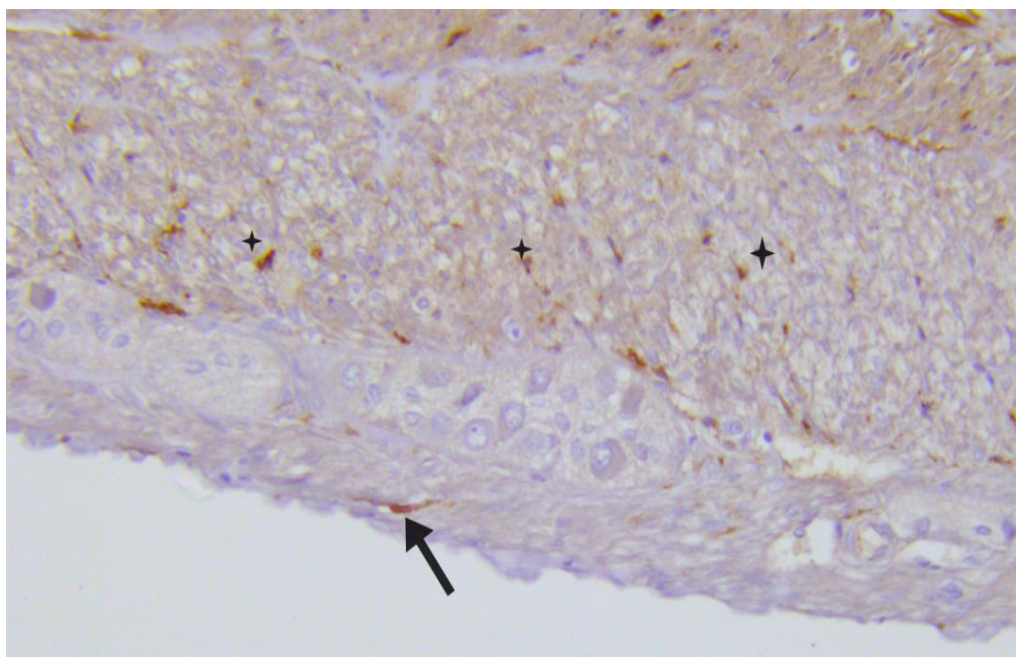


Слика 21. *C-kit* имунореактивне ћелије у мишићном слоју кардије контролне групе, ИЋК-ИМЦ (стрелица) формирају два линеарна низа умрежених ћелија. *C-kit* имунохистохемија x400.



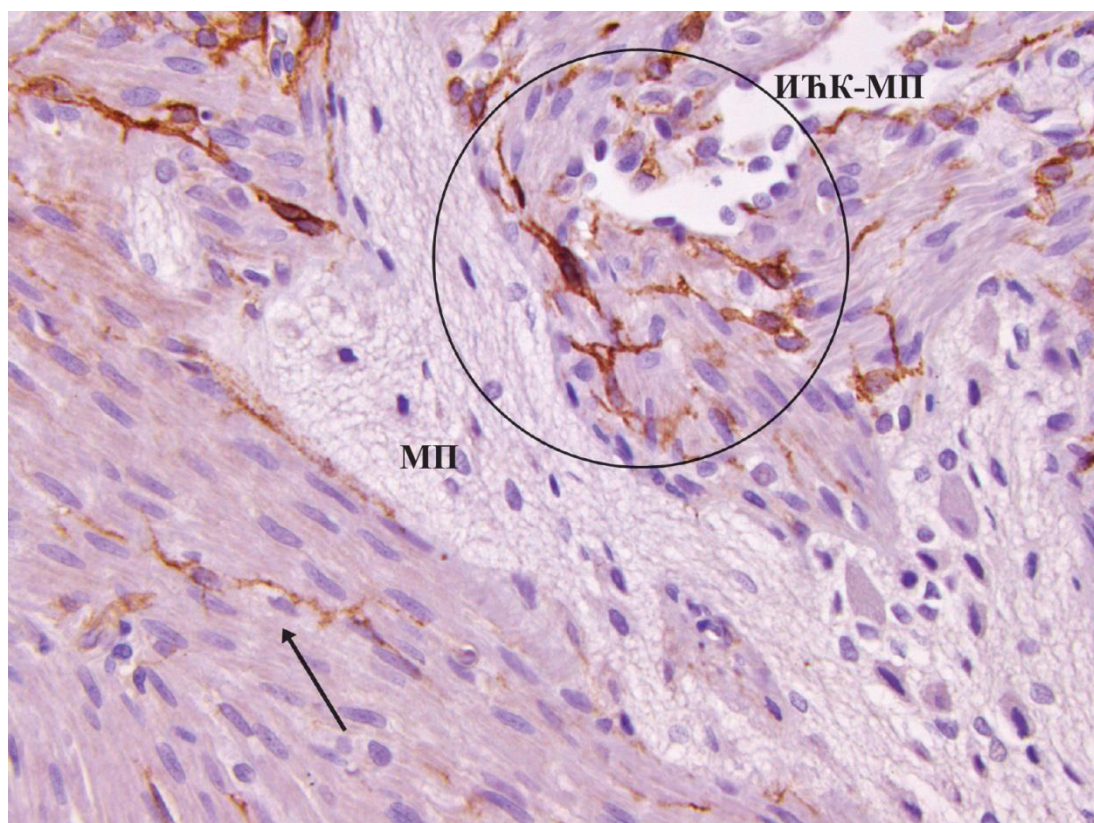
Слика 22. *C-kit* имунореактивне ћелије у мишићном зиду јејунума контролне групе животиња (попречни пресек): тела ИТК-ИМ (стрелица), попречни пресеци цитоплазматских наставка (врх стрелице). *C-kit* имунохистохемија x200.

У уздужном мишићном слоју, *C-kit* имунореактивне ћелије су такође биле присутне. Оне су вретенастог издуженог тела, са по два цитоплазматска наставка који полазе са супротних крајева ћелије, оријентисане паралелно уздужној осовини глатко-мишићних ћелија. На уздужним пресецима мишићног слоја ГИТ-а нису уочена секундарна гранања цитоплазматских наставка ових ћелија, нити су њихови наставци били у контакту са суседним ћелијама. Ове ћелије су појединачне и ретко расуте кроз лонгитудинални мишићни слој, а по својој локацији и морфологији одговарају ИТК-ИМЛ (слика 23.). Такође на попречним пресецима, лонгитудиналног мишићног слоја, ИТК-ИМЛ се уочавају као кружни, попречни пресек тела ћелије, или тачкасти попречни пресеци њихових наставка.



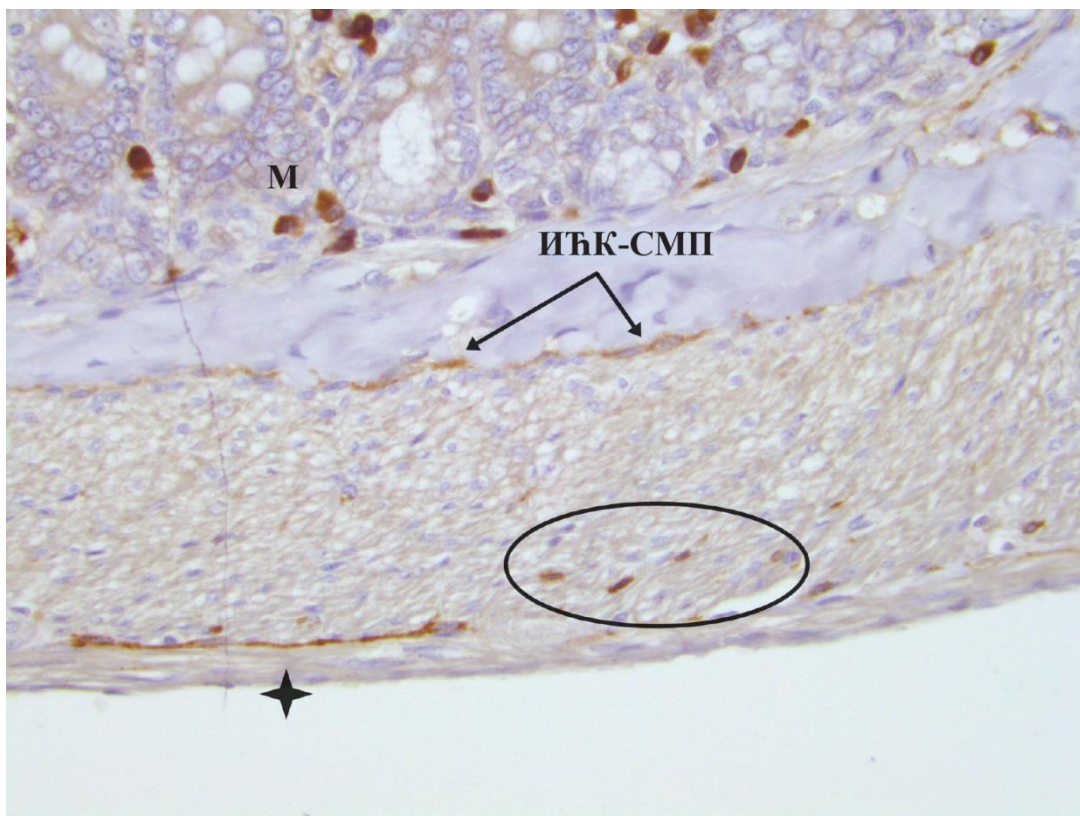
Слика 23. *C-kit* имунореактивне ћелије у мишићном зиду проксималног колона контролне групе: ИТК-ИМЛ (стрелица), попречни пресеци цитоплазматских наставака (звезда) ИТК-ИМЦ, *c-kit* имунохистохемија x200.

У пределу мијентеричног плексуса, уочавају се звездасте, мултиполарне *C-kit* имунореактивне ћелије, чији се дугачки наставци међусобно повезују тако да својим наставцима углавном у потпуности окружују ивице ганглиона мијентеричног плексуса. Ни тела ни цитоплазматски наставци ових ћелија не залазе унутар ганглија (слика 24.). Ове ћелије по својој морфологији и локацији одговарају ИТК-МП.



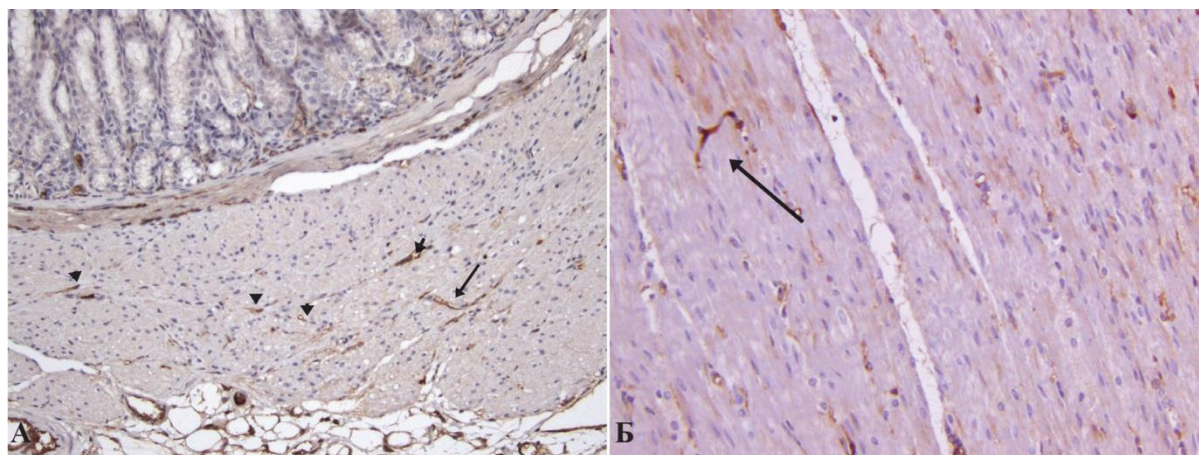
Слика 24. *C-kit* имунореактивне ћелије мишићног слоја пилоруса контролне групе: мултиполарне ИЋК-МП (круг) које формирају мрежу око ганглиона мијентеричног плексуса (МП), ИЋК-ИМ (стрелица) чији се наставци секундарно гранају. *C-kit* имунохистохемија x400.

У субмукози узорака из колона и цекума, на споју са унутрашњом површином кружног мишићног слоја, уочавају се *C-kit* имунореактивне ћелије, звездастог облика са два до три краћа цитоплазматска наставка, које су у овим пределима углавном груписане у линеарне низове од 3 до 5 ћелија, а ређе појединачне (слика 25.). Ове ћелије одговарају по својој морфологији и локацији ИЋК-СМП.



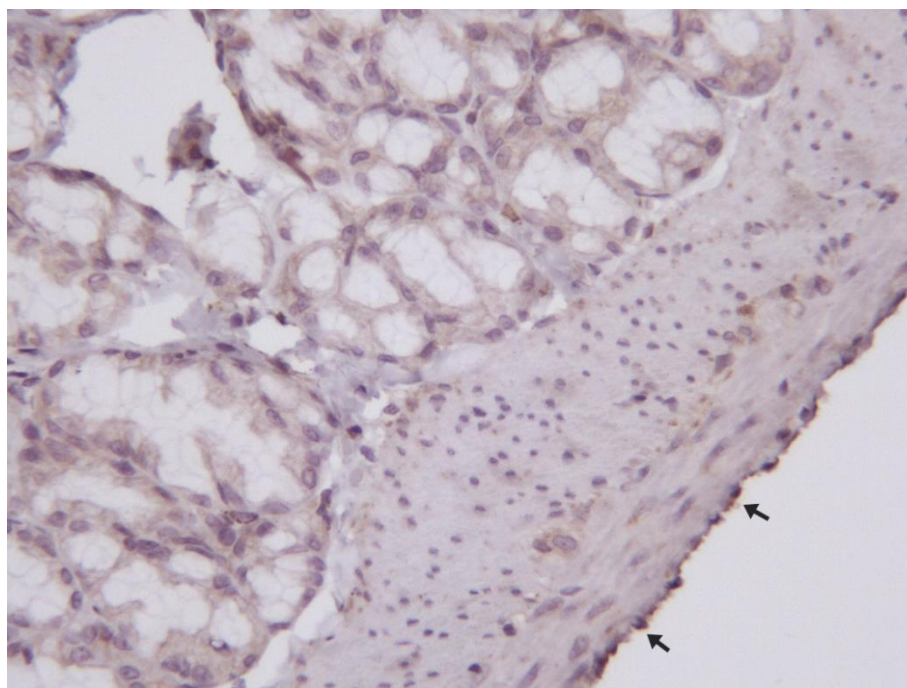
Слика 25. *C-kit* имунореактивне ћелије мишићног слоја дисталног колона контролне групе: издужене ИЋК-СМП (стрелице) са два до три цитоплазматска наставка у линеарном низу на субмукозној граници, попречни пресеци ИЋК-ИМЦ (круг); две издужене ИЋК спојене у линеаран низ на споју циркуларног и лонгитудиналног мишићног подслоја (звезда); у мукози између жлезди присутни су мастоцити (М). *C-kit* имунохистохемија x200.

Појединачне *C-kit* имунореактивне ћелије уочене су дуж мишићних септи, оријентисане перпендикуларно у односу на уздужну осовину глатко-мишићних ћелија. Ове ћелије су издуженог облика и са нешто краћим наставцима, не умрежавају се међусобно (слика 26.) и одговарају ИЋК-СЕМ.



Слика 26: *C-kit* имунореактивне ћелије мишићног слоја дисталног дела корпуса желуца контролне групе, издужене ИЋК-СЕП (стрелице) налазе се перпендикуларно у односу на правац уздужне осе глаткомишићних ћелија, ИЋК-ИМЦ (врх стрелица). *C-kit* имунохистохемија: А x 200, Б x 400.

На серозној граници, ретко расуте дуж целог ГИТ-а, уочене су појединачне, издужене *C-kit* имунореактивне ћелије које одговарају сателитским ИЋК-СС (слика 27.).



Слика 27. *C-kit* имунореактивне ћелије на субсерозној граници: ИЋК-СС (стрелица). *c-kit* имунохистохемија x400.

Тестирањем просечних вредности волуменске густине $NF+$ нервних структура уочено је да нема статистички значајне разлике у дистрибуцији нервних структура између желуца, танког и дебелог црева контролне групе ($F=0,004$ $p>0,05$ *n.s.*). Просечне вредности нумеричке ареалне густине укупних ИТК подтипова (N_A -ИТК= $117,92\pm 33,65$), нумеричке ареалне густине интрамукуларних подтипова ИТК (N_A -ИТК-ИМЦ= $92,92\pm 30,94$ и N_A -ИТК-ИМЛ= $11,64\pm 5,39$) и степена окружености ганглиона (%МП) значајно су мање код танког црева, док су просечне вредности N_A -ИТК, N_A -ИТК-ИМЦ и N_A -ИТК-ИМЛ и код желуца и дебелог црева сличне (N_A -ИТК- $KWChi=280,960$, $p<0,0001$; N_A -ИТК-ИМЦ- $KWChi=394,681$, $p<0,0001$; N_A -ИТК-ИМЛ- $KWChi=132,447$, $p<0,0001$). Просечне вредности процењеног степена окружености ганглиона мијентеричног плексуса (%МП) значајно су веће у дебелом цреву, за разлику од желуца и танког црева ($KW Chi=138,656$ $p<0,0001$) (табела 5).

Заступљеност укупног броја ИТК у појединачним сегментима ГИТ-а пацова контролне групе приказани у табели 6. Дистрибуција ИТК-ИМ циркуларног и уздужног мишићном слоја у свим анатомских локација ГИТ-а контролне групе приказана је на табели 7. Уочена је статистички значајно већа нумеричка ареална густина ИТК-ИМЦ у поређењу са ИТК-ИМЛ код свих узорака ГИТ-а ($p<0,0001$).

Унутар желуца просечне вредности нумеричке ареалне густине интрамукуларног ИТК подтипа, N_A -ИТК-ИМЦ, као и N_A -ИТК, N_A -ИТК-ИМЛ значајно су веће у кардији, док њихов број опада према пилорусу (N_A ИТК $KW Chi=152,110$, $p<0,0001$; N_A ИТК-ИМЦ $KW Chi=164,913$, $p<0,0001$, N_A ИТК-ИМЛ: $KW Chi=90,70$, $p<0,0001$) (табела 7.). Степен окружености ганглиона МП ћелијама ИТК-МП сличан је у корпусу и пилорусу, док су ИТК-МП у кардији потпуно одсутне ($KW Chi=1,463$ $p>0,05$ *n.s.*) (Табела 8).

У танком цреву просечне вредности ареалне нумеричке густине ИТК и ИТК-ИМ статистички су значајно мање у илеуму, у односу на дуоденум и јејунум код којих је густина ИТК и ИТК-ИМ слична (N_A ИТК: $KW Chi=26,736$ $p<0,0001$; N_A ИТК-ИМ: $KW Chi=37,985$ $p<0,0001$) (табела 7.). Процена степена окружености ганглиона ИТК-МП показала је да нема разлике унутар различитих локација танког црева (%МП: $KW Chi=2,312$, $p>0,05$ *n.s.*) (табела 8.).

Табела 5. Просечне вредности волуменске густине NF , нумеричке ареалне густине ИЋК, нумеричке ареалне густине интрамукуларних подтипова ИЋК и степен окружености ганглиона ГИТ-а контролне групе пацова.

параметар	региони ГИТ-а	N	X	SD	CV	Min	Max	$ANOVA/Kruskal Wallis$
$V_V NF$	желудац	36	4.14	1.13	27.41	1.872	5.705	$F=0.004$ $p=0.996$
	танко ц.	60	4.15	1.04	25.02	1.998	5.705	
	дебело ц.	60	4.14	1.04	25.19	1.934	5.872	
$N_A ИЋК$	желудац	314	185.94	72.75	39.13	22.422	361.744	$Chi-s=280.960$ $p=0.000$
	танко ц.	309	117.92	33.65	28.53	46.022	301.576	
	дебело ц.	307	191.68	55.40	28.90	22.422	349.234	
$N_A ИЋК-ИМЦ$	желудац	314	167.76	64.82	38.64	42.997	369.959	$Chi-s=394.581$ $p=0.000$
	танко ц.	309	92.92	30.94	33.29	27.309	204.231	
	дебело ц.	307	182.74	46.87	25.65	83.354	369.986	
$N_A ИЋК-ИМЛ$	желудац	314	19.89	11.49	57.78	.000	69.423	$Chi-s=132.447$ $p=0.000$
	танко ц.	309	11.64	5.39	46.33	1.117	32.461	
	дебело ц.	307	18.59	10.32	55.48	.000	69.423	
%МП	желудац	205	55.41	19.24	34.72	10	100	$Chi-s=138.656$ $p=0.000$
	танко ц.	319	51.79	15.97	30.83	10	100	
	дебело ц.	308	69.77	19.96	28.61	10	100	

N -број обрађених видних поља, X -средња вредност, SD -стандардна девијација, CV -коэффициент варијације, $V_V NF$ -волуменска густина нервних влакана, N_A -нумеричка ареална густина, %МП-степен окружености ганглиона мијентеричког плексуса, статистички значајна разлика (црвено).

Тестирање просечних вредности мерених параметара густине ИЋК цекума, проксималног и дисталног колона показало је да су просечне вредности статистички значајно мање у цекуму, док су код проксималног и дисталног дела колона подједнаке ($N_{AIЋК}$: $KW Chi=50,167$, $p<0,0001$; $N_{AIЋК-ИМЦ}$: $KW Chi=53,777$, $p<0,0001$; $N_{AIЋК-ИМЛ}$: $KW Chi=80,027$, $p<0,0001$) (табела 7.). Такође, степен окружености ганглиона ћелијама ИЋК-МП значајно је мањи у цекуму, док је дистрибуција ИЋК-МП у оба дела колона подједнака ($KW Chi=51,849$ $p<0,0001$) (табела 8.).

Тестирање просечних вредности нумеричке ареалне густине ИТК свих узорака дуж ГИТ-а контролне групе показало је да се број ИТК значајно смањује у танком цреву, (од пилоруса до илеума) у односу на желудац и дебело црево, и то на рачун смањења густине интрамукуларног подтипа ИТК ($N_{\text{ИТК}} KW : Chi=489,709$ $p<0,0001$; $N_{\text{ИТК-ИМЦ}} : KW Chi=607,185$ $p<0,0001$). Такође, густина интрамукуларног типа ИТК у уздужном подслоју значајно је мања у средишњем делу ГИТ-а (од пилоруса до цекума) у односу на делове ГИТ-а изнад пилоруса и испод цекума ($N_{\text{ИТК-ИМЛ}} KW Chi=327,563$, $p<0,0001$). Степен окружености ганглиона значајно је већи у проксималном и дисталном колуону у односу на остале делове ГИТ-а ($\%MP-ИТК MP KW Chi=193,582$, $p<0,000$).

Микрографије дистрибуције ИТК различитих анатомских локација контролне групе приказане су на сликама 28-30.

Табела 6. Нумеричке ареалне густине (N_A ИТК) укупних ИТК свих узоркованих анатомских локализација ГИТ-а контролне групе.

региони ГИТ-а	N	X	SD	CV	Min	Max	$Kruskal Wallis$
		N_A ИТК					
кардија	106	193.46	62.56	32.34	22.422	323.974	$Chi-s=152,110$ $p=0,000$
корпус	106	241.15	55.73	23.11	92.559	361.744	
пилорус	102	120.75	39.45	32.67	53.055	243.643	
дуоденум	105	125.28	28.58	22.81	46.022	172.577	$Chi-s=26,736$ $p=0,000$
јејунум	102	120.72	40.03	33.16	53.055	301.576	
илеум	102	107.54	28.91	26.88	53.055	212.219	
цекум	105	166.36	37.98	22.83	112.448	317.633	$Chi-s=50,167$ $p=0,000$
колон <i>prox</i>	96	217.42	50.98	23.45	117.592	349.234	
колон <i>dist</i>	106	193.46	62.56	32.34	22.422	323.974	

N -број анализираних видних поља, X -средња вредност, SD -стандардна девијација, CV -коэффициент варијације, $Chi-s-Chi-square$, статистички значајна разлика (црвено).

Табела 7. Нумеричке ареалне густине (N_A) интрамукуларних ИТК свих узоркованих анатомских локализација ГИТ-а контролне групе.

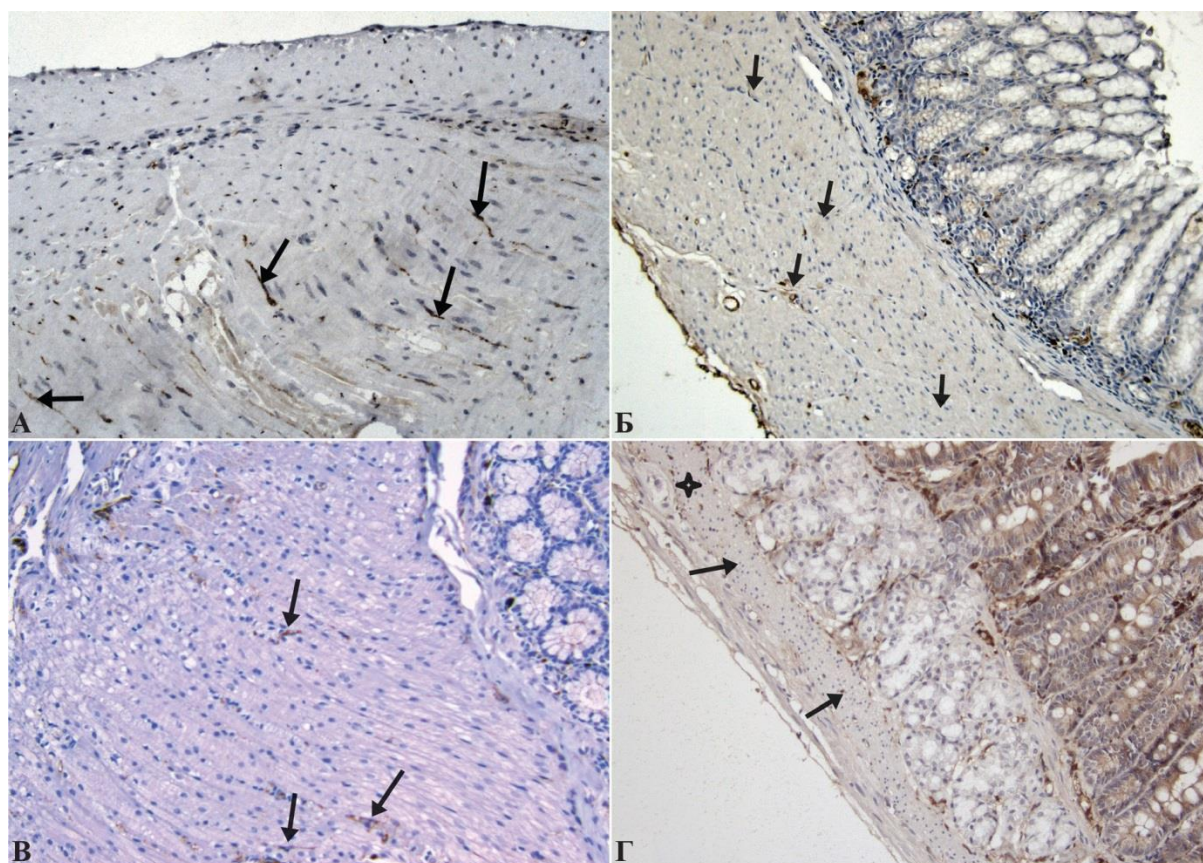
параметар	регија ГИТ-а	N	X	SD	CV	Min	Max	Kruskal Wallis
N_A ИТК-ИМЦ	кардија	106	198.45	46.25	23.31	83.354	336.109	<i>Chi-s=164,913</i> <i>p=0,000</i>
	корпус	106	201.99	55.24	27.35	83.354	369.959	
	пилорус	102	100.31	28.52	28.43	42.997	198.862	
	дуоденум	105	106.37	33.82	31.80	49.683	198.347	<i>Chi-s=37,985</i> <i>p=0,000</i>
	јејунум	102	91.21	30.59	33.54	33.144	204.231	
	илеум	102	80.79	21.57	26.70	27.309	141.766	
	цекум	105	160.18	32.83	20.50	115.17	270.687	<i>Chi-s=53,777</i> <i>p=0,000</i>
	колон <i>prox</i>	96	190.09	51.38	27.03	119.31	369.986	
	колон <i>dist</i>	106	198.45	46.25	23.31	83.354	336.109	
	N_A ИТК-ИМЛ	кардија	106	23.11	12.21	52.80	.000	69.423
корпус		106	24.34	10.78	44.28	.000	56.655	
пилорус		102	11.91	6.14	51.52	1.171	32.461	
дуоденум		105	10.16	4.50	44.29	3.068	27.462	<i>Chi-s=35,864</i> <i>p=0,000</i>
јејунум		102	14.13	4.88	34.50	1.244	23.420	
илеум		102	10.66	5.88	55.10	1.117	32.461	
цекум		105	12.46	5.29	42.45	4.274	26.452	<i>Chi-s=80,027</i> <i>p=0,000</i>
колон <i>prox</i>		96	20.30	8.96	44.10	6.245	56.208	
колон <i>dist</i>		106	23.11	12.21	52.80	.000	69.423	

N -број анализираних видних поља, X -средња вредност, SD -стандардна девијација, CV -кофицијент варијације, $Chi-s$ - *Chi-square*, статистички значајна разлика (црвено).

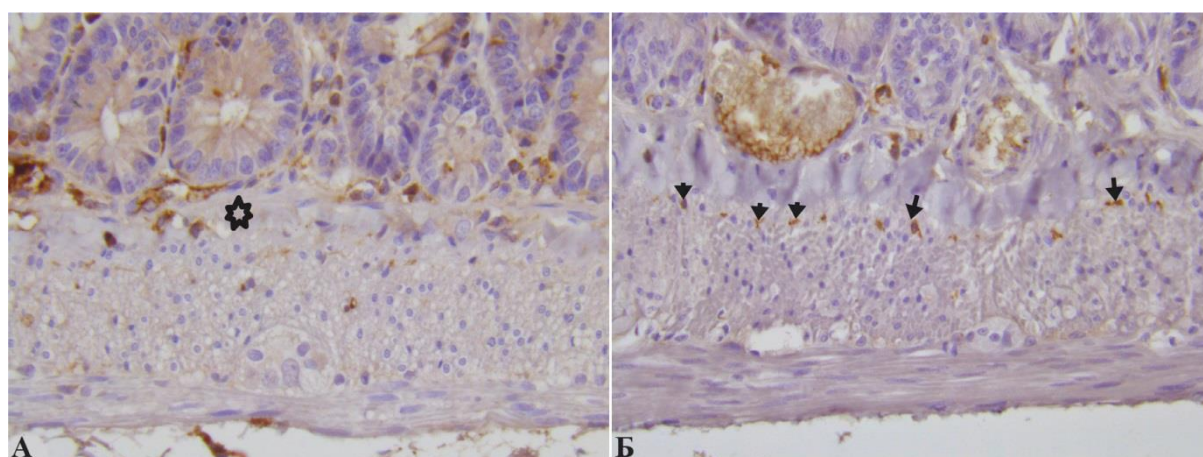
Табела 8. Степена окружености ганглиона (%МП) у различитим анатомским локализацијама ГИТ-а контролне групе.

регија ГИТ-а	N	X	SD	CV	Min	Max	Kruskal Wallis
кардија	0	Chi-s=1,463 p=0,226
корпус	98	56.53	21.50	38.03	10	90	
пилорус	107	54.39	16.95	31.15	30	100	
дуоденум	109	52.11	16.89	32.41	10	90	Chi-s=2,312 p=0,315
јејунум	103	49.81	13.93	27.97	20	90	
илеум	107	53.36	16.76	31.42	30	100	
цекум	109	60.00	21.99	36.64	10	100	Chi-s=51,849 p=0,000
колон <i>prox.</i>	101	80.20	13.71	17.09	50	100	
колон <i>dist.</i>	98	69.90	17.56	25.12	30	100	

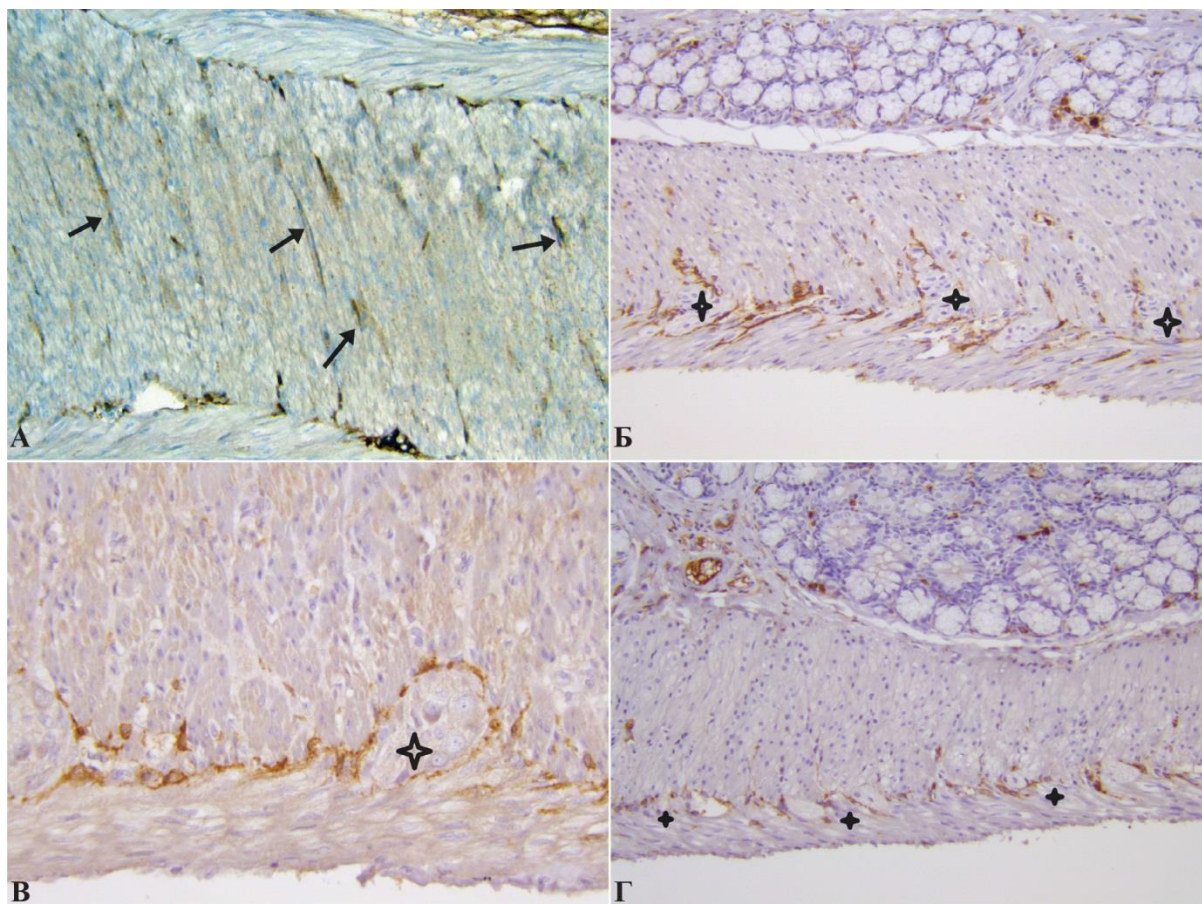
N-број анализираних ганглиона, X-средња вредност, SD-стандардна девијација, CV-коэффициент варијације, Chi-s-Chi-square, статистички значајна разлика (црвено).



Слика 28. *C-kit* имунореактивне ћелије А-кардије, Б-корпуса желуца, В-пилоруса, Г-дуоденума контролне групе: ИћК-ИМ (стрелице) су присутне у великом броју у свим деловима желуца А-В; ИћК-МП (звездича) окружују ганглионе МП у дуоденуму (Г). *C-kit* имунохистохемија А,В-х 400; Б,Г- х200.



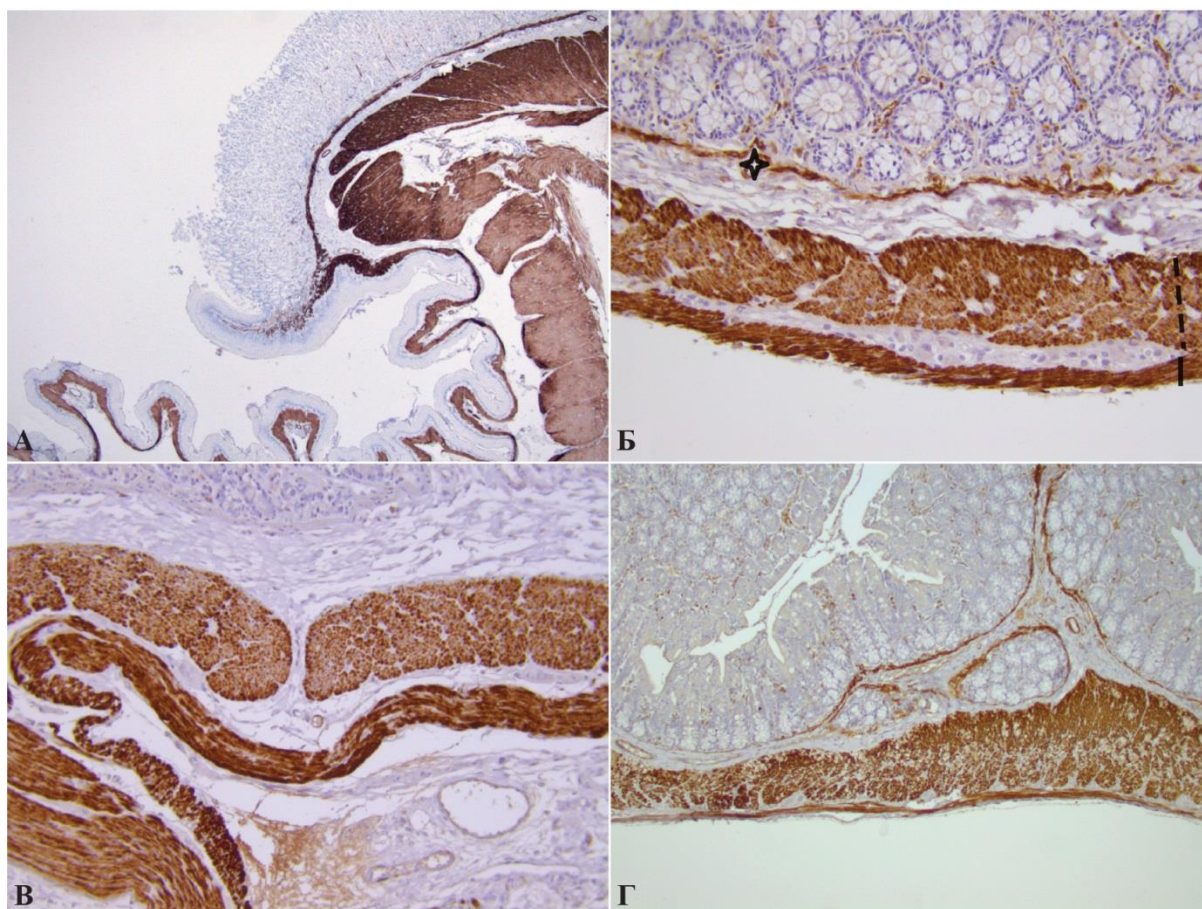
Слика 29. *C-kit* имунореактивне ћелије јејунума (А) и илеума (Б) контролне групе. ИћК-СМП (стрелице) присутне у низу на граници субмукозе и мишићног слоја; интрамукуларне ИћК-ИМ (звездича). А,Б х 400.



Слика 30. *C-kit* имунореактивне ћелије цекума (А), проксималног колона (Б, В), и дисталног колона (Г) контролне групе: ИЋК-ИМ (стрелице) присутне су у великом броју, ИЋК-МП (звезда) окружују ганглионе мијентеричког плексуса, нарочито бројне на граници кружног и уздужног мишићног подслоја. *C-kit* имунохистохемија А,В-х 400; Б,Г- х200.

4.2.2. Дистрибуцији интерстицијалних ћелија Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта експерименталне групе пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом

У експерименталној групи са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетесом мелитусом није било разлике у дебљини мишићног зида у односу на контролну групу (слика 31). Такође, на свим узорцима ГИТ-а ДМ групе нису запажени знакови некрозе, апоптозе, нити је примећена запаљенска реакција-инфилтрација неутрофилима или лимфоцитима.



Слика 31. Мишићни слој ГИТ-а експерименталне (Б,В) и контролне групе (А,Г). **А:** кардија контролна група, **Б:** проксимални колон ДМ група, дебели кружни мишићни подслој (испрекидана линија) и танки уздужни мишићни подслој (цртица), ламина мускуларис мукозе (звездица). **В:** мишићни слој цекума ДМ групе, **Г:** дистални колон контролне групе. *Desmin* имунохистохемија А,Д x100, В,С x 200.

Сви ИЋК подтипови били су присутни у мишићном слоју различитих анатомских локација ГИТ-а пацова са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетесом

мелитусом. Нумеричка ареална густина ИТК различитих анатомских делова ГИТ-а код пацова са дијабетесом мелитусом приказана је на табели 9. Тестирање просечних вредности параметра густине нервних структура показало је да нема статистички значајне разлике у волуменској густини NF-а између желуца, танког црева и дебелог црева ($F=0,296$ $p>0,05$ n.s.). Такође нема статистички значајне разлике у густини ИТК-ИМЛ између анатомских локација ГИТ-а ДМ групе ($KW\ Chi=0,803$, $p>0,05$ n.s.), док су просечне вредности $N_{ИТК}$, $N_{ИТК-ИМЦ}$ и степен окружености ганглиона значајно веће у дебелом цреву у односу на танко црево и жeluдац ($N_{ИТК}\ KW\ Chi=55,119$ $p<0,0001$; $N_{ИТК-ИМЦ}\ KW\ Chi=229,449$ $p<0,0001$; $\%МП\ KW\ Chi=59,862$ $p<0,0001$) (Табела 9.).

Табела 9. Просечне вредности волуменске густине (V_V) NF, нумеричке ареалне густине (N_A) ИТК, степена окружености ганглиона ($\%МП$) желуца, танког и дебелог црева ДМ групе пацова.

параметар	Регија ГИТ-а	<i>N</i>	<i>X</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	ANOVA/ Kruskal Wallis
V_V NF	желудац	36	4.02	1.09	27.10	1.977	5.694	F=0.296 p=0.744
	танко ц.	60	4.14	1.01	24.30	1.977	5.712	
	дебело ц.	60	4.18	0.94	22.43	1.937	6.012	
N_A ИТК	желудац	317	74.27	30.48	41.04	8.857	194.914	Chi-s=55.119 p=0.000
	танко ц.	309	77.69	37.81	48.66	5.279	212.219	
	дебело ц.	320	97.98	44.68	45.60	.754	241.997	
N_A ИТК-ИМЦ	желудац	317	40.31	24.05	59.66	.000	125.457	Chi-s=229.449 p=0.000
	танко ц.	309	29.58	20.48	69.26	.683	86.071	
	дебело ц.	320	63.53	28.39	44.69	.000	156.963	
N_A ИТК-ИМЛ	желудац	317	7.85	4.77	60.81	.000	21.191	Chi-s=0.803 p=0.669
	танко ц.	309	8.07	4.61	57.05	.000	20.129	
	дебело ц.	320	8.68	6.77	78.04	.000	72.171	
$\%МП$	желудац	201	20.25	16.38	80.91	0	60	Chi-s=59.862 p=0.000
	танко ц.	309	21.50	19.12	88.94	0	80	
	дебело ц.	311	32.35	20.62	63.73	0	90	

N-број анализираних видних поља, *X*-средња вредност, *SD*-стандардна девијација, *CV*-кофицијент варијације, *Chi-s-Chi-square*, статистички значајна разлика (црвено).

Тестирање просечних вредности свих параметара густине ИТК показало је статистички значајно мање вредности у ДМ групи, у односу на контролну, док између група нема разлике у густини нервних структура ($t=0,144$ $p>0,05$ n.s.) (табела 10.).

Табела 10. Параметри густине нервних структура и ИТК контролне и ДМ групе.

параметар	група	<i>N</i>	<i>X</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>	<i>t-test / Mann-Whitney</i>
Vg NF	контрола	156	4.14	1.06	25.48	$t=0.144$
	дијабетес	156	4.13	1.00	24.13	$p=0.885$
Na ИТК	контрола	930	165.24	65.50	39.64	$Z=27.994$
	дијабетес	946	83.40	39.51	47.37	$p=0.000$
Na ИТК-ИМЦ	контрола	930	147.84	63.22	42.76	$Z=33.597$
	дијабетес	946	44.66	28.35	63.48	$p=0.000$
Na ИТК-ИМЛ	контрола	930	16.72	10.12	60.50	$Z=22.428$
	дијабетес	946	8.20	5.49	66.93	$p=0.000$

N-број анализираних видних поља, *X*-средња вредност, *SD*-стандардна девијација, *CV*-коэффициент варијације, статистички значајна разлика (црвено).

Средње вредности нумеричке ареалне густине укупних ИТК и нумеричке ареалне густине интрамукуларних подтипова ИТК у ДМ и контролној групи желуца, танког и дебелог црева приказане су у табели 11. Упоредивање средњих вредности густине ИТК сваког појединачног узоркованог сегмента ГИТ-а приказани су у табелама 12 и 13.

Табела 11. Средње вредности нимеричке ареалне густине (N_A) ИЋК и ИЋК-ИМ контролне и ДМ групе у различитим регионима ГИТ-а

регија ГИТ-а	параметар	група	N	X	SD	CV	<i>Mann-Whitney</i>
желудац	N_A ИЋК	контролна	314	185.94	72.75	39.13	Z=18.795
		дијабетес	317	74.27	30.48	41.04	p=0.000
	N_A ИЋК-ИМЦ	контролна	314	167.76	64.82	38.64	Z=20.916
		дијабетес	317	40.31	24.05	59.66	p=0.000
	N_A ИЋК-ИМЛ	контролна	314	19.89	11.49	57.78	Z=15.715
		дијабетес	317	7.85	4.77	60.81	p=0.000
танко прево	N_A ИЋК	контролна	309	117.92	33.65	28.53	Z=12.636
		дијабетес	309	77.69	37.81	48.66	p=0.000
	N_A ИЋК-ИМЦ	контролна	309	92.92	30.94	33.29	Z=19.988
		дијабетес	309	29.58	20.48	69.26	p=0.000
	N_A ИЋК-ИМЛ	контролна	309	11.64	5.39	46.33	Z=8.437
		дијабет	309	8.07	4.61	57.05	p=0.000
дебело прево	N_A ИЋК	контролна	307	191.68	55.40	28.90	Z=17.828
		дијабетес	320	97.98	44.68	45.60	p=0.000
	N_A ИЋК-ИМЦ	контролна	307	182.74	46.87	25.65	Z=21.381
		дијабетес	320	63.53	28.39	44.69	p=0.000
	N_A ИЋК-ИМЛ	контролна	307	18.59	10.32	55.48	Z=14.300
		дијабетес	320	8.68	6.77	78.04	p=0.000

N -број видних поља, X -средња вредност, SD -стандардна девијација, CV -кофицијент варијације, статистички значајна разлика (црвено).

Табела 12. Нумеричка ареална густина (N_A) подтипова ИТК свих узоркованих делова желуца и танког црева контролне и ДМ групе

регија ГИТ-а	параметар	група	N	X	SD	CV	<i>Mann-Whitney</i>
корпус желуца	N_A ИТК	контрола	106	241.15	55.73	23.11	$Z=12.274$
		дијабетес	105	89.67	27.28	30.42	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЦ	контрола	106	201.99	55.24	27.35	$Z=12.280$
		дијабетес	105	49.97	28.88	57.78	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЛ	контрола	106	24.34	10.78	44.28	$Z=10.488$
		дијабетес	105	8.95	5.43	60.62	$p=0.000$
дуоденум	N_A ИТК	контрола	105	125.28	28.58	22.81	$Z=9.943$
		дијабетес	105	67.04	33.79	50.41	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЦ	контрола	105	106.37	33.82	31.80	$Z=11.852$
		дијабетес	105	34.60	18.59	53.71	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЛ	контрола	105	10.16	4.50	44.29	$Z=6.489$
		дијабетес	105	5.85	3.55	60.66	$p=0.000$
јејунум	N_A ИТК	контрола	102	120.72	40.03	33.16	$Z=5.584$
		дијабетес	102	88.03	37.65	42.78	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЦ	контрола	102	91.21	30.59	33.54	$Z=11.296$
		дијабет	102	27.98	22.46	80.29	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЛ	контрола	102	14.13	4.88	34.50	$Z=5.978$
		дијабет	102	9.80	4.79	48.89	$p=0.000$
илеум	N_A ИТК	контрола	102	107.54	28.91	26.88	$Z=5.793$
		дијабет	102	78.32	39.23	50.09	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЦ	контрола	102	80.79	21.57	26.70	$Z=11.547$
		дијабет	102	26.00	19.43	74.73	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЛ	контрола	102	10.66	5.88	55.10	$Z=2.705$
		дијабет	102	8.63	4.50	52.19	$p=0.007$

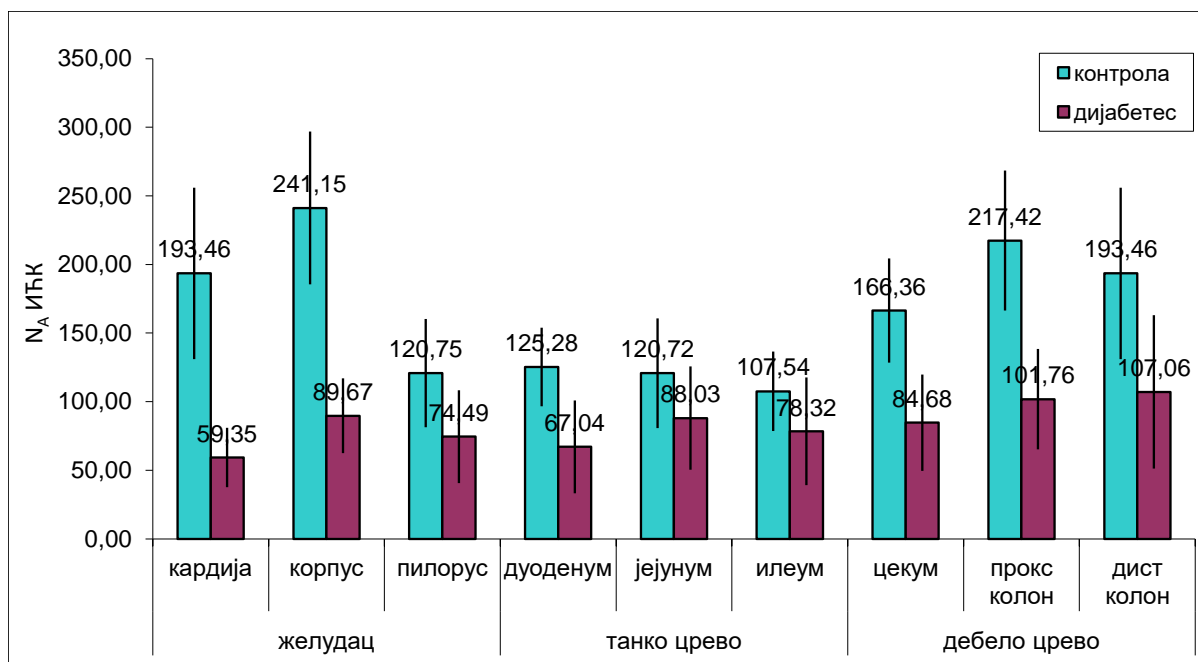
N -број анализираних видних поља, X -средња вредност, SD -стандардна девијација, CV -коэффициент варијације, статистички значајна разлика (црвено).

Табела 13. Нумеричка ареална густина (N_A) подтипова ИТК свих узоркованих делова дебелог црева контролне и ДМ групе

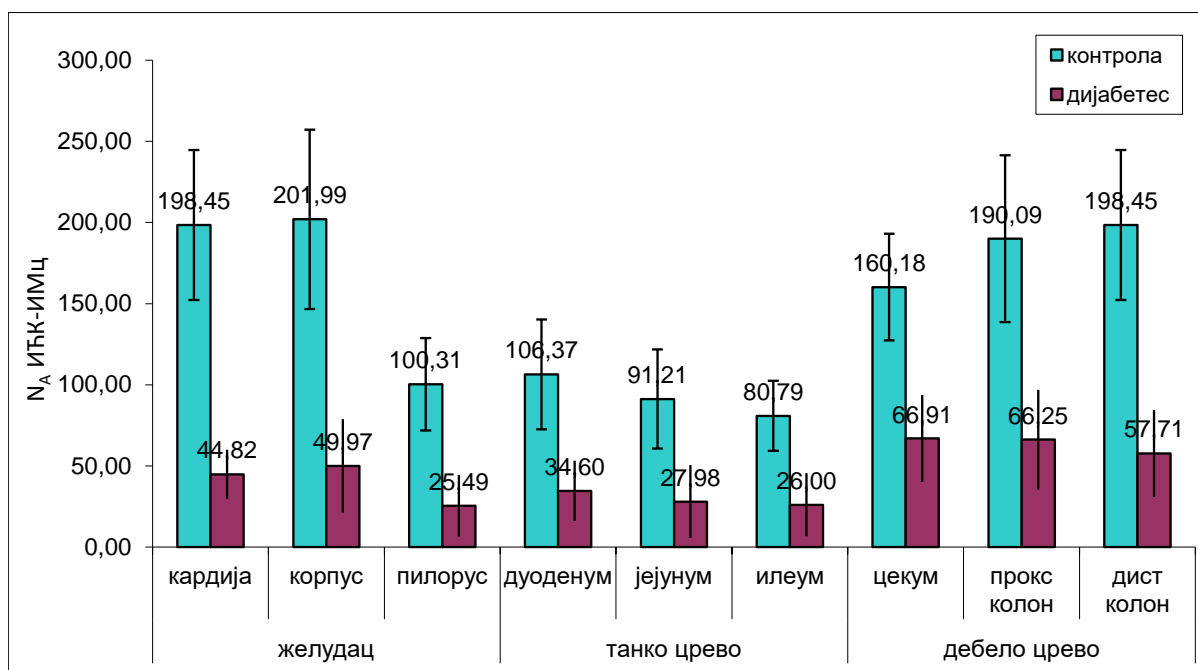
регија ГИТ-а	параметар	група	N	X	SD	CV	<i>Mann-Whitney</i>
цекум	N_A ИТК	контрола	105	166.36	37.98	22.83	$Z=11.784$
		дијабетес	105	84.68	35.15	41.51	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЦ	контрола	105	160.18	32.83	20.50	$Z=12.521$
		дијабетес	105	66.91	26.80	40.05	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЛ	контрола	105	12.46	5.29	42.45	$Z=8.069$
		дијабетес	105	6.77	3.67	54.32	$p=0.007$
проксимални колон	N_A ИТК	контрола	96	217.42	50.98	23.45	$Z=11.350$
		дијабетес	105	101.76	36.55	35.92	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЦ	контрола	96	190.09	51.38	27.03	$Z=12.173$
		дијабетес	105	66.25	30.72	46.38	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЛ	контрола	96	20.30	8.96	44.10	$Z=8.832$
		дијабетес	105	10.12	8.27	81.67	$p=0.007$
дистални колон	N_A ИТК	контрола	106	193.46	62.56	32.34	$Z=8.726$
		дијабетес	110	107.06	55.87	52.18	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЦ	контрола	106	198.45	46.25	23.31	$Z=12.445$
		дијабетес	110	57.71	26.85	46.53	$p=0.000$
	N_A ИТК-ИМЛ	контрола	106	23.11	12.21	52.80	$Z=9.376$
		дијабетес	110	9.13	7.10	77.80	$p=0.007$

N -број анализираних видних поља, X -средња вредност, SD -стандардна девијација, CV -коэффициент варијације, статистички значајна разлика (црвено).

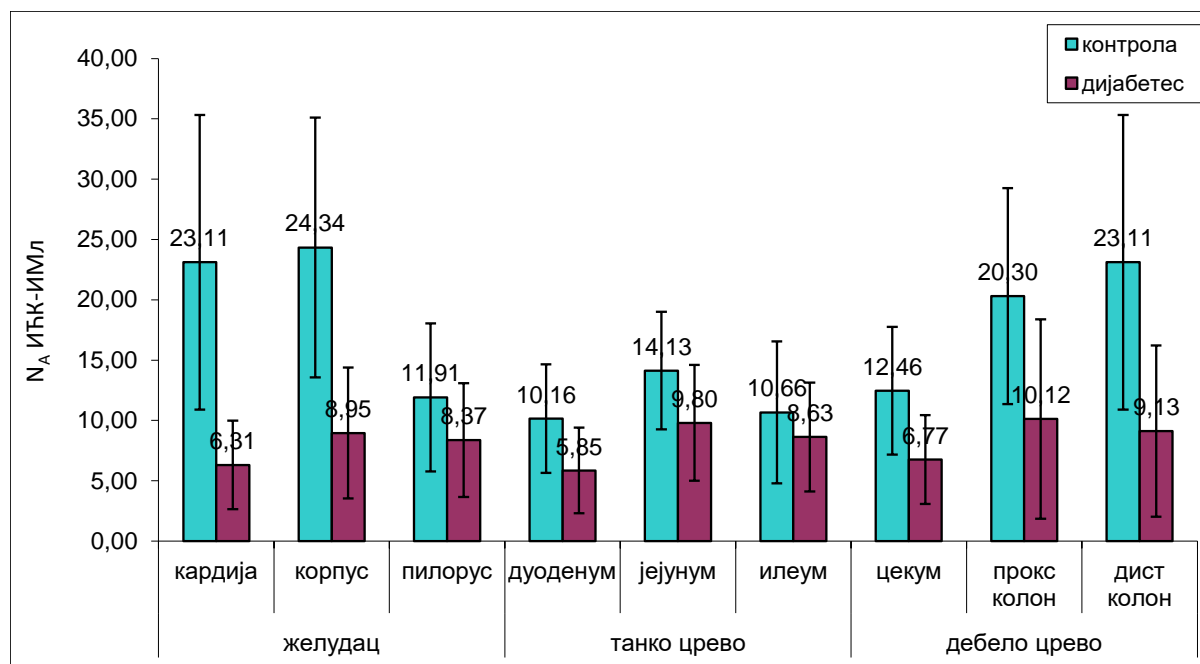
На графикону 1. приказана је нумеричка ареална густина укупних ИТК раличитих анатомских локација контролне групе и експерименталне групе пацова са дијабетесом. Нумеричка ареална густина интрамукуларних ИТК унутар кружног мишићног подслоја и уздужног мишићног подслоја приказане су на графиконима 2. и 3.



Графикон 1. Нумеричка ареална густина свих ИТК подтипови у ГИТ-у пацова контролне и ДМ групе.

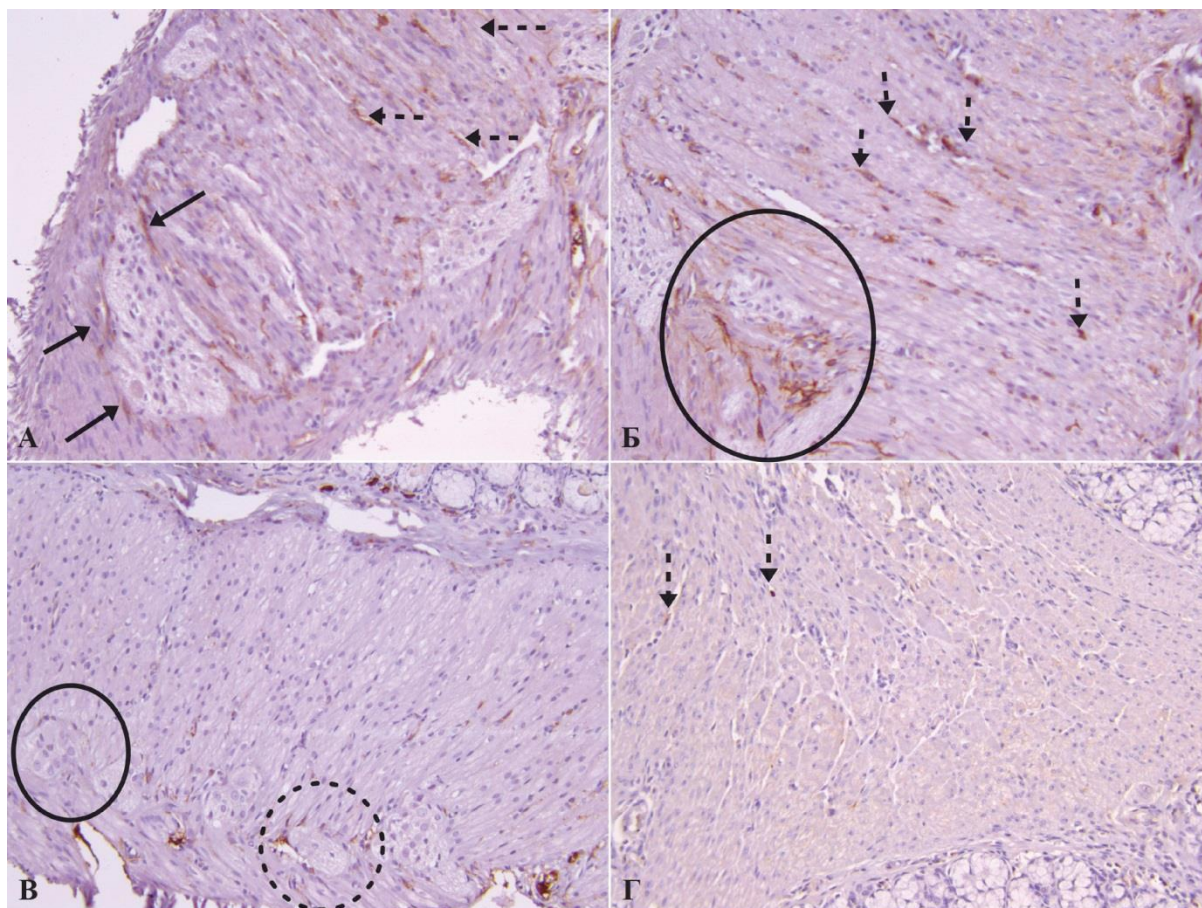


Графикон 2. Нумеричка ареална густина интрамукуларни ИТК кружног мишичног подслоја ГИТ-а пацова контролне и ДМ групе.



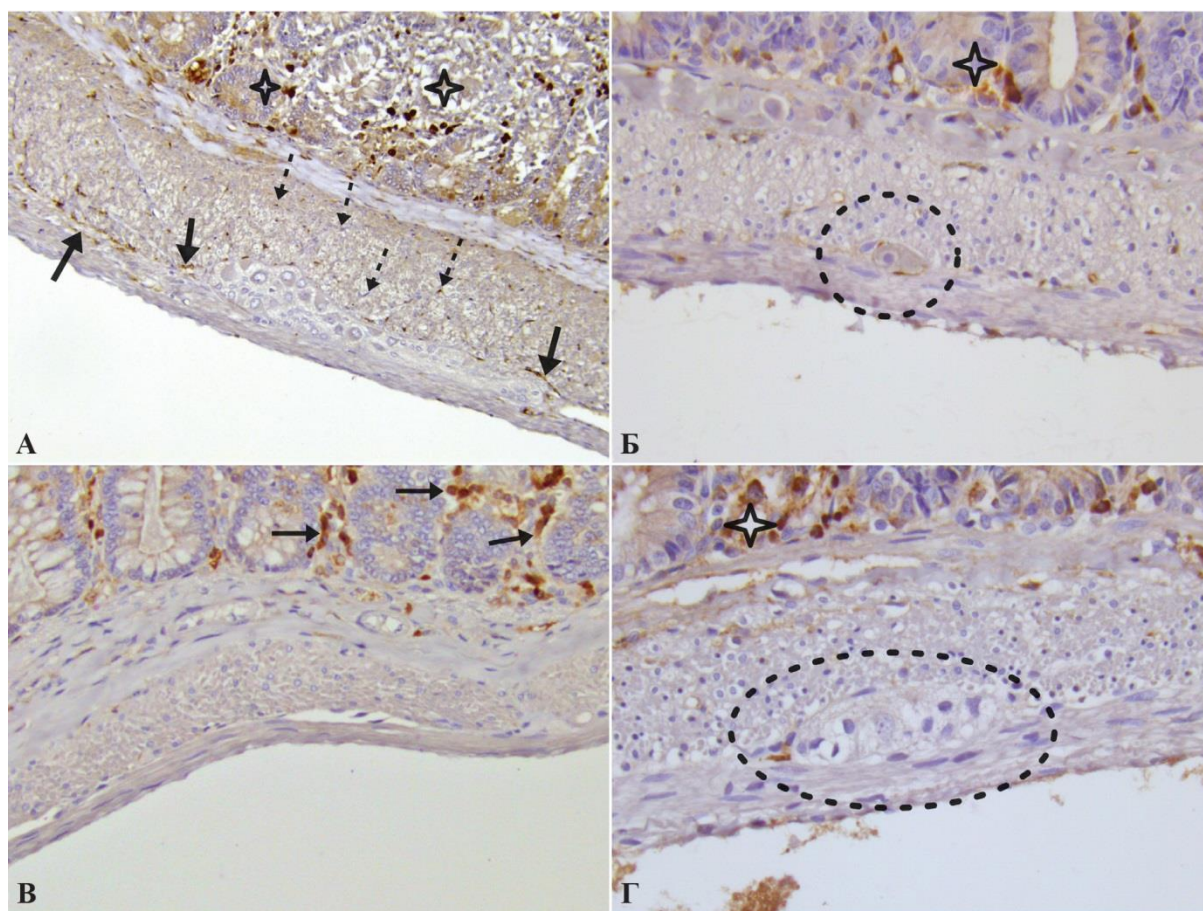
Графикон 3. Нумеричка ареална густина интрамукуларних ИЋК уздужног мишићног подслоја пацова контролне и ДМ групе.

ИЋК-ИМ у ГИТ-у ДМ групе су издуженог облика, са два цитоплазматска наставка који полазе са супротних крајева ћелије, и оријентисане паралелно уздужној оси глатко-мишићних ћелија. За разлику од контролне групе, ИЋК-ИМ су ретке и не успостављају линеарну умреженост каква се виђа у кардији и пилорусу контролне групе (слика 32-Г). ИЋК-МП су такође присутне у ДМ групи али знатно ређе (слика 32-В) и не окружују ганглионе МП у потпуности. Примећени су ганглиони МП који у својој околини имају само једну мултиполарну ИЋК-МП, а такође и ганглиони у чијој околини нема *C-kit* имунореактивности.

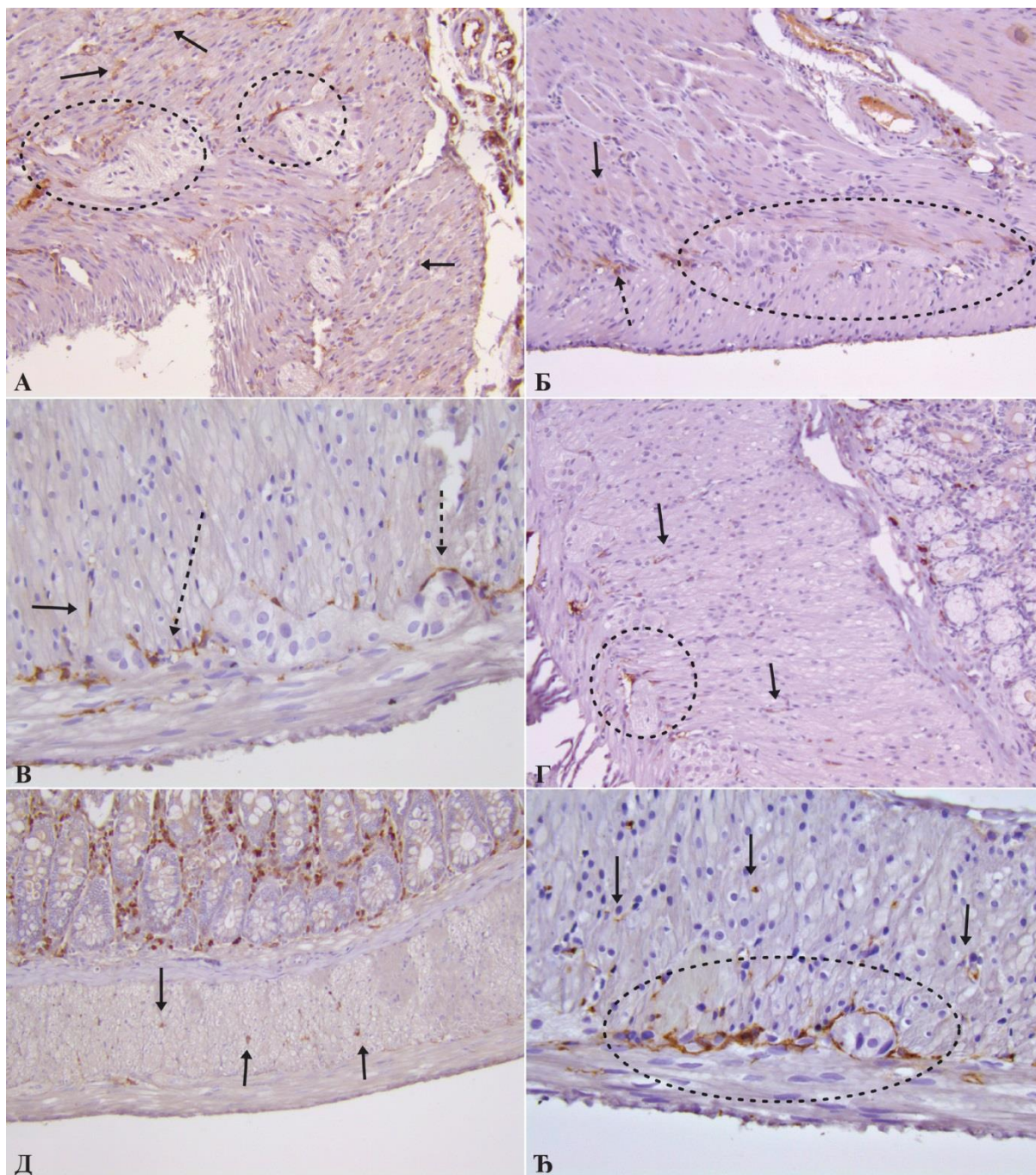


Слика 32. *C-kit* имунохистохемија желуца пацова контролне (А,Б) и ДМ (В,Г) групе. **А)** *C-kit* имунопозитивне ћелије које одговарају ИћК-МП окружују скоро у порпуности ганглион мијентеричног плексуса у пилорусу (стрелице); ИћК-ИМ су густо распоређене унутар мишићног слоја пилорусног сфинктера (испрекидана стрелица). **Б)** ИћК-МП су звездастог облика са више цитоплазматских натавака који формирају тродимензионалну мрежу око ганглиона МП (круг); ИћК-ИМ су издужене биполарне ћелије које су организоване у линеарне низове паралелно глатко-мишићним ћелијама (испрекидане стрелице). **В)** У пилорусу, ИћК-МП су ретке, мултиполарне ћелије присутне појединачно око ганглиона МП, али својим наставцима не окружују ганглијске ћелије нити формирају тродимензионалну мрежу (испрекидан круг); уочава се ганглион МП у чијој околини нема *C-kit* позитивних ћелија (круг). **Г)** попречни пресек пилорусног сфинктера; ИћК-ИМ су ретке (испрекидана стрелица) и не повезују се међусобно. А-Г х200.

Микрографије дистрибуције подтипова ИТК танког и дебелог црева контролне и ДМ групе приказане су на сликама 33. и 34.



Слика 33. *C-kit* имунохистохемија танког црева контролне (А,Б) и ДМ (В,Г) групе пацова. **А)** на попречном пресеку јејунума *C-kit* имунореактивни мастоцити присутни су у великом броју у мукози (звезда); ИТК-ИМ се налазе између глатко-мишићних ћелија, доминантно у кружном мишићном подслоју (испрекидане стрелице); ИТК-МП се налазе око ганглиона МП, али га не окружују у потпуности (стрелица). **Б)** на попречном пресеку илеума ИТК-МП се налазе око ганглиона МП (испрекидан круг); мастоцити су присутни у субмукози (звезда). **В)** попречни пресек јејунума; *C-kit* имунореактивни мастоцити присутни су у мукози и субмукози (стрелица); у глатко-мишићном слоју нема *C-kit* имунореактивних ИТК-ИМ и ИТК-МП. **Г)** попречни пресек илеума; види се једна *C-kit* позитивна ИТК-МП око ганглиона МП (испрекидани круг), *C-kit* позитивни мастоцити у мукози (стрелица), *C-kit* позитивне ИТК-ИМ су ретке у мишићном слоју. А,В x 200; Б,Г x 400.



Слика 34. *C-kit* имунохистохемија дебелог црева контролне (А,В,Е) и ДМ (Б,Г,Д) групе пацова. **А)** уздужни пресек цекума; издужене ИћК-ИМ присутне су у великом броју и повезују се у линеарни низ три ћелије (стрелица); ИћК-МП су мултиполарне и формирају густу мрежу око ганглиона МП (испрекидани круг). **Б)** попречни пресек цекума; ИћК-ИМ су ретке (стрелица) и нису повезане у линеарне низове, у околини ганглиона МП (испрекидани круг) присутне су ИћК-МП (испрекидана стрелица) које су звездастог облика и које га парцијално оружују. **В)** уздужни пресек проксималног колона; бројне ИћК-МП окружују ганглионе МП, у уздужном слоју присутне су ИћК-

ИМ (стрелица). Г) уздужни пресек проксималног колона; ИТК-МП се налазе на ивици ганглиона МП (испрекидани круг) и не окружује га, а ИТК-ИМ су ретке (стрелица). Д) уздужни пресек дисталног колона; ИТК-ИМ су ретко присутне у мишићном слоју (стрелица). Ђ) уздужни пресек дисталног колона; уочава се густа мрежа ИТК-МП око ганглиона (испрекидани круг), док су ИТК-ИМ унутар кружног мишићног слоја (стрелице). А,Б,Г,Д x 200; В,Ђ x 400.

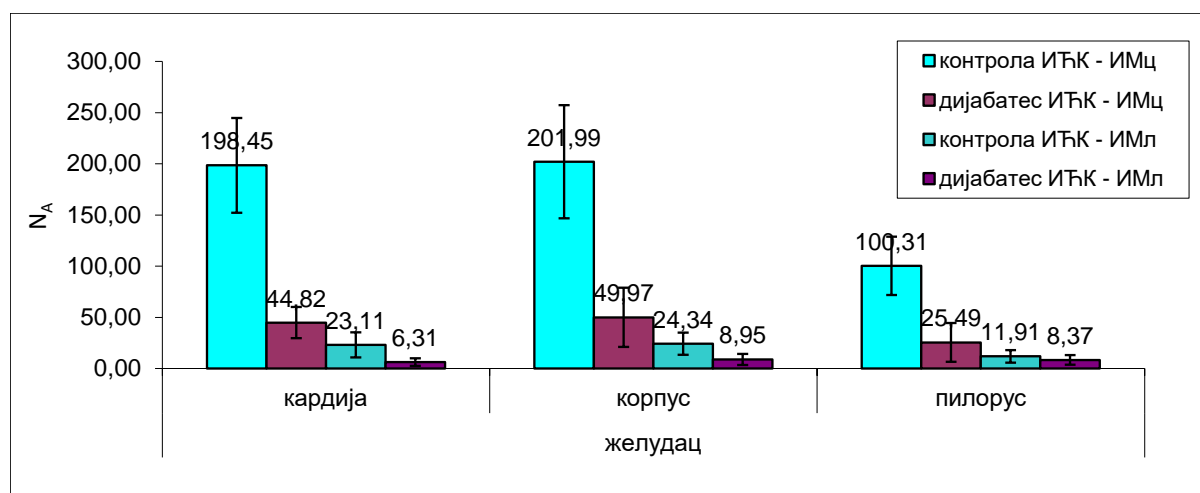
4.2.3. Дистрибуцији, морфологији и организацији интрамукуларних подтипова интерстицијалних ћелија Кахала у сфинктерима (кардија и пилорус) у експерименталној групи пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом и у контролној групи.

На узорцима кардије и пилоруса ДМ групе нису примећени знаци некрозе и апоптозе, нити знаци запаљенских реакција (нема инфилтрације неутрофилима, ни лимфоцитима). ИТК су присутне у оба мишићна подслоја, али је густина ових ћелија значајно мања код ДМ групе (слика 35). На табелаи 14. приказане су вредности нумеричке ареалне густине интрамукуларних ИТК кардије и пилоруса контролне и ДМ групе. Резултати нумеричке ареалне густине ИТК-ИМЦ кардије у кружном и уздужном мишићном подслоју значајно су мање (На ИТК-ИМЦ: $Z=12,682$ $p<0,0001$; На ИТК-ИМЛ: $Z=11,553$, $p<0,0001$) у ДМ групи у односу на контролну групу. Такође, интрамукуларне ИТК пилоруса оба мишићна подслоја статистички значајно су мање у ДМ групи у односу на контролну групу (На ИТК-ИМЦ: $Z=12,135$ $p<0,0001$; На ИТК-ИМЛ: $Z=4,408$, $p<0,0001$), (табела 14.). На графикону 4. приказане су вредности нумеричке ареалне густине оба ИТК интрамукуларна подтипа у желуцу ДМ и контролне групе.

Табела 14. Нумеричка ареална густина (N_A) интрамукуларних подтипова ИТК у сфинктерима желуца контролне и ДМ групе.

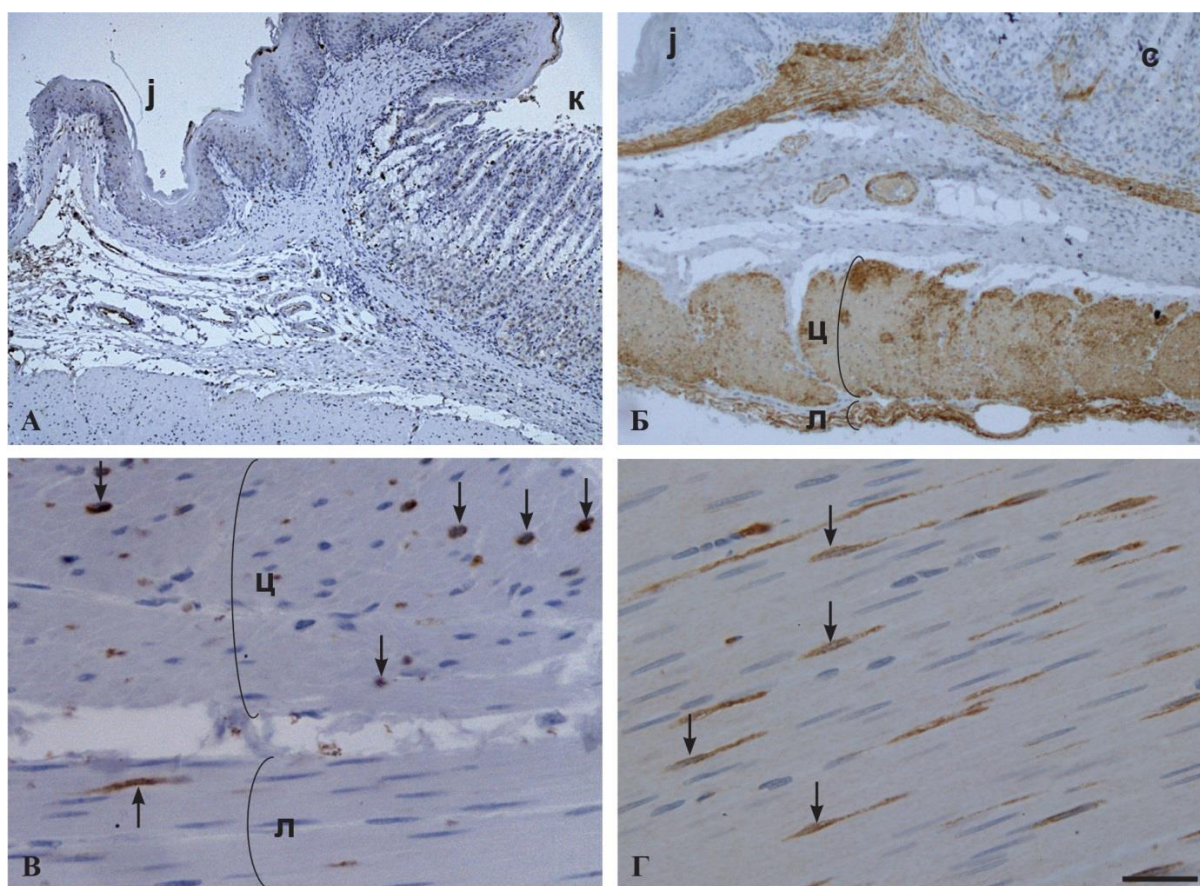
параметар	група	N	X	SD	CV	$Mann-Whitney$
N_A ИТК-ИМЦ кардије	контрола	106	198.45	46.25	23.31	$Z=12.682$
	дијабетес	110	44.83	15.19	33.90	$p=0.000$
N_A ИТК-ИМЛ кардије	контрола	106	23.11	12.21	52.80	$Z=11.553$
	дијабетес	110	6.31	3.68	58.23	$p=0.000$
N_A ИТК-ИМ пилоруса	контрола	102	100.31	28.52	28.43	$Z=12.135$
	дијабетес	102	25.49	18.99	74.49	$p=0.000$
N_A ИТК-ИМЛ пилоруса	контрола	102	11.91	6.14	51.52	$Z=4.408$
	дијабетес	102	8.37	4.72	56.38	$p=0.000$

N -број видних поља, X -средња вредност, SD -стандардна девијација, CV -коэффициент варијације, статистички значајна разлика (црвено).

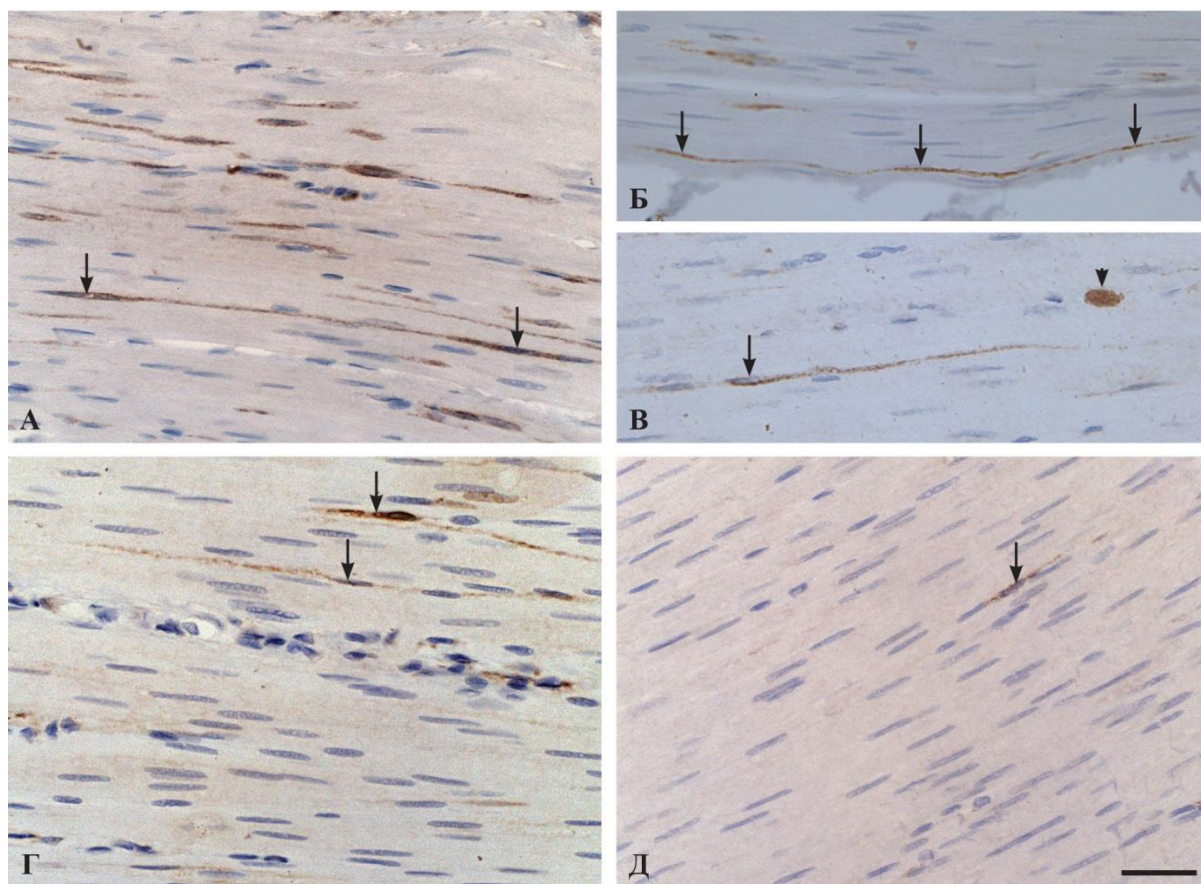


Графикон 4. Нумеричка ареална густина интрамукуларних подтипова ИТК у желуцу контролне и ДМ групе пацова. N_A ИТК-ИМЦ-нумеричка ареална густина интрамукуларних ИТК кружног мишићног подслоја; N_A ИТК-ИМЛ- нумеричка ареална густина интрамукуларних ИТК уздужног мишићног подслоја

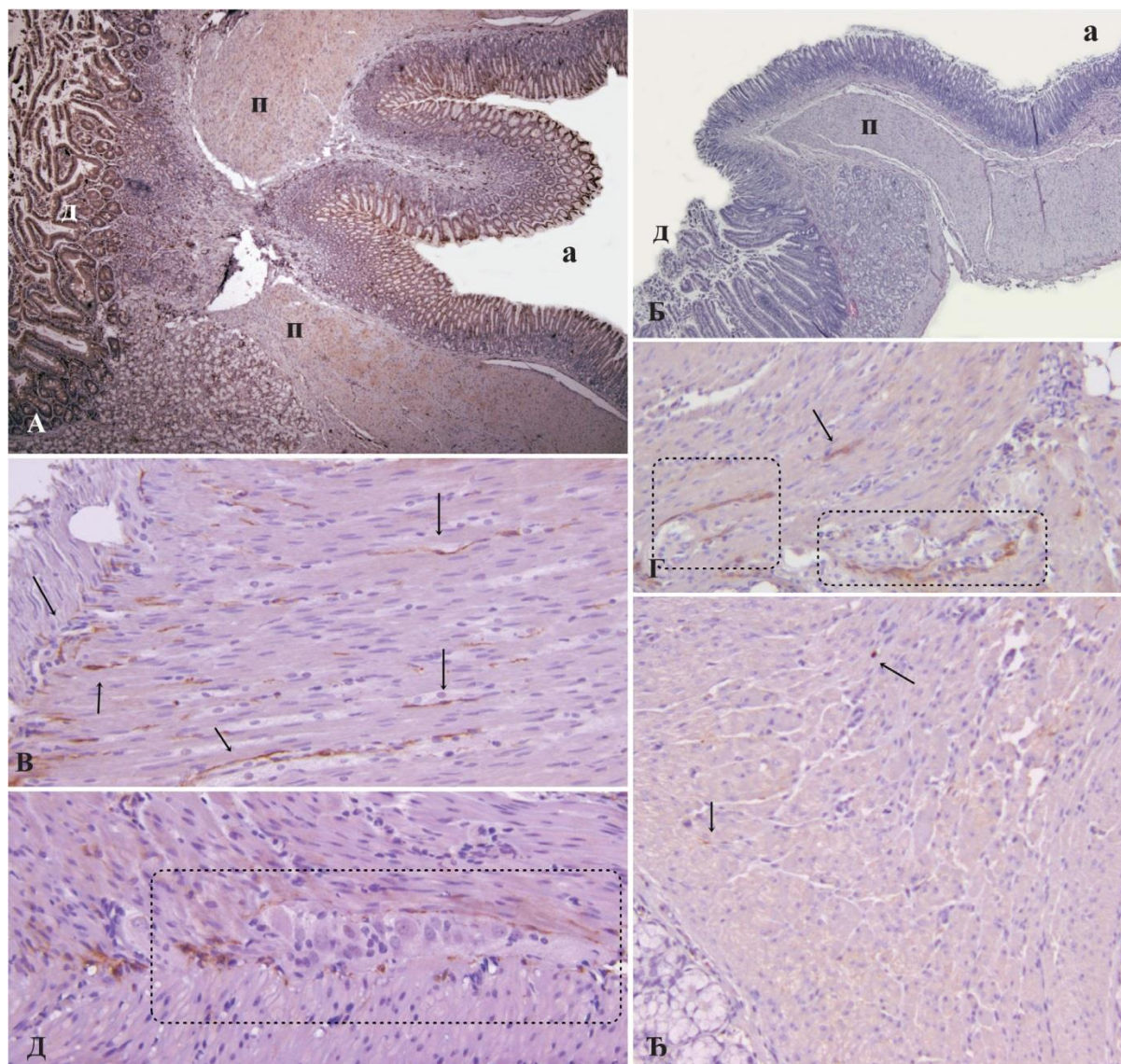
У кардији ДМ групе, ИТК-ИМ су ретко присутне, а линеарне ћелијске везе са суседним ИТК-ИМ у потпуности изостају. ИТК-ИМ су присутне као појединачне ћелије у видном пољу узорака кардије ДМ групе, а такође у неким узорцима запажају се такозвана „празна поља“ са потпуним изостанком *C-kit* имунореактивних ћелија (слика 36 Г и Д). Поред ИТК, присутни су и ц-кит имунореактивни мастоцити у обе експерименталне групе (слика 36.В). Мастоцити су били присутни нарочито у ламини проприји између гастричних жлезди, у субмукози и у везивно-ткивним септама мишићног слоја.



Слика 35. *C-kit* (А,В,Г) и десмин (Б) имунохистохемија кардије пацова контролне групе. А) Кардија (к) и дистални део једњака (ј). Б) десмин имунореактивност је присутна у широком циркуларном (ц) и танком уздужном (л) мишићном слоју кардије. В) циркуларни (ц) и лонгитудинални (л) мишићни слој кардије; *C-kit* имунореактивне ћелије (стрелице) које одговарају ИТК-ИМ, дистрибуиране су паралелно лонгитудиналној оси глатко-мишићних ћелија у оба мишићна слоја. Г) циркуларни мишићни подслој кардије; *C-kit* имунореактивне ћелије (стрелице) су бројне, издуженог тела са два дуга цитоплазматска наставка који полазе са супротних страна ћелије. А x100, Б x 200, В, Г x 400.



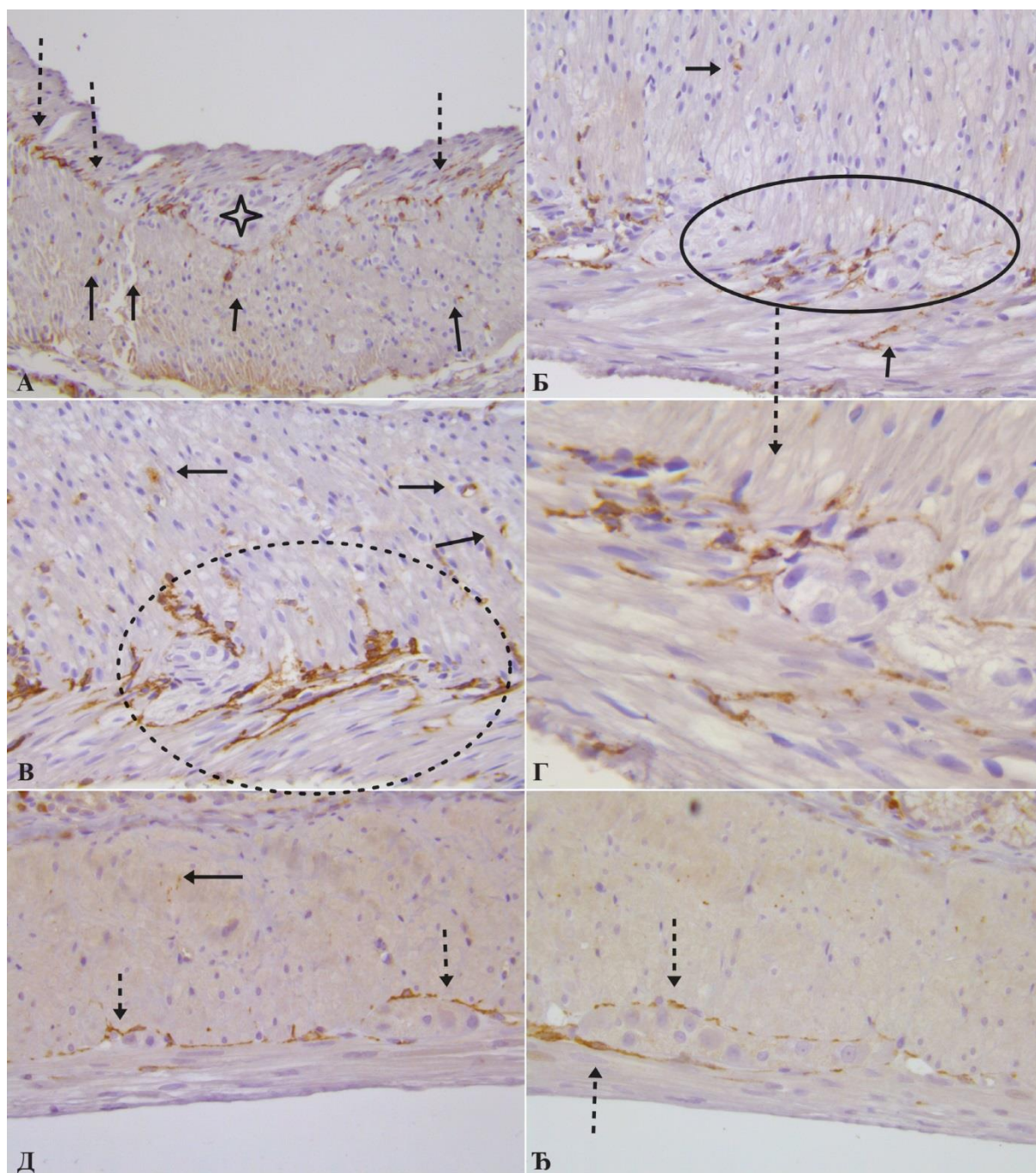
Слика 36. *C-kit* имунохистохемија кардије пацова испитиваних група пацов. **А)** циркуларни мишићни слој кардије контролне групе; ИћК-ИМ су углавном појединачне, али се такође уочавају дугачки линеарни низови уздужно повезаних ИћК-ИМ (стрелице). **Б)** виде се три ИћК које су повезане (стрелице) и оријентисане паралелно уздужној оси глатко-мишићних ћелија. **В)** ИћК-ИМ (стрелица) са изузетно дугим и танким цитоплазматским наставцима; изолована, овална *C-kit* имунореактивна ћелија која одговара мастоциту (врх стрелице) локализована унутар септе глатко-мишићног слоја. **Г)** кружни мишићни подслој кардије ДМ групе; ИћК (стрелице) су ретке у поређењу са контролном групом. **Д)** циркуларни мишићни слој кардије ДМ групе; једна појединачна ИћК-ИМ, оријентисана паралелно уздужној оси глатко-мишићних ћелија. А-Д x400.



Слика 37. *C-kit* имунохистохемија пилоруса пацова контролне (А,В,Д) и ДМ (Б,Г,Е) групе. **А,Б)** уздужни пресек пилорусног сфинктера; антрум желуца (а), пилорусни сфинктер (п), дуоденум (д). **В)** *C-kit* имунопозитивне ћелије које одговарају ИТК-ИМ су густо распоређене унутар мишићног слоја пилорусног сфинктера (стрелица). **Г)** ИТК-МП су ретке, присутне појединачно око ганглиона МП, које својим наставцима не окружују ганглијске ћелије нити формирају тродимензионалну мрежу (унутар испрекидане линије). **Д)** ИТК-МП су звездастог облика са више цитоплазматских натавака који формирају тродимензионалну мрежу око ганглиона МП (унутар испрекидане линије). **Е)** ИТК-ИМ су ретке (стрелица) и не повезују се међусобно. А,Б x40, В-Е x200.

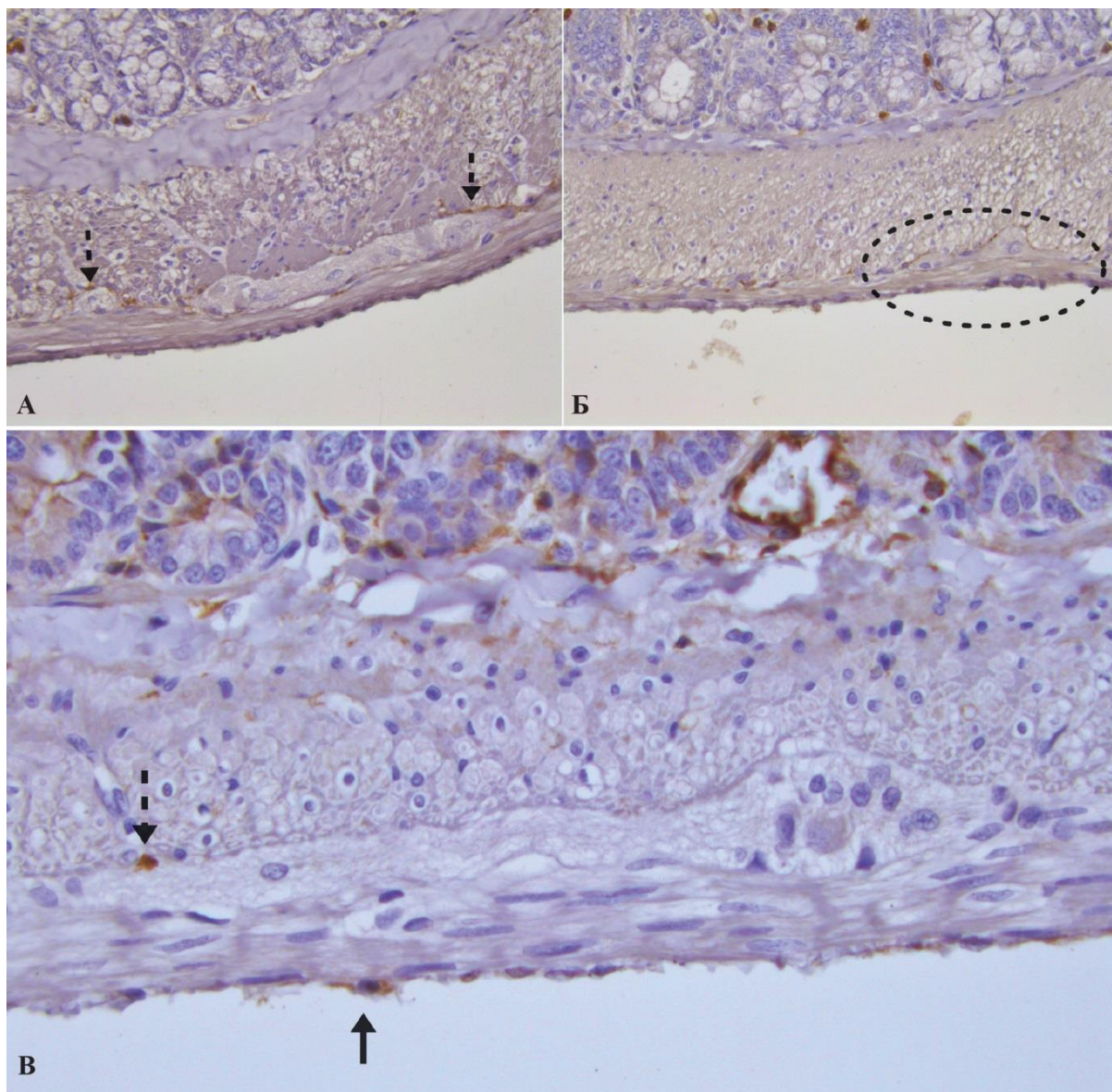
4.2.4. Морфолошке карактеристике и организација интерстицијалних ћелија Кахала мијентеричног и субмукозног плексуса код групе пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом и контролне групе

У пределу мијентеричног плексуса ДМ групе, уочене су звездасте *C-kit* имунореактивне ћелије, чији се дугачки наставци пружају око ивице ганглиона. Ни тела ни цитоплазматски наставци ових ћелија нису залазили унутар ганглиона. Ове ћелије по својој морфологији и локализацији одговарају ИТК-МП. Међутим, густа мрежа ових ћелија око МП, каква се може видети у контролној групи (слика 38.), није се могла уочити у експерименталној групи пацова са ДМ. У пилорусу експерименталне групе са ДМ, уочавају се ганглиони са по једном ИТК-МП чији наставци не окружују у потпуности МП (слика 32.). Такође, присутни су и ганглиони око којих није била забележена *C-kit* имунореактивност, односно ИТК-МП су биле одсутне (слика 32 В.). Дистрибуција ИТК-МП у дебелом цреву ДМ групе на узорцима цекума, проксималног колона и дисталног колона, слична је као и у осталим деловима ГИТ-а, осим што је број ових ћелија значајно мањи, а умрежавање ових ћелија углавном изостаје (слика 39.).



Слика 38. *C-kit* имунохистохемија дебелог црева пацова контролне групе пацова. **А)** уздужни пресек цекума; ИћК-МП су густо распоређене на граници кружног и уздужног мишићног подслоја (испрекидане стрелице) и око ганглиона МП (звездица); у кружном мишићном слоју присутне су ИћК-ИМ (стрелица). **Б)** уздужни пресек проксималног колона; ИћК-ИМ (стрелице), ИћК-МП формирају густу мрежу која у потпуности обавија ганглионе МП (круг), **В)** ИћК-ИМ(стрелице) на попречном пресеку проксималног колона, мултиполарне ИћК-МП са више цитоплазматских наставка формирају густе сплет око ганглиона (испрекидани круг), **Г)** детаљ

мијентеричног плексуса са густом мрежом мултиполарних ИћК-МП са слике В. Д, Ђ) уздужан пресек дисталног колона; ИћК-ИМ (стрелица), ИћК-МП формирају фини танки омотач око ганглиона (испрекидана стрелица). А x 200; Б, В, Д, Ђ x 400; Г x 800.



Слика 39. *C-kit* имунохистохемија дебелог црева пацова ДМ групе. **А)** уздужни пресек цекума; ИћК-МП (испрекидане стрелице) непотпуно окружују ганглионе у потпуности. **Б)** уздужни пресек проксималног колона; танка линија цитоплазматских наставака око ганглиона МП (испрекидани круг). **В)** уздужни пресек дисталног колона, око ганглиона МП уочава се само тело једне ИћК (испрекидана стрелица), а у субсерози, једна сателитска ИћК-СС (стрелица). А, Б x200; В x400.

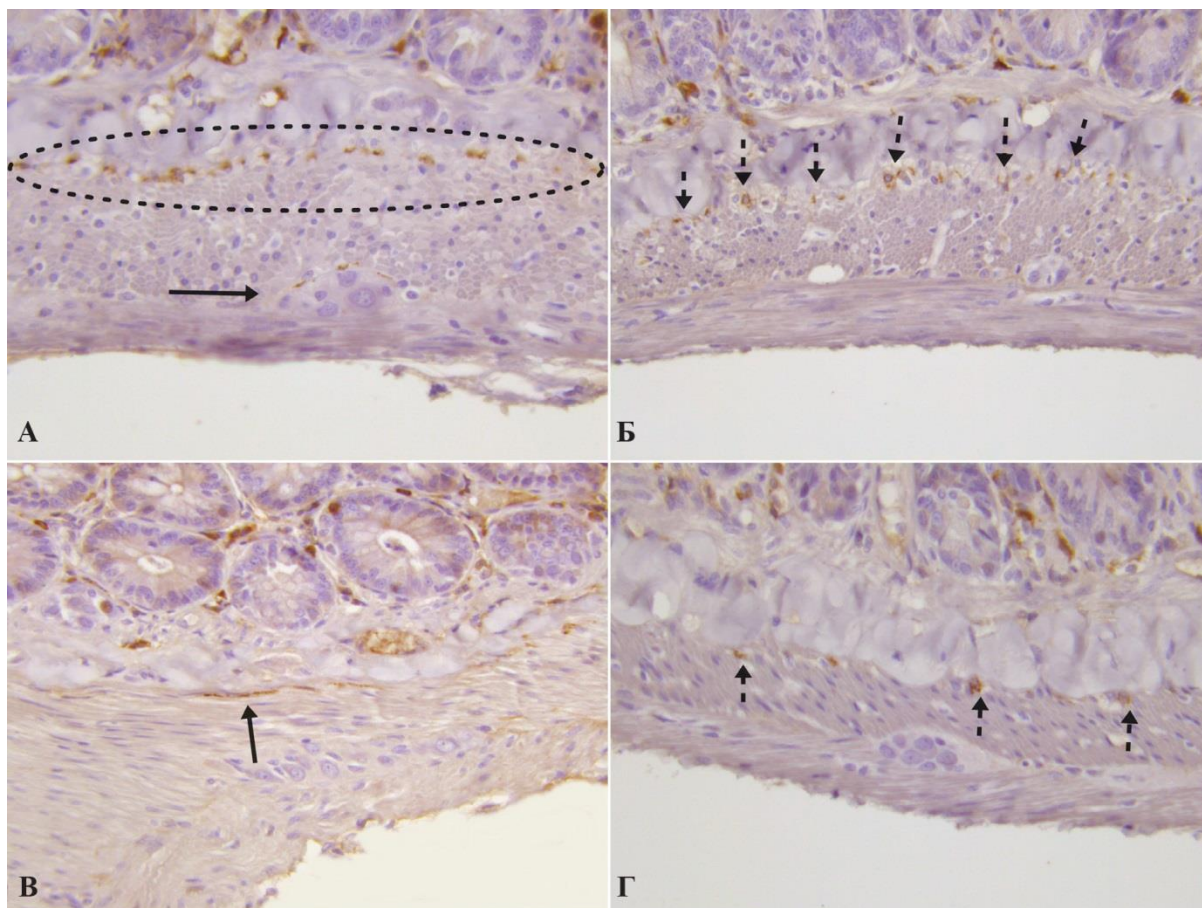
У табели 15. приказане су просечне вредности процене степена окружености ганглиона МП контролне и ДМ групе са вредностима статистички значајне разлике међу групама. Тестирањем просечних вредности %МП показана је статистички значајно мања густина ИћК-МП у ДМ групи у односу на контролну групу код свих узорака ГИТ-а (графикон 5.).

У субмукози узорака из колона и цекума, на споју са унутрашњом површином кружног мишићног слоја, уочавају се *C-kit* имунореактивне ћелије, ИћК-СМП, звездастог облика са два до три краћа цитоплазматска наставка, које су појединачне и нису у овим пределима груписане у линеарне низове (слика 40. Г) за разлику од ИћК-СМП контролне групе (слика 40-А,Б,В). Такође, на већини видних поља узорака цекума и колона нема *C-kit* имунореактивних ИћК-СМП.

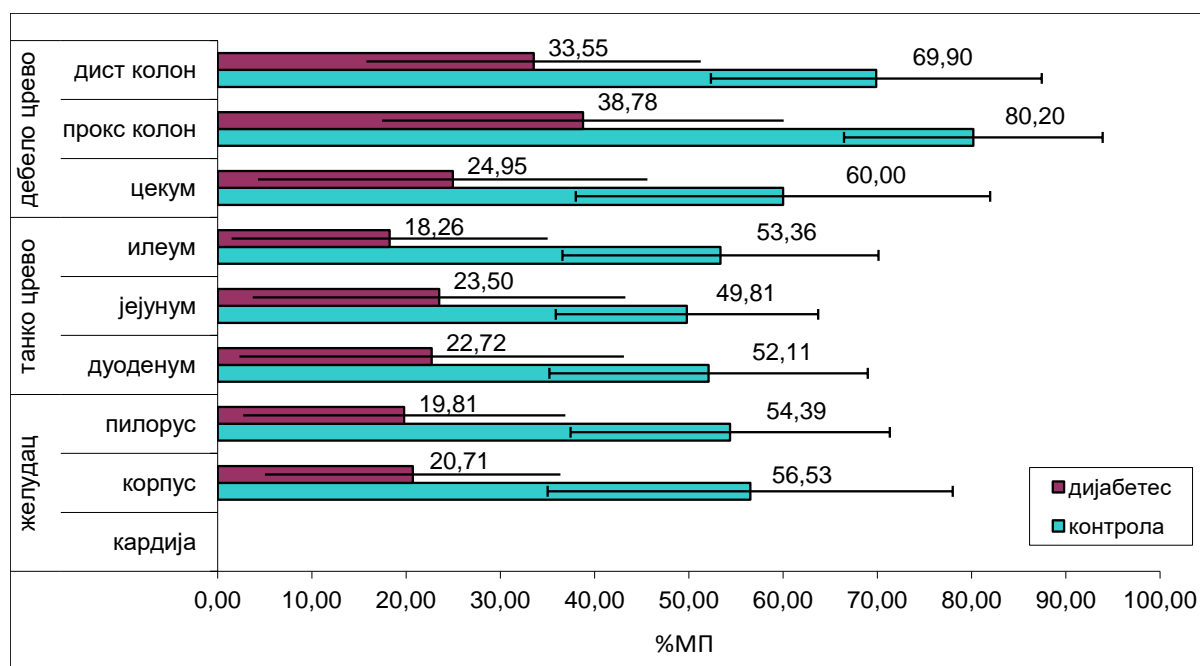
Табела 15. Степен окружености ганглиона (%МП) мијетеричног плексуса контролне и ДМ групе

регија ГИТ-а	група	N	X	SD	CV	Mann-Whitney
			%МП			
кардија	контрола	0	.	.	.	
	дијабетес	0	.	.	.	
корпус желуца	контрола	98	56.53	21.50	38.03	Z=9.708
	дијабетес	98	20.71	15.68	75.71	p=0.000
пилорус	контрола	107	54.39	16.95	31.15	Z=10.565
	дијабетес	103	19.81	17.09	86.27	p=0.000
дуоденум	контрола	109	52.11	16.89	32.41	Z=9.031
	дијабетес	103	22.72	20.40	89.78	p=0.000
јејунум	контрола	103	49.81	13.93	27.97	Z=8.510
	дијабетес	103	23.50	19.78	84.16	p=0.000
илеум	контрола	107	53.36	16.76	31.42	Z=10.702
	дијабетес	103	18.26	16.76	91.79	p=0.000
цекум	контрола	109	60.00	21.99	36.64	Z=9.371
	дијабетес	103	24.95	20.67	82.84	p=0.000
проксимални колон	контрола	101	80.20	13.71	17.09	Z=10.698
	дијабетес	98	38.78	21.31	54.95	p=0.000
дистални колон	контрола	98	69.90	17.56	25.12	Z=10.441
	дијабетес	110	33.55	17.74	52.89	p=0.000

N-број ганглиона, X-средња вредност, SD-стандардна девијација, CV-кофицијент варијације, статистички значајна разлика (црвено).



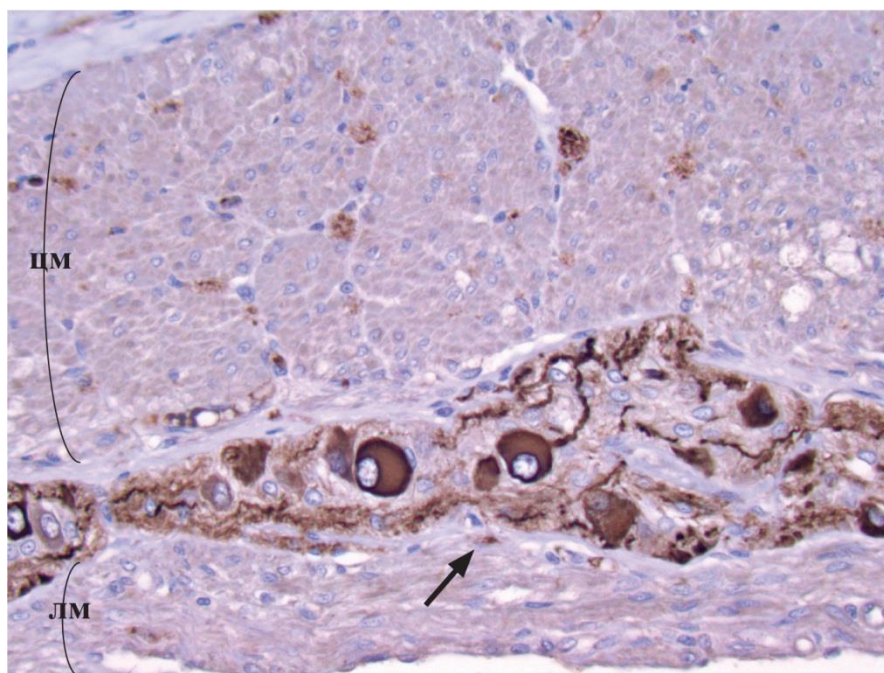
Слика 40. *C-kit* имунохистохемија дебелог црева пацова контролне (А,Б,В) и ДМ (Д) групе. **А)** уздужни пресек проксималног колона, ИћК-СМП присутне су у низу на субмукозној граници (испрекидани круг); цитоплазматски наставци ИћК-МП дисконтинуирано окружују ганглионе МП (стрелица). **Б)** удужни пресек дисталног колона; ИћК-СМП (испрекидана стрелица). **В)** на попречном пресеку цекума уочава се издужена ИћК-СМП на субмукозној граници оријентисана паралелно глаткомишићним ћелијама (стрелица). **Г)** уздужни пресек проксималног колона; виде се три ИћК-СМП (испрекидане стрелице) присутне у пределу субмукозног ганглиона. А-Г x 400.



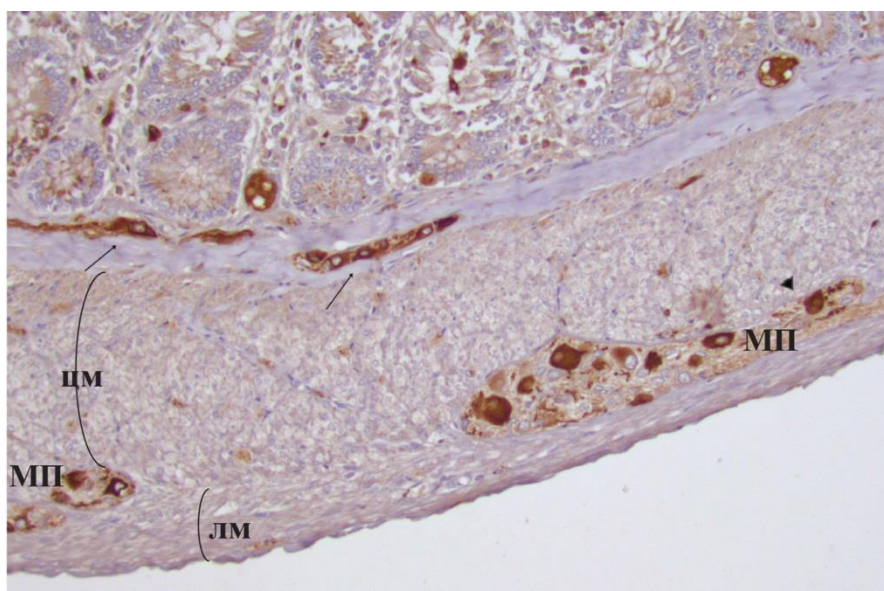
Графикон 5. Степен окружености ганглиона ГИТ-а пацова контролне и ДМ групе

4.2.5. Дистрибуција нервних структура различитих анатомских сегмената зида гастроинтестиналног тракта контролне и експерименталне групе пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом

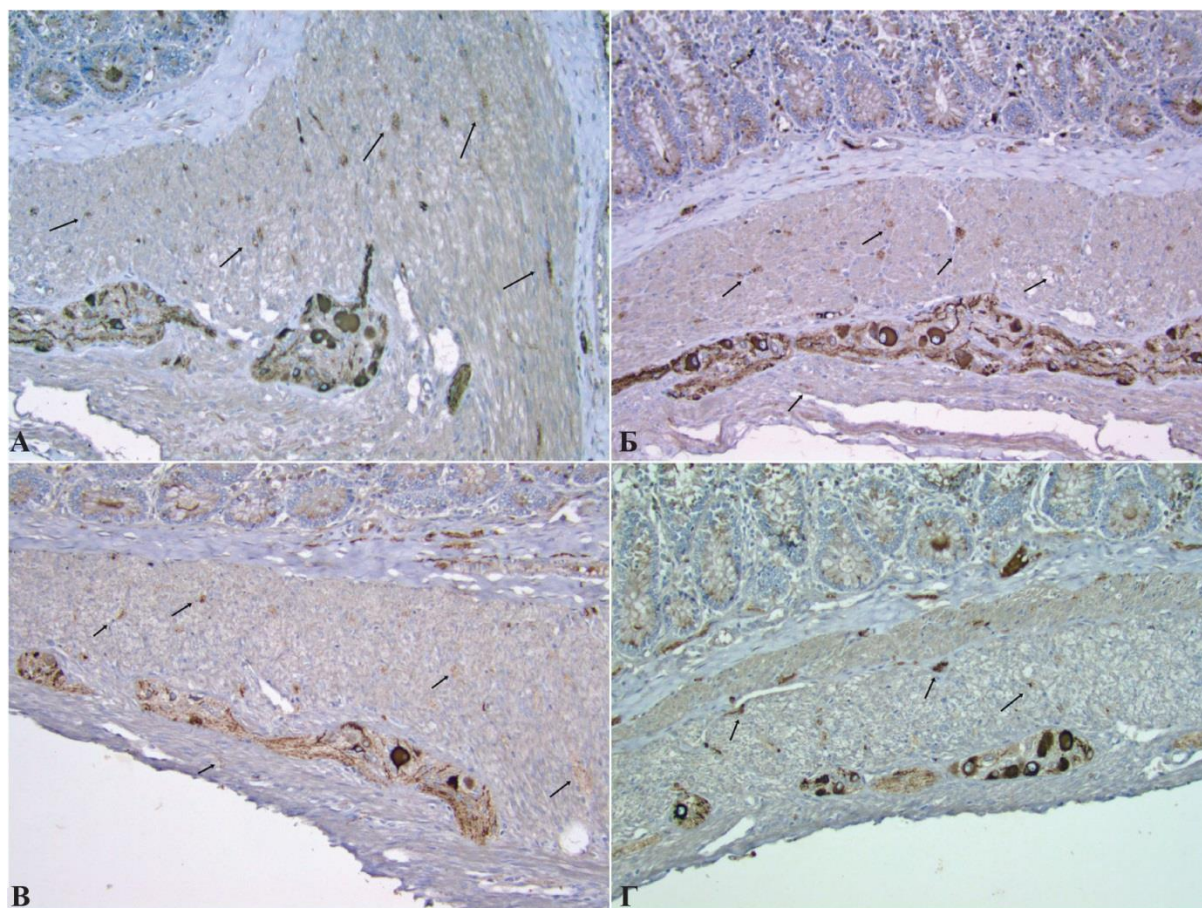
На уздужним пресецима различитих анатомских локализација ГИТ-а контролне групе и експерименталне групе са ДМ, специфичним *NF-M* имунохистохемијским бојењем, уочено је присуство ганглијских ћелија мијентеричног плексуса на споју циркуларног и лонгитудиналног мишићног слоја (слика 41). У пределу цекума, проксималног и дисталног колона, поред ганглиона МП уочени су и ганглиони субмукозног плексуса у обе експерименталне групе (слика 42.). Између група не постоји разлика у дистрибуцији и морфологији ганглиона МП и СМП. У оба мишићна подслоја обе експерименталне групе, нервна влакна су присутна и бројна (слика 43.).



Слика 41. Ганглион мијентеричног плексуса (стрелица) између циркуларног (цм) и лонгитудиналног (лм) мишићног подслоја пилоруса желуца контролне групе. *NF-M* имунохистохемија x400.



Слика 42. Ганглион мијентеричног (МП) и субмукозног плексуса (стрелица) између циркуларног (цм) и лонгитудиналног (лм) мишићног подслоја проксималног колона контролне групе. *NF-M* имунохистохемија x200.



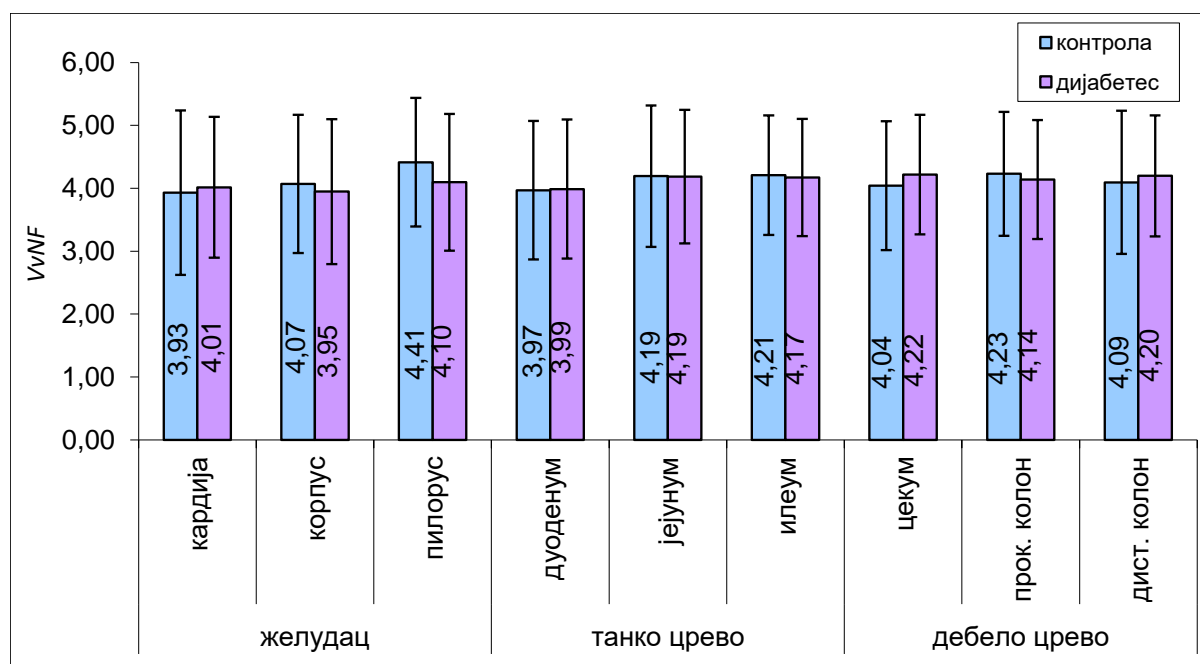
Слика 43. Нервне структуре ГИТ-а пацова; NF позитивни ганглион мијентеричног плексуса и нервна влакна (стрелице) **А)** пилоруса желуца ДМ групе, **Б)** пилоруса желуца контролне групе, **В)** проксималног колона ДМ групе, **Г)** проксималног колона контролне групе. *NF-M* имунохистохемија А-Г x200.

У табели 16. су приказане просечне вредности волуменске густине нервних структура контролне групе и групе са ДМ. Уочено је да нема статистички значајне разлике у заступљености нервних структура између група, као ни између различитих анатомских локализација ГИТ-а пацова унутар група ($F=0,004$ $n>0,05$ н.с). Просечне вредности волуменске густине *NF* позитивних нервних влакана контролне и ДМ групе пацова свих узоркованих сегмента ГИТ-а приказане су на графикону 6.

Табела 16. Волуменска густина (V_V) нервних влакана ГИТ-а пацова контролне и ДМ групе

група	регија ГИТ-а	N	X	SD	CV	Min	Max	ANOVA
контролне групе	кардија	12	3.93	1.31	33.22	1.872	5.705	F=0,765
	корпус	12	4.07	1.10	27.03	2.094	5.619	p=0,682
	пилорус	12	4.41	1.02	23.13	2.965	5.698	
	дуоденум	12	3.97	1.10	27.78	2.152	5.705	F=0,541
	јејунум	24	4.19	1.12	26.82	1.998	5.650	p=0,763
	илеум	24	4.21	0.95	22.58	2.569	5.698	
	цекум	12	4.04	1.02	25.36	2.672	5.872	F=0,714
	колон <i>prox.</i>	24	4.23	0.98	23.27	1.998	5.698	p=0,700
	колон <i>dist.</i>	24	4.09	1.14	27.84	1.934	5.637	
ДМ групе	кардија	12	4.01	1.12	27.90	2.118	5.601	F=0,149
	корпус	12	3.95	1.15	29.20	1.977	5.624	p=0,928
	пилорус	12	4.10	1.09	26.54	2.069	5.694	
	дуоденум	12	3.99	1.11	27.78	2.059	5.712	F=0,252
	јејунум	24	4.19	1.06	25.37	1.977	5.695	p=0,881
	илеум	24	4.17	0.93	22.34	2.069	5.694	
	цекум	12	4.22	0.95	22.52	2.499	5.712	F=0,050
	колон <i>prox.</i>	24	4.14	0.94	22.81	2.138	5.615	p=0,975
	колон <i>dist.</i>	24	4.20	0.96	22.95	1.937	6.012	

N -број узорака, X -средња вредност, SD -стандардна девијација, CV -коэффициент варијације



Графикон 6. Просечна волуменска густина NF позитивних влакана у ГИТ-у пацова.

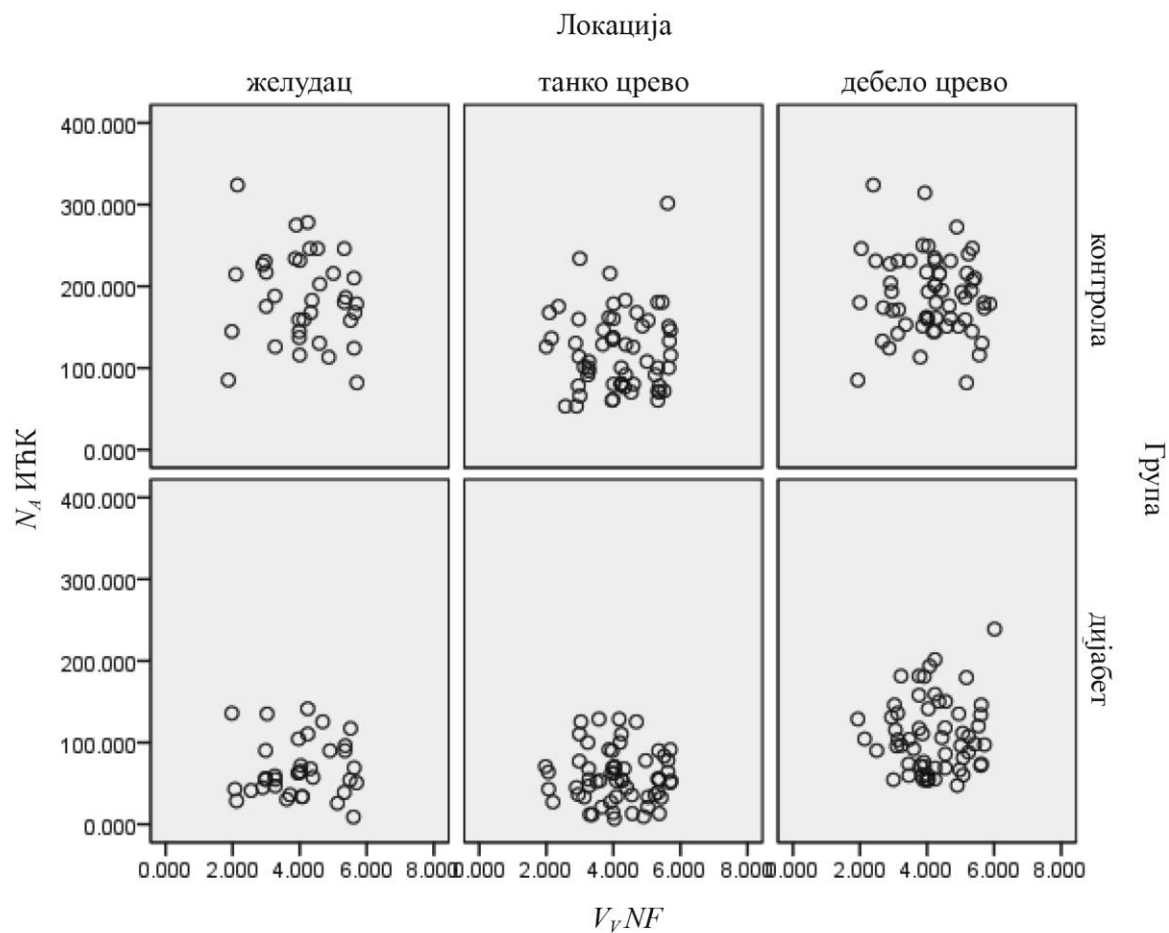
4.2.6. Корелација густине интерстицијалних ћелија Кахала са густином нервних структура контролне и експерименталне групе пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом

За утврђивање повезаности обележја густине ИТК (нумеричка ареална густина) и густине нервних структура (волуменска густина $NF-M$ позитивних нервних влакана) урађена је корелациона анализа *Spearman*-овим коефицијентом корелације. Резултати тестирања корелационе анализе приказани су на табели 17. Утврђено је да не постоји корелација густине нервних структура и густине ИТК у контролној и ДМ групи. Резултати корелационе анализе графички су приказана на графикону расипања 7.

Табела 17. Корелација просечних вредности нумеричке ареалне густине (N_A) ИЋК и волуменске густине (V_V) нервних структура различитих анатомских региона контролне и ДМ групе

група	регион ГИТ-а	Spearman's rho	N_A -ИЋК	N_A ИЋК-ИМЦ	N_A ИЋК-ИМЛ
контролна група	желудац	$V_V NF$ rho	-.013	-.028	-.069
		Sig.	.818	.617	.216
		N	319	319	319
	танко црево	$V_V NF$ rho	-.071	-.109	-.094
		Sig.	.206	.051	.093
		N	319	319	319
дебело црево	$V_V NF$ rho	-.007	-.002	-.035	
	Sig.	.895	.973	.538	
	N	316	316	316	
ДМ група	желудац	$V_V NF$ rho	.111*	.046	.088
		Sig.	.049	.412	.118
		N	318	318	318
	танко црево	$V_V NF$ rho	.026	.040	.012
		Sig.	.650	.484	.829
		N	311	311	311
дебело црево	$V_V NF$ rho	.028	-.075	-.019	
	Sig.	.618	.182	.729	
	N	320	320	320	

N -број корелираних узорака, rho - Spearman's rho



Графикон 7. Корелациона анализа нумеричке ареалне густине ИТК и волуменске густине нервних структура у различитим сегментима ГИТ-а контролне и ДМ групе.

5. ДИСКУСИЈА

5.1. ПРИСУСТВО, ДИСТРИБУЦИЈА И ГУСТИНА ИНТЕРСТИЦИЈАЛНИХ ЋЕЛИЈА КАХАЛА У ЗИДУ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА ПАЦОВА КОНТРОЛНЕ ГРУПЕ

На попречним и уздужним пресецима узорака свих анатомских локација ГИТ-а контролне групе, *C-kit* имунореактивне ћелије, које одговарају ИЋК-а, су присутне у циркуларном и лонгитудиналном мишићном подслоју, у пределу мијентеричног плексуса, а на субмукозној граници према мишићном слоју само у цекуму и колону. Поред ИЋК, присутни су и *C-kit* имунореактивни мастоцити, нарочито у мукози и субмукози ГИТ-а пацова, који се на основу морфологије, облика и присуства гранула лако разликују од ИЋК.

5.1.1. Интрамускулаторне интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе

Унутар циркуларног мишићног слоја доминантно је присутан интрамускуларни подтип ИЋК. ИЋК-ИМЦ су вретенастог облика, танког издуженог тела са два дуга цитоплазматска наставка који полазе са супротних полова ћелија, пружају се паралелно са околним глатко-мишићним ћелијама. Поједине ИЋК-ИМ су својим наставцима повезане са наставцима суседних ИЋК-ИМЦ, али без формирања упадљиве ћелијске мреже, осим у пределу циркуларног слоја кардије, пилоруса и цекума, где ИЋК-ИМ форирају дуге линеарне низове. Умрежавање ИЋК у овим сегментима ГИТ-а важно је за функционисање сфинктера желуца (доњи езофагеални сфинктер-кардија и пилорус) и илеоцекалне валвуле у цекуму јер усмерава садржај из проширеног цекума у правцу колоне. Густина ИЋК-ИМЦ контролне групе значајно је већа у кардији у односу на остале делове ГИТ-а. У кардији ИЋК-ИМ имају главну функцију у неуротрансмисији и потпомажу релаксацију доњег езофагеалног сфинктера (*Sivarao et al., 2001, Dixit et al., 2006*).

ИЋК-ИМЛ такође су издужене биполарне ћелије, са два цитоплазматска наставка који полазе са супротних крајева ћелије, али нигде у уздужном мишићном слоју није

уочено њихово међусобно умрежавање. Густина ИТК-ИМЦ је значајно већа у циркуларном мишићном слоју свих делова ГИТ-а у односу на густину ИТК-ИМЛ у лонгитудиналном подслоју. Оваква дистрибуција ИТК-ИМЦ и ИТК-ИМЛ подудара се са описаним подацима дистрибуције интрамукуларних подтипова ИТК код фетусног и адултног ГИТ-а човека и пацова (*Abramovic et al., 2014, Radenkovic and Abramovic, 2012, Radenkovic et al., 2010b, Komuro, 2006, Al-Shboul, 2013*). Чињеница да мањи, дискретни региони ткива пружају пејсмејкерску активност за веће одељке кружних и уздужних мишића могла би да објасни разлике у густини циркуларних и лонгитудиналних интрамукуларних ИТК. Наиме, Конор са сарадницима (*Connor et al., 1977*) је у дисекционим експерименталним студијама примтио да раздвајање циркуларног од лонгитудиналног мишићног слоја танког црева инактивише циркуларни мишић, док сам изолован уздужни мишић задржава активност. Аутори су закључили да спори таласи перисталтике настају у лонгитудиналном слоју, односно на граници циркуларног и лонгитудиналног мишићног подслоја, и бивају амплификовани и пропагирани кроз интрамукуларне ИТК. Такође, треба узети у обзир и чињеницу да је дебљина зида циркуларног подслоја већа од спољњег лонгитудиналног, па је самим тим потребан и већи број интрамукуларних ИТК за умножавање и пропагирање електричног таласа перисталтике.

5.1.2. Мијентеричне интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе

У окружењу мијентеричног плексуса присутне су звездасте, мултиполарне *C-kit* имунореактивне ћелије, чији се дугачки наставци међусобно повезују тако да, углавном, у потпуности окружују границе ганглиона мијентеричног плексуса. Ни тела ни цитоплазматски наставци ових ћелија не залазе унутар ганглиона МП. Ове ћелије по својој морфологији и локализацији одговарају ИТК-МП. Такође, око ганглиона МП, ИТК-МП формирају густу тродимензионалну мрежу својим цитоплазматским наставцима међусобно повезаних ћелија. Главна улога ИТК-МП је извор такозваних спорих таласа перисталтичке контракције, односно, улога пејсмејкера интризичних фазних контракција који су неопходни за нормално функционисање мотилитета ГИТ-а (*Sanders et al., 2014b*).

У субмукози узорака колона и цекума, на споју са унутрашњом површином кружног мишићног слоја, уочавају се *C-kit* имунореактивне ћелије, звездастог облика са два до три краћа цитоплазматска наставка, које су овде углавном груписане у линеарне низове од три до пет ћелија, а ређе појединачне. Ове ћелије одговарају по својој морфологији и локацији ИћК-СМП. ИћК-СМП показане су само у цекуму и колону, упркос чињеници да се СМП налази у ГИТ-у готово целом дужином, а овакви резултати се подударaju са описаним ИћК-СМП ГИТ-а пацова у литератури (*Tamada and Komuro, 2012*). ИћК-СМП су, поред пејсмејкерске улоге, укључене и у регулацију специфичних функција мукозе колона као што су секреција, абсорпција и транспорт течности (*Tamada and Komuro, 2011*).

5.1.3. Остали типови интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе

На узорцима ГИТ-а контролне групе пацова, такође су идентификоване *C-kit* имунореактивне ћелије у мишићним везивним септама, које су издужене, појединачне, оријентисане попреко у односу на уздужну осу глатко-мишићних ћелија. Ове ћелије одговарају ИћК-СЕР које имају краће наставке у односу на ИћК-ИМ. За разлику од ИћК-ИМ, није уочено њихово међусобно умрежавање. ИћК-СЕР присутне су у септама између мишићних снопова. Њихова улога је у кондукцији таласа деполаризације од ИћК-МП на мишићне снопове, односно на ИћК-ИМ, које формирају синцицијум са глатко-мишићним ћелијама. У узорцима из различитих делова ГИТ-а није било разлике у присуству и броју ИћК-СМП.

Такође, на узорцима ГИТ-а контролне групе пацова, уочене су *C-kit* имунореактивне ћелије на граници према серози, које су ретке, појединачне и издужене, и које одговарају сателитским ИћК-СС. Ове ћелије су описане у истраживањима Тунеберга и Вандервиндена (*Thuneberg, 1982, Vanderwinden et al., 2000*), али у литератури нема података о њиховој функцији.

У литератури су такође описане ИћК-дубоког мијентеричног плексуса, али, у овом истраживању, применом *C-kit* имунохистохемијске методе, те ћелије нису идентификоване.

5.1.4. Дистрибуција интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова контролне групе

Резултати испитивања дистрибуције ИЋК показују да су сви типови ИЋК, готово униформно распоређени у зиду танког и дебелог црева, а да једино у желуцу постоје регионалне разлике дистрибуције. Наиме, интрамукуларне ИЋК циркуларног и лонгитудиналног слоја су густо дистрибуиране кроз кружни и уздужни мишићни слој кардије, фундуса и дела корпуса желуца, док ИЋК-МП нису присутне у овом региону. ИЋК-МП се појављују у нижим деловима корпуса желуца, у антруму и пилорусу, док број интрамукуларних ИЋК (ИЋК-ИМЦ и ИЋК-ИМЛ) опада. Такође, ИЋК-МП су мање бројне и њихове целуларне мреже су релативно растресите и танке у корпусу и пилорусу желуца у односу на мрежу ИЋК око ганглиона МП колона. Оваква дистрибуција ИЋК подтипова у желуцу пацова подударна се са описаном дистрибуцијом ИЋК у литератури (Komuro, 2006). Кито (Kito, 2011) је саопштио да ИЋК-ИМ у корпусу желуца заморца, у коме нема ИЋК-МП, преузимају улогу пејсмејкера спорих таласа. Резултати дисертације показују да је највећа густина ИЋК у желуцу, а да највећи удео у томе имају ИЋК-ИМ циркуларног слоја у кардији и корпусу желуца. Хирст је са сарадницима (Hirst et al., 2002, Hirst and Edwards, 2006) приметио да су ИЋК-ИМ корпуса желуца способне да генеришу спонтане споре таласе високе фреквенце. Сматра се да активација гастричне мускулатуре потиче од ИЋК-ИМ, које генеришу корпусне споре таласе високе фреквенције и одређују доминантну фреквенцу таласа у желуцу. Спори таласи ИЋК-ИМ активирају мрежу ИЋК-МП одакле се спори таласи шире наниже, низ желудац, преносе се на мишићне снопове, изазивајући деполаризацију и иницијацију мишићне контракције. Талас деполаризација такође иницира одговор ИЋК-ИМ као регенеративни потенцијал у пропагацији таласа (Hirst and Edwards, 2006, Sanders et al., 2014b). Специфична дистрибуција ИЋК желуца и велика густина ИЋК-ИМ у корпусу желуца и кардији, која је уочена у истраживању, уклапа се у описан модел активације и пропагације мишићне контракције у желуцу.

Интрацелуларна сигнализација преко *C-kit* рецептора кључна је у развићу, одржавању фенотипа ИЋК и функције ИЋК у ГИТ-у. За одржавање ИЋК фенотипа неопходно је да *SCF*, кога локално продукују глатко-мишићне ћелије и нервни елементи у мишићном слоју, буде везан за мембрану ИЋК (Horvath et al., 2006). Комуро (Komuro, 2006) сматра да за ИЋК-МП пилоруса и ИЋК-СМП колона није

неопходана SCF сигнализација. Резултати докторске дисертације показују мању густину ИТК-МП пилоруса у односу на густину мреже ИТК-МП колона. У литератури нема експлицитног тумачења чињенице да су ИТК-МП пилоруса ређе присутне од ИТК-МП око ганглиона у дебелом цреву, али се сматра да су ИТК у региону сфинктера пилоруса, пре свега задужене за омогућавање адекватне неуротрансмисије, одржавање базалног тонуса и релаксације сфинктера, што је улога ИТК-ИМ подтипа, за разлику од ИТК-МП чија је главна улога извор спорих таласа контракције. У дебелом цреву густа мрежа ИТК-МП неопходна је за успостављање нормалних контракција мускулатуре која ће омогућити адекватну пропулзију садржаја црева (*Sanders et al., 2014b*), а томе у прилог иду резултати дисертације највеће густине ИТК-МП у колону.

Интрамускуларне ИТК танког црева нису издужене, вретенасте и густо дистрибуиране као ИТК-ИМ желуца и дебелог црева. У танком цреву ИТК-ИМ су ретко распоређене и стиче се утисак да се не умрежавају. Овакви резултати подударују се са налазима Хоригучија и Мазета о ИТК у ГИТ-у заморца и пса (*Horiguchi et al., 2001, Mazet and Raynier, 2004*). Тестирање просечних вредности нумеричке ареалне густине са свих узорака ГИТ-а контролне групе пацова показало је да се број ИТК значајно смањује у танком цреву, од пилоруса до илеума, у односу на желудац и дебело црево, и то на рачун смањења густине интрамускуларног подтипа ИТК. Разлике у броју ИТК-ИМЦ танког и дебелог црева могу се објаснити тиме што глатко-мишићне ћелије дебелог црева, које нису међусобно добро повезане комуникантним везама, примају нервне сигнале преко богате мреже ИТК-ИМ, односно, овде ИТК помажу „електричну“ комуникацију између глатко-мишићних ћелија. У танком цреву глатко-мишићне ћелије циркуларног подлоја су изузетно добро међусобно повезане пукотинастим спојевима, што су показали Секи и Комуро (*Seki et al., 1998, Seki and Komuro, 2002*) анализом експресије конексина 43 у комуникантним везама глатко-мишићних ћелија ГИТ-а заморца. Таква међусобна повезаност глатко-мишићних ћелија омогућава да глатко-мишићне ћелије у танком цреву функционишу као својеврсни синцицијум, па су у складу са тим, овде ИТК-ИМ малобројније јер не успостављају везе са сваком појединачном глатко-мишићним ћелијом. Такође, у танком цреву преганглијски неурони вагуса инервишу мање групе одређених мијентеричних неурона, за разлику од горњих партија ГИТ-а где су успостављене бројне везе са мијентеричним неуронима. Разлике у инервацији парасимпатичким преганглијским влакнима огледају се у томе да централни нервни систем има много

већи директан утицај на горње (једњак и желудац) и најдисталније (сигма и ректум) делове ГИТ-а, а знатно мање директно контролише функције танког црева и колона (*Berezin et al., 1990, Iino et al., 2004, Sanders, 2000*).

5.2. ПРИСУСТВО, ДИСТРИБУЦИЈА И ГУСТИНА

ИНТЕРСТИЦИЈАЛНИХ ЋЕЛИЈА КАХАЛА У РАЗЛИЧИТИМ СЕГМЕНТИМА ЗИДА ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОГ ТРАКТА ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ МЕЛИТУСОМ ИЗАЗВАНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИН-НИКОТИНАМИДОМ

5.2.1. Експериментални модел поремећаја толеранције глукозе и испитивање интерстицијалних ћелија Кахала

У коришћеном експерименталном моделу дијабетеса мелитуса, поремећај толеранције глукозе је индукован апликацијом две компоненте: стрептозотоцина (СТЗ) и никотинамида (НА). СТЗ је добро познат дијабетогени агенс који показује цитотоксичну активност према бета ћелијама инзула панкреаса, док се НА апликује пацовима да би се парцијално заштитиле β -ћелије панкреаса од токсичног дејства СТЗ-а. Предности оваквог анималног модела дијабетеса мелитуса, у односу на друге моделе дијабетеса из литературе, код којих је посматрана дистрибуција ИЋК (*Wang et al., 2009*), је у томе што је СТЗ-НА модел сличнији хуманом дијабетесу мелитусу тип II; експерименталне животиње показују умерену хипергликемију и не захтевају егзогену примену инсулина да би преживеле. Предности СТЗ-НА модела дијабетеса мелитуса у односу на СТЗ модел, приказане су и у скорашњем ревијалном раду Скуделског (*Szkudelski, 2012*), који потврђује подударност овог модела са хуманим дијабетесом мелитусом тип II. У досадашњој литератури нема података о испитивању ИЋК дистрибуције на СТЗ-НА моделу, због чега се резултати дисертације могу сматрати значајним доприносом у овој уској области истраживања. Такође, за разлику од СТЗ модела дијабетеса мелитуса, код СТЗ-НА пацова се не развија неуропатија, нити миопатија и атрофија глатко-мишићних ћелија као компликација дијабетеса мелитуса (*He et al., 2008, Touw et al., 2012, Takahashi et al., 1996, Lin et al., 2000*,

Moscoso et al., 1986). Глатко-мишићне ћелије заједно са нервима и ИЋК формирају функционални синцицијум неопходан за одржавање нормалне функције контракције ГИТ-а. Дијабетес изазива бројне компликације ГИТ-а, са последичним променама на свим ћелијским елементима овог физиолошког синцицијума, те је и разумевање патогенетског механизма дијабетесне гастроентеропатије комплексно. СТЗ-НА моделом поремећене толеранције глукозе могућа је контрола дијабетогеног оштећења нервних структура и глатко-мишићних ћелија код дијабетеса, што омогућава испитивње ИЋК независно од узрочно-последичних веза синцицијума.

У експерименталној групи пацова са стрептозотоцин-никотинамид изазваним дијабетесом мелитусом није било значајне разлике у телесној маси експерименталних животиња, за разлику од истраживања Ванга и сарадника (*Wang et al., 2009*), који су уочили губитак телесне масе на СТЗ-моделу. У групи пацова са дијабетесом мелитусом није уочена атрофија глатко-мишићних ћелија, нити је било разлике у дебљини мишићног зида у односу на контролну групу. Такође на свим узорцима ГИТ-а ДМ групе пацова нема знакова некрозе и апоптозе, нити знакова запљења (инфилтрација неутрофилима или лимфоцитима). Тестирање волуменске густине нервних структура показало је да нема разлике у густини нервних влакана, односно да се код ДМ групе пацова није развила неуропатија као компликација дијабетеса, за разлику од досадашњих истраживања ИЋК у дијабетесу мелитусу (*Wang et al., 2009, Ordog, 2008, Yarandi and Srinivasan, 2014*) у којима су забележене промене на нервима ГИТ-а.

5.2.2. Дистрибуција интерстицијалне ћелије Кахала у зиду гастроинтестиналног тракта пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом

У различитим анатомским локацијама ГИТ-а пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотоцин-никотинамидом сви ИЋК подтипови били су присутне у мишићном слоју. У циркуларном и лонгитудиналном мишићном слоју ИЋК-ИМЦ и ИЋК-ИМЛ су вретенастог облика, са два дуга цитоплазматска наставка који полазе са супротних полова издуженог тела ћелија, пружају се паралелно са околним глатко-мишићним ћелијама. ИЋК-ИМЦ су значајно бројније у циркуларном мишићном слоју свих делова ГИТ-а у односу на број ИЋК-ИМЛ у лонгитудиналном подслоју. Такође,

нема статистички значајне разлике у густини ИТК-ИМЛ између анатомских локализација ГИТ-а ДМ групе, док су просечне вредности нумеричке ареалне густине ИТК и ИТК-ИМЦ, и степен окружености ганглиона значајно веће у дебелом цреву, у односу на танко црево и желудац. Оваква дистрибуција подједнака је дистрибуцији у контролној групи пацова. Међутим сви параметри густине ИТК значајно су мањи код пацова са дијабетесом мелитусом у односу на контролну групу, што сугерише на функционалне промене перисталтике ГИТ-а у ДМ-у имајући у виду значај ИТК за одвијање нормалног мотилитета (*Sanders et al., 2014b, Ward et al., 2000, Hirst and Edwards, 2004*).

Код пацова са дијабетесом мелитусом долази до опадања степена умрежености свих ИТК подтипова. За разлику од контролне групе, ИТК-ИМ су ретке и не успостављају линеарну умреженост каква се виђа у кардији и пилорусу контролне групе. ИТК-ИМ су присутне као појединачне ћелије у кардији ДМ групе, а такође у неким узорцима запажају се такозвана „празна поља“ са потпуним изостанком *C-kit* имунореактивних ћелија. Имајући у виду улогу ИТК-ИМ, сматра се да је губитак ИТК-ИМ у циркуларном мишићном слоју кардије и пилоруса у вези са повишеним базалним тонусом и спонтаном активношћу доњег езофагеалног сфинктера и пилорусног сфинктера, што доприноси симптоматологији дијабетесне гастроентеропатије (*Farre et al., 2007*).

ИТК-МП су такође присутне у ДМ групи али знатно ређе у односу на контролну групу, оне не окружују ганглионе МП у потпуности, а примећени су и ганглиони МП који у својој околини имају само једну или ниједну ИТК-МП. Дистрибуција ИТК-МП у дебелом цреву ДМ групе на узорцима цекума, проксималног и дисталног колона, слична је као и у осталим деловима ГИТ-а, осим што је број ових ћелија значајно мањи, а њихово умрежавање је слабије присутно или изостаје.

У субмукози узорака из колона и цекума, на споју са унутрашњом површином кружног мишићног слоја, уочавају се ИТК-СМП, звездастог облика са два до три краћа цитоплазматска наставка, које су појединачне и нису у овим деловима ГИТ-а груписане у линеарне низове, за разлику од ИТК-СМП контролне групе. Такође, у већини узорака цекума и колона нема *C-kit* имунореактивних ИТК-СМП. Хуизинга и сарадници (*Huizinga et al., 2011*) су поставили хипотезу да је мрежа ИТК-МП у цревима неопходна за пропулзију, док мрежа ИТК-СМП служи за генерисање спорих

таласа перисталтике у дебелом цреву и потпомаже апсорпцију. Редукована популација ИћК-МП у дијабетесу мелитусу сматра се да је у вези са поремећеним споро-таласним перисталтичким покретима, одложеним гастричним пражњењем и спорим интестиналним транзитом (*Wang et al., 2009*).

С`обзиром на то да постоје значајне варијације дистрибуције ИћК-МП у ГИТ-у нормалних експерименталних животиња и човека, Интернационална радна група за гастроинтестиналне неуро-мускулаторне болести (ГИНМД) дала је смернице евалуације ИћК-МП (*den Braber-Ymker et al., 2016*). Евалуација ИћК-МП врши се оценом процента окружености ганглиона МП *C-kit* позитивним ћелијским наставцима (%МП). Радна група за ГИНМД дала је смернице по којима се губитак окружености ганглиона испод 50%, за биопсијске матерјале, и испод 30% за аутопсијске узорке танког црева, сматра абнормалним, а за дебело црево, вредности ниже од 10% сматрају се патолошким (због додатног присуства ИћК-СМП мреже у дебелом цреву) (*den Braber-Ymker et al., 2016*). Резултати докторске дисертације показали су значајан губитак ИћК-МП, испод 30%, у танком цреву ДМ групе, што несумњиво има утицаја на перисталтику имајући у виду функционални значај ИћК-МП, и предлоге Интернационалне радне групе за ГИНМД. Са друге стране, у дебелом цреву ДМ групе, иако су примећени ганглиони без ИћК-МП, тестирање укупних резултата степена окружености ганглиона МП показало је да су просечне вредности, статистички значајно мање него у контролној групи и крећу се од 24.95 ± 20.67 у цекуму, 38.78 ± 21.31 у проксималном колону и 33.55 ± 17.74 у дисталном колону, што је по ГИНМД радној групи недовољно за симптоматологију дисмотилитета дебелог црева. Поред тога, треба узети у обзир и налаз да у дебелом цреву пацова са ДМ нема „помоћне“ мреже ИћК коју у овом региону чине ИћК-СМП.

Ордог и сарадници (*Ordog et al., 2000*) су у својим истраживањима на *NOD* мишевима, који спонтано развијају дијабетс, показали да губитак густине ИћК-ИМ почиње у корпусу желуца и појачава се према антруму, захватајући углавном ИћК-МП. У преосталим ИћК-МП запажен је губитак контакта са ганглионима ЕНС-а. Иако су се у овим подручјима и даље јављали спори таласи, они су били ненормални у амплитуди, као и по фреквенцији, и нису се пропагирани кроз цео мишићни слоју желуца. У фундусу није постојао губитак ИћК-ИМ, али је постојао велики размак између ИћК-а и нервних влакана. Са друге стране, код 25 болесника са ДМ и раком желуца, који су били подвргнути гастректомији, проучавање желудачног ткива није

показало смањење ИТК-МП, већ само смањење ИТК-ИМ у унутрашњем кружном мишићном слоју (*Iwasaki et al., 2006*). Насупрот овим подацима, резултати дисертације показују дифузни губитак ИТК, који захвата подједнако све делове ГИТ-а, а највећи губитак ИТК запажен је у желуцу, захватајући подједнако и ИТК-ИМ и ИТК-МП.

Код пацијената са дијабетесом и пратећом гастропарезом, слично моделима на животињама, описане су промене у ЕНС-у, глатким мишићним ћелијама и смањење густине ИТК (*Pasricha et al., 2008, Forster et al., 2005, Iwasaki et al., 2006, Grover et al., 2011, Kim et al., 2012*). Добијене вредности нумеричке ареалне густине ИТК у узорцима пацова ДМ групе, подударају се са резултатима густине ИТК код пацијената са ДМ. Форстер и сарадници (*Forster et al., 2005*) су саопштили да на биопсијама желуца код 14 пацијената са гастропарезом, укључујући девет пацијената са ДМ, постоји смањење броја ИТК. Слични налази, губитак ИТК са преосталим оштећеним ИТК, приказани су у Гроверовој студији (*Grover et al., 2011*), где су испитивани узорци биопсије пуне дебљине зида желуца од 40 пацијената са гастропарезом, укључујући 20 пацијената са дијабетесом.

Смањена густина ИТК регистрована је и у другим деловима ГИТ-а у експерименталним моделима са дијабетесом, укључујући танко и дебело црево. За разлику од дијабетесне гастропарезе и истраживања ИТК у желуцу, који се могу наћи у литератури (*Wang et al., 2009, Ordog et al., 2000, Horvath et al., 2006, Yamamoto et al., 2008, Velickov et al., 2016*), студије које процењују ИТК код цревне дисфункције у дијабетесу мелитусу су ретке, између осталог и због потешкоћа у поступку истраживања и доступним дијагностичким методама. Штавише, досадашњи резултати су контрадикторни (*Forrest et al., 2008, Imaeda et al., 1998*), јер губитак или поремећај ИТК мреже често прате структурне и функционалне промене у неурвним и глатко-мишићним елементима. Јамамото и сар. (*Yamamoto et al., 2008*), користећи *db/db* модел дијабетеса мелитуса тип II, показали су смањен број ИТК у танком цреву и колону, поред желуца. Сличан ИТК губитак је примећен у танком цреву и колону дијабетесних животиња (*Lammers et al., 2011, Lin et al., 2010*). Поред тога, губитак *C-kit* позитивних интрамукуларних ИТК описан је у дебелом цреву код седам пацијената који су боловали од дијабетеса типа 2 и рака дебелог црева (*Nakahara et al., 2002*). Узорак добијен од 38-годишњег пацијента са 15-годишњом историјом слабо контролисаног дијабетеса и дијабетесном гастроентеропатијом показао је манифестно смањење густине ИТК у миентеричном региону и деплецију ИТК-ИМ целом дебљином јејунума (*He et*

al., 2001). Добијени резултати овог истраживања подударају се са описаним резултатима испитивања густине ИЋК у танком и дебелом цреву, али без промена на нервно-мишићним елементима, што је у супротности са подацима из литературе који износе подједнако оштећење нервно-мишићних елемената као пратеће патолошке промене код дијабетеса (Forrest et al., 2008, Imaeda et al., 1998, Yamamoto et al., 2008, Lin et al., 2010, Lammers et al., 2011, Nakahara et al., 2002, He et al., 2001). Ова чињеница указује и на узрочно-последичну хронологију настанка дијабетесне гастроентеропатије и даје значај функцији ИЋК као нераскидивог елемента физиолошког синцицијума мускулатуре.

5.2.3. Патопфизиолошки механизам дијабетесне гастроентеропатије због губитка интерстицијалних ћелија Кахала

Контрактилност глатко-мишићних ћелија измењена је у експерименталним животињским моделима са дијабетесом (који нису проучавали ИЋК). Миоцити изоловани из дигестивног тракта пацова са СТЗ-индукованим дијабетесом показали су повишену експресију *Na,K-ATP*-азе, што доводи до повишеног нивоа интрацелуларног Ca^{2+} (Touw et al., 2012). У истом моделу, интрацелуларни Ca^{2+} везујући протеин, калмодулин, и протеин киназа *C* у глатко-мишићним ћелијама су редуковани. Сличне промене јављају се и у експерименталном моделу спонтаног дијабетеса, сугеришући да ДМ мења контрактилност глатко-мишићних ћелија, мењајући интрацелуларне сигналне путеве интестиналних миоцита (Takahashi et al., 1996). Миопатија и атрофија гастричне мускулатуре приказана је у дијабетесу у ранијим истраживањима (Horvath et al., 2006, Moscoso et al., 1986). Такође, у студији са СТЗ-индукованим дијабетесом на мишевима, установљено је да је значајно редукована експресија киназе-миозинских лакних ланаца у глатко-мишићним ћелијама пилоруса и илеума (He et al., 2008, Hu and Feng, 2012), а значајна чињеница за потпуно објашњење механизма дејства дијабетеса на ИЋК, је и та што су ове промене реверзибилне код инсулинске терапије.

У резултатима докторске дисертације, промене у броју и умрежавању ИЋК нису праћене микроскопски уочљивим променама на неурвним влакнима и мишићним ћелијама, што указује да су прве промене које настају у дијабетесној гастроентеропатији управо промене на ИЋК. Узајамна повезаност и интерзависност

нерава, ИТК и глатко-мишићних ћелија која постоји током развића (*Radenkovic et al., 2017*), присутна је и адултно. За опстанак и функционисање ИТК неопходан је *SCF* секретован локално у мишићном слоју од стране нерава и мишићних ћелија, а са друге стране ИТК остварују контакте са глатко-мишићним ћелијама, модулишу и преносе им нервне сигнале; остварују контакте са неуронима ЕНС-а и генеришу таласе перисталтичких покрета. Могуће је да доказана поремећена интарцелуларна сигнализација глаткомишићних ћелија везана за киназу лакних ланаца миозина, или концентрација Ca^{2+} у дијабетесу, утиче и на продукцију *SCF*. Губитак густине ИТК у дијабетесу, настаје због смањења *SCF*, несумљиво утиче на контрактилност глатко-мишићних ћелија и појаву неадекватне перисталтике која се манифестује као гастропареза, успорен интестинални транзит, констипација, дијареја и фекална инконтиненција, дисфагија, горушица, абдоминална нелагодност или бол, мучнина и повраћање (*Yarandi and Srinivasan, 2014*).

ИТК представљају независни извор споро-таласних перисталтичких покрета ГИТ-а, а такође су и важан део неуротрансмисије између моторних неурона, еферентних влакана аутономног нервног система и мишићних ћелија. Претпоставља се да и ексцитаторна и инхибиторна неуротрансмисија између ентеричких неурона и глатких мишића зависи од присуства ИТК-ИМ. Морфолошки гледано, терминали завршеци ентеричких моторних неурона формирају синапси-сличне контакте са ИТК (*Ward et al., 2006, Ward and Sanders, 2006, Beckett et al., 2005*). Показано је да ИТК-ИМ деполаризују глатке мишиће кроз пукотинасте спојеве, након што се ацетилхолин, ослобађен од ентеричних моторних неурона веже за *Ach* рецепторе на ИТК (*Ward et al., 2000*). Модулаторна улога ИТК-ИМ такође је приказана у ексцитаторној неуротрансмисији, уз помоћ супстанце *P* и неурокинина, ослобођених из ентеричних моторних неурона (*Iino et al., 2004*). Што се тиче инхибиторне неуротрансмисије, ИТК-ИМ играју важну улогу у неуротрансмисији зависној од азот-(II)-оксида (NO) у доњем езофагеалном сфинктеру и пилорусним сфинктерима. Претпоставља се да су ИТК-ИМ ефектори који претварају NO сигнале у хиперполаризирајуће одговоре и на тај начин модулирају и омогућавају опуштање сфинктера. Експериментални мутирани модел миша без ИТК-ИМ не показује никакав доказ о нитринергичкој трансмисији (*Ward et al., 1998*), што доводи до повишеног базалног тонуса у сфинктерима кардије и пилоруса. Можемо закључити да губитак подтипова ИТК-ИМ, који је уочен у овом истраживању, омета неуротрансмисију и утиче на симптоматологију дијабетесне

гастроентеропатије, у смислу поремећене функције релаксације сфинктера у пределу кардије и пилоруса. Посебно, смањење ИТК-ИМЦ подтипа кроз цео ГИТ пацова, ометајући неуротрансмисију, додатно компромитује већ поремећен мотилитет изазван неадекватном пејсмејкерској активности редукованих ИТК-МП подтипа. Ови резултати су у складу са истраживањима Ванга и сарадника (*Wang et al., 2009*) који описују и губитак нервних влакана, због губитка ИТК-ИМ, и парцијално смањење синапси-сличних веза са ИТК-ИМ. Међутим, још увек остаје отворено питање о степену неуротрансмисије која се дешава преко ИТК и њеног утицаја на мотилитет ГИТ-а, с обзиром на то да је заступљеност ИТК далеко мања него популација глатко-мишћних ћелија у ГИТ-у, и да се још увек не зна да ли се неуротрансмисија одвија само преко ИТК. Губитак броја ИТК код дијабетеса утиче на мотилитет ГИТ-а, нарочито због смањења броја ИТК-ИМ које су укључене у неуротрансмисију, али и због промена пејсмејкерске активности, као последице губитка ИТК-МП. Ови налази наглашавају важност ИТК и истичу да промене ИТК које се јављају код дијабетеса, су један од главних фактора у развоју неуропатије ГИТ-а.

5.3. МЕХАНИЗМИ НАСТАНКА ПРОМЕНА ИНТЕРСТИЦИЈАЛНИХ ЋЕЛИЈА КАХАЛА ИНДУКОВАНИХ ДИЈАБЕТЕСОМ МЕЛИТУСОМ

Дијабетес мелитус значајно мења микроколину ИТК, што доводи до смањеног преживљавању ових ћелија. Промене ИТК код дијабетеса мелитуса могу потенцијално произићи из хипергликемије и удруженог оксидативног стреса, смањења сигнализације инсулином и инсулину сличном фактору раста (*IGF-1*), аутоимунског одговора или њихових комбинација, као резултат неравнотеже између фактора који оштећују и фактора који регенеришу и одржавају ИТК (*Ordog, 2008, Huizinga and Lammers, 2009*).

Повећани оксидативни стрес, повезан са хипергликемијом, очекивани је резултат у експерименталним студијама које проучавају механизме дијабетеса мелитуса. Такође, описан је повећани оксидативни стрес у студији са *NOD* мишевима и гастропарезом. Заједно са оксидативним стресом и пратећом редукцијом неуралне NO синтазе, изазване дијабетесом мелитусом, долази и до редукције хем оксигеназе-1 (НО-1) (*Choi et al., 2007a*). Сматра се да су неурална NO-синтаза и хем оксигеназе-1

потенцијално цитопротективни фактори преживљавања ИТК (*Choi et al., 2007a*). NO-1 се регулише углавном у макрофагима који се налазе близу ИТК и ентеричких живаца. Поред тога, доказано је да NO-1 повећава експресију *C-kit-a* и неуралне NO синтазе и утиче на боље пражњење желуца код експерименталних животиња (*Choi et al., 2008*).

У недавним студијама које су испитивале губитак ИТК код *NOD* мишева показало се да само хипергликемија није довољна да делује на ИТК и утиче на њихове промене. Хорват и сарадници (*Horvath et al., 2005*) сматрају да редукција *IGF-1* и инсулинска сигнализација код дијабетеса играју главну улогу у смањеном преживљавању ИТК. У нашој недавно публикованој студији (*Velickov et al., 2016*) приказан је губитак ИТК код умерене хипергликемије, при чему третман антиоксидансима, који је нормализовао хипергликемију, није имао ефекта на побољшање губитка ИТК; што сугерише на то да хипергликемија није главни узрок промена и губитка ИТК. Студија Хорвата и сарадника (*Horvath et al., 2005*) показала је губитка ИТК и нервних структура због одсуства фактора раста, у складу са метаболичким оштећењем код дијабетеса, а поред тога инсулин и *IGF-1* су у потпуности спречили губитак ИТК у култури ћелија мишићног ткива желуца миша. ИТК су показале бољу толеранцију у погледу одржавања густине у условима хипергликемије, у односу на нормогликемију у којој нема инсулинских или *IGF-1* суплемената (*Horvath et al., 2005*). Инсулин и *IGF-1* имају главну улогу у очувању ИТК, иако, ИТК немају рецептор за инсулин нити за *IGF-1*, већ је за њихов опстанак и функцију неопходан сигнални пут преко *SCF* рецептора. Са друге стране, *SCF* производе глаткомишићне ћелије и ентерични неурони који имају рецепторе за инсулин и *IGF-1* и индиректно посредују у деловању инсулина и *IGF-1* на ИТК (*Horvath et al., 2005, Ordog et al., 2000*). Сматра се да је за опстанак ИТК неопходан *SCF* кога секретују глатко-мишићне ћелије и неурони као одговор на инсулин и *IGF-1*. Показано је да губитак инсулина утиче на редуковање неурона ЕНС-а као и на миопатске промене глатко-мишићних ћелија ГИТ-а, и последично редуковање продукције *SCF* и броја ИТК код дуготрајног ДМ (*Horvath et al., 2006*). Резултати дисертације показују да није дошло до развоја видљивих неуропатких компликација дијабетеса, нити мишићне атрофије код пацова ДМ групе, што сугерише да би се губитак ИТК могао објаснити губитком сигналног пута инсулин-*SCF*. Нервне структуре са мишићима и ИТК, који су хистофизиолошка основа перисталтике, показују реципрочну међузависност и током ембрионалног развића (*Radenkovic et al.,*

2017) и у адултном ГИТ-у. Због тога је предложена међузависност између ИТК, придружених нервних влакана и глетко-мишичних ћелија, како је сугерисано у студијама о ИТК-ИМ и вагалним аферентним нервима код животињских модела (*Huizinga et al., 2008a, Powley et al., 2008*) и пацијената (*Iwasaki et al., 2006*). Добијени резултати истраживања указују на чињеницу да се у дијабетесу мелитусу промене ИТК јављају пре појаве микроскопски видљивих промена на нервима и мишићима.

Још један механизам дејства ДМ на ИТК може бити и аутоимуни одговор. Ћелије имуног система могу учествовати у дегенеративним променама ИТК. Узрок дијабетеса тип 1 је аутоимуна деструкција инсулоцита, а исти аутоимуни процес може такође да утиче на ћелије МИН синцицијума ГИТ-а и развој аутономне неуропатије (*Vinik et al., 2005*). Анти-*Kit* аутоантитела и последично губитак ИТК, пронађени су код пацијента са интестиналном псеудоопструкцијом и паранеопластичком гастропарезом (*Pardi et al., 2002*), али слична аутоантитела нису пронађена код дијабетеса мелитуса (*Ordog, 2008*). Поред тога, у овом истраживању нису пронађени знаци апоптозе компоненти МИН-а или лимфоцитне и неутрофилне инфилтрације, али су уочени бројни мастоцити. Мастоцити су нарочито присутни подједнако код обе експерименталне групе, у слузокожи између жлезди и у везивном ткиву субмукозе. У студијама Кронове болести и ахалазије код човека, запажен је близак контакт између „повређених“ ИТК и мастоцита (*Zarate et al., 2006, Wang et al., 2007*). У овим радовима аутори су предложили хипотезу да су мастоцити улључени у очување ИТК и опоравак као одговор на секретоване факторе раста. Међутим, иако се у резултатима ове дисертације уочава већи број мастоцита, подједнако у обе експерименталне групе, код пацова ДМ групе дошло је до губитка густине ИТК, што сугерише да у ДМ долази до поремећаја фактора раста секретованих од стране мастоцита који би утицали на очување ИТК. Треба напоменути да у литератури нема радова у којима су анализирани и мастоцити и ИТК у дијабетесу мелитусу.

Затим, немогуће је у потпуности искључити стрес и стресогене факторе околине и њихов утицај на експерименталне животиње. Пацови ДМ-групе су изложени стресу који може бити додатни фактор целуларних промена, али ови стресогени фактори су заједнички и подједнаки за све експерименталне животиње, и за контролну групу која је уместо СТЗ-НА апликације добијала плацебо.

Има података у литератури који се односе на смањење или потпуни губитак ИТК у стањима оклузије црева, исхемијско-реперфузионог оштећења, инфламације и инфекције. Губитак ИТК може настати због гашења *C-kit* експресије и трансдиференцијације ИТК у глатко-мишићне ћелије или фибробласте, или због апоптозе ИТК (*Faussone-Pellegrini et al., 2006*). Иако је апоптоза, као узрок нестанка ИТК, доказана експериментално (*Mei et al., 2009*), тек је недавно показано да се она дешава и у хуманом ГИТ-у (*Gibbons et al., 2009*). Чанг и сарадници (*Chang et al., 2001*) су објавили да након експериментално изазване парцијалне оклузије илеума мишева долази до смањења броја ИТК-МП, проксимално од места оклузије, са нарушавањем мреже ИТК и последичним дисмотилитетом црева. Дистално од места оклузије промене нису уочене. Шимоима и сарадници (*Shimajima et al., 2006*) и Сузуки и сарадници (*Suzuki et al., 2008*) су показали у експерименту на пацовима да након исхемијско-реперфузионе повреде танког црева долази до смањења *C-kit* позитивних ћелија око МП (ИТК-МП) дванаест сати после исхемијског реперфузионог оштећења, уз обнављање *C-kit* позитивности након четири дана. Лоу и Ли (*Lou and Li, 2009*) су описали значајно смањење ИТК-МП у илеуму пацова као последици абдоминалне сепсе и илеуса индукованог интраабдоминалном хипертензијом. Промене броја и састава цревне микрофлоре могу да покрену инфламаторну реакцију, посредством макрофага у мишићном слоју црева, који су локализовани у непосредној близини ИТК-МП. Ослобађање проинфламаторних цитокина и хемокина негативно утиче на број и функцију оближњих ИТК, доводећи до оштећења њихове мреже и поремећаја функције (*Suzuki et al., 2004*). Престанком деловања штетне ноксе може доћи до опоравка броја ИТК и поновног успостављања њихове мреже. Доказана су два механизма обнове ИТК. Један је диферентовање из мале групе ћелија са слабом *C-kit* имунореактивношћу (*CD 117+*), и израженом *CD 44+*, *CD 34+* имунореактивношћу, који може представљати извор прекурсорских ћелија за обнову ИТК (*Mei et al., 2009*). Други механизам је пролиферација, и постоје докази да *SCF*, *NO* из неурона, серотонин (преко 5HT₂8 рецептора) и хем оксигеназа-1, могу да индукују пролиферацију ИТК (*Farrugia, 2008*). Такође, могућа је и поновна редиференцијација у ИТК из оних ћелија које су измениле фенотипске карактеристике због гашења *C-kit* рецептора, након успостављања *C-kit* имунореактивности под утицајем *SCF-a*, на шта су указали Тонг и сарадници (*Tong et al., 2010*).

Важност функције ИТК постаје све очигледнија код дијабетесних гастроинтестиналних дисмотилитета, а аутономна неуропатија се више не сматра јединим узроком дијабетесне гастроентеропатије. ИТК алтерације су повезане са поремећајем гастроинтестиналног мотилитета код дијабетеса, попут смањене и аритмичне спороталасне пејсмејкерске активности, смањеног мишићног одговора на активацију ентеричних моторних неурона, одложено желудачно пражњење, гастропареза, спора пасажа кроз колон (*Ordog et al., 2000, Choi et al., 2008*). Механизам ИТК поремећаја је мултифакторијалан и интеракција између ових фактора је сложена. Патогенеза губитка ИТК укључује повећање оксидативног стреса, смањење фактора раста, промену интрацелуларних сигналних путева и регулаторних фактора. Сваки од наведених фактора могао би бити основа испитивања потенцијалне терапије код дијабетесне гастроинтестиналне неуропатије.

Ипак, поставља се питање да ли се неуротрансмисија може ослањати искључиво на ИТК и који је степен улоге ИТК у неуротрансмисији; број ИТК је знатно нижи од броја глаткомишићних ћелија и представља свега 5% слоја мишића. Супротно животињским моделима, постоје потешкоће у истраживању дистрибуције, функције и промена ИТК мреже у људском ткиву. ИТК се не могу проценити након рутинског узорковања, јер су биопсије ГИТ-а обично ограничене на мукозни и субмукозни слој, а добијање контролних узорака из анатомски идентичних региона је готово немогуће. Штавише, увођење ових налаза у клиничка испитивања престављало би изазов. На пример, показано је да оксидативни стрес игра важну улогу у ДМ ентеропатији (*Kashyap and Farrugia, 2011*), али употреба третмана антиоксидансима није показала ефикасан заштитни ефекат на ИТК и поред позитивног ефекта на успостављање нормогликемије (*Golbidi et al., 2011, Velickov et al., 2016*).

Промене дистрибуције, густине и морфологије ИТК код дијабетеса мелитуса експерименталних животиња свакако доприносе гастроинтестиналним симптомима неуропатске ентеропатије, али тачан механизам настанка алтерација ИТК још увек није у потпуности разјашњен, посебно код човека.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата докторске дисертације из истраживања интерстицијалних ћелија Кахала у ГИТ-у пацова са дијабетесом мелитусом изазваним стрептозотацин-никотинамидом донети су следећи закључци:

1. Интерстицијалне ћелије Кахала (ИЋК) присутне су у циркуларном и лонгитудиналном мишићном слоју, око ганглиона мијентеричног плексуса и у субмукозном региону гастроинтестиналног тракта (ГИТ) контролне групе пацова и групе пацова са стрептозотацин-никотинамид изазваним дијабетесом мелитусом (ДМ). Забележено је и присуство појединачних ИЋК у везиву мишићног слоја и у субсерози, али са великим регионалним разликама.

2. Уочени су сви подтипови ИЋК у контролној групи и групи пацова са дијабетесом мелитусом који показују различита морфолошка својства, а најважнији су следећи подтипови:

- **ИЋК-ИМ** су биполарне ћелије са два дуга цитоплазматск наставка који полазе са супротних крајева ћелије, а постављене су паралелно уздужној оси глатко-мишићних ћелија. ИЋК-ИМ танког црева су искључиво појединачне, док се у кардији, пилорусу и цекуму уочава њихово удруживање, преко цитоплазматских наставка, у линеарне низове повезаних ћелија. Густина ИЋК-ИМ кружног мишићног слоја значајно је већа од густине ИЋК-ИМ уздужног мишићног слоја.
- **ИЋК-МП** су мултиполарне ћелије са 3-5 цитоплазматских наставка којима се ћелије међусобно повезују у тродимензионалну мрежу око ганглиона мијентеричног плексуса.
- **ИЋК-СМП** су мултиполарне ћелије повезане у линеарне низове присутне само у дебелом цреву на граници субмукозе и мишићног слоја.

3. ИЋК контролне групе пацова показују разлике у дистрибуцији и заступљености, у односу на анатомске сегменте ГИТ-а:

- У **желуцу**, просечне вредности нумеричке ареалне густине ИЋК (N_A -ИЋК), интрамукуларног ИЋК подтипа (N_A -ИЋК-ИМЦ, и N_A -ИЋК-ИМЛ), значајно су

веће у кардији, у поређењу са корпусом и пилорусом. Степен окружености ганглиона мијентеричног плексуса ћелијама ИЋК-МП подтипа повећава се од корпуса према пилорусу, док су ИЋК-МП у кардији одсутне.

- **У танком цреву** густина ИЋК-ИМ и ИЋК-МП значајно је мања него у желуцу и дебелом цреву.
- **У дебелом цреву** густина ИЋК-МП подтипа значајно је већа него у желуцу и танком цреву. Степен окружености ганглиона мијентеричног плексуса ћелијама ИЋК-МП подтипа је велики. Број ИЋК-ИМ подтипа сличан је као у кардији.

4. Густина укупних ИЋК, као и густина ИЋК-ИМ и ИЋК-МП подтипова код пацова са дијабетесом мелитусом, значајно је мања у односу на контролну групу, у свим анатомским сегментима ГИТ-а.

5. Густина интрамукуларних подтипова ИЋК у сфинктерима (кардија-доњи езофагеални сфинктер и пилорус) пацова са дијабетесом мелитусом значајно је мања, у поређењу са контролном групом, а присутан је и дисконтинуитет линеарне умрежености и прекид контакта између ИЋК-ИМЦ подтипа.

6. ИЋК-МП подтипа код пацова са дијабетесом мелитусом не окружују ганглионе мијентеричног плексуса у потпуности, или изостају, и такође, за разлику од контролне групе пацова, ИЋК-СМП подтипа у колону пацова са дијабетесом мелитусом ретко су присутне и нису међусобно повезане, или их нема.

7. Не постоји статистички значајна разлика густине нервних влакана између контролне групе пацова и пацова са дијабетесом мелитусом.

8. Не постоји корелација између параметара густине ИЋК и густине нервних влакана ГИТ-а код контролне групе и код пацова са дијабетесом мелитусом.

9. Дијабетес мелитус доводи до промена у морфологији, организацији и регионалној дистрибуцији интерстицијалних ћелија Кахала у гастроинтестиналном тракту пацова.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Abramovic, M., Radenkovic, G. & Velickov, A. 2014. Appearance of interstitial cells of Cajal in the human midgut. *Cell Tissue Res*, 356, 9-14.
- Al-Shboul, O. A. 2013. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract. *Saudi J Gastroenterol*, 19, 3-15.
- Bagyanszki, M. & Bodi, N. 2012. Diabetes-related alterations in the enteric nervous system and its microenvironment. *World J Diabetes*, 3, 80-93.
- Beckett, E. A., Horiguchi, K., Khoyi, M., Sanders, K. M. & Ward, S. M. 2002. Loss of enteric motor neurotransmission in the gastric fundus of SI/SI(d) mice. *J Physiol*, 543, 871-87.
- Beckett, E. A., Ro, S., Bayguinov, Y., Sanders, K. M. & Ward, S. M. 2007. Kit signaling is essential for development and maintenance of interstitial cells of Cajal and electrical rhythmicity in the embryonic gastrointestinal tract. *Dev Dyn*, 236, 60-72.
- Beckett, E. A., Takeda, Y., Yanase, H., Sanders, K. M. & Ward, S. M. 2005. Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *J Comp Neurol*, 493, 193-206.
- Berezin, I., Huizinga, J. D., Farraway, L. & Daniel, E. E. 1990. Innervation of interstitial cells of Cajal by vasoactive intestinal polypeptide containing nerves in canine colon. *Can J Physiol Pharmacol*, 68, 922-32.
- Boulton, A. J., Vinik, A. I., Arezzo, J. C., Bril, V., Feldman, E. L., Freeman, R., Malik, R. A., Maser, R. E., Sosenko, J. M. & Ziegler, D. 2005. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 28, 956-62.
- Burns, A. J., Champeval, D. & Le Douarin, N. M. 2000. Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev Biol*, 219, 30-43.
- Burns, A. J., Delalande, J. M. & Le Douarin, N. M. 2002. In ovo transplantation of enteric nervous system precursors from vagal to sacral neural crest results in extensive hindgut colonisation. *Development*, 129, 2785-96.
- Burns, A. J., Lomax, A. E., Torihashi, S., Sanders, K. M. & Ward, S. M. 1996. Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 12008-13.
- Cajal, S. 1893. Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. Paris: C R Soc Biol.
- Cajal, S. 1911. *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres*, Paris, Maloine.
- Camilleri, M. 2007. Clinical practice. Diabetic gastroparesis. *N Engl J Med*, 356, 820-9.
- Carlson, M. 2004. *Human Embriology and Developmental Biology.*, St Louis, Mosby.

- Chang, I. Y., Glasgow, N. J., Takayama, I., Horiguchi, K., Sanders, K. M. & Ward, S. M. 2001. Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction. *J Physiol*, 536, 555-68.
- Chen, H., Redelman, D., Ro, S., Ward, S. M., Ordog, T. & Sanders, K. M. 2007. Selective labeling and isolation of functional classes of interstitial cells of Cajal of human and murine small intestine. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C497-507.
- Chen, J. D., Lin, Z., Pan, J. & Mccallum, R. W. 1996. Abnormal gastric myoelectrical activity and delayed gastric emptying in patients with symptoms suggestive of gastroparesis. *Dig Dis Sci*, 41, 1538-45.
- Chen, Z. H., Zhang, Y. C., Jiang, W. F., Yang, C., Zou, G. M., Kong, Y. & Cai, W. 2014. Characterization of interstitial Cajal progenitors cells and their changes in Hirschsprung's disease. *PLoS One*, 9, e86100.
- Choi, K. M., Gibbons, S. J., Nguyen, T. V., Stoltz, G. J., Lurken, M. S., Ordog, T., Szurszewski, J. H. & Farrugia, G. 2008. Heme oxygenase-1 protects interstitial cells of Cajal from oxidative stress and reverses diabetic gastroparesis. *Gastroenterology*, 135, 2055-64, 2064 e1-2.
- Choi, K. M., Gibbons, S. J., Roeder, J. L., Lurken, M. S., Zhu, J., Wouters, M. M., Miller, S. M., Szurszewski, J. H. & Farrugia, G. 2007a. Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. *Neurogastroenterol Motil*, 19, 585-95.
- Choi, K. M., Zhu, J., Stoltz, G. J., Vernino, S., Camilleri, M., Szurszewski, J. H., Gibbons, S. J. & Farrugia, G. 2007b. Determination of gastric emptying in nonobese diabetic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G1039-45.
- Conklin, J. L. & Du, C. 1990. Pathways of slow-wave propagation in proximal colon of cats. *Am J Physiol*, 258, G894-903.
- Connor, J. A., Kreulen, D., Prosser, C. L. & Weigel, R. 1977. Interaction between longitudinal and circular muscle in intestine of cat. *J Physiol*, 273, 665-89.
- Costa, M. 2006. All together now: from pacemakers to gastric peristalsis. *J Physiol*, 571, 1.
- Costa, M., Brookes, S. J. & HENNIG, G. W. 2000. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, 47 Suppl 4, iv15-9; discussion iv26.
- De Lorijn, F., De Jonge, W. J., Wedel, T., Vanderwinden, J. M., Benninga, M. A. & Boeckxstaens, G. E. 2005. Interstitial cells of Cajal are involved in the afferent limb of the rectoanal inhibitory reflex. *Gut*, 54, 1107-13.
- Den Braber-Ymker, M., Heijker, S., Lammens, M. & Nagtegaal, I. D. 2016. Practical and reproducible estimation of myenteric interstitial cells of Cajal in the bowel for diagnostic purposes. *Neurogastroenterol Motil*, 28, 1261-7.

- Dickinson, D. P., Machnicki, M., Ali, M. M., Zhang, Z. & Sohal, G. S. 2004. Ventrally emigrating neural tube (VENT) cells: a second neural tube-derived cell population. *J Anat*, 205, 79-98.
- Dixit, D., Zarate, N., Liu, L. W., Boreham, D. R. & Huizinga, J. D. 2006. Interstitial cells of Cajal and adaptive relaxation in the mouse stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291, G1129-36.
- Eroschenko, V. P. 1996. *Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*, Baltimore-Tokyo, Williams & Wilkins.
- Farre, R., Wang, X. Y., Vidal, E., Domenech, A., Pumarola, M., Clave, P., Huizinga, J. D. & Jimenez, M. 2007. Interstitial cells of Cajal and neuromuscular transmission in the rat lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil*, 19, 484-96.
- Farrugia, G. 2008. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil*, 20 Suppl 1, 54-63.
- Faussone-Pellegrini, M. S. & Cortesini, C. 1985. The muscle coat of the lower esophageal sphincter in patients with achalasia and hypertensive sphincter. An electron microscopic study. *J Submicrosc Cytol*, 17, 673-85.
- Faussone-Pellegrini, M. S., Cortesini, C. & Romagnoli, P. 2013. The ultrastructure of the muscle coat of human gastro-oesophageal junction, with special reference to "interstitial cells of Cajal". *Front Neurosci*, 7.
- Faussone-Pellegrini, M. S., Vannucchi, M. G., Alaggio, R., Strojna, A. & Midrio, P. 2007. Morphology of the interstitial cells of Cajal of the human ileum from foetal to neonatal life. *J Cell Mol Med*, 11, 482-94.
- Faussone-Pellegrini, M. S., Vannucchi, M. G., Ledder, O., Huang, T. Y. & Hanani, M. 2006. Plasticity of interstitial cells of Cajal: a study of mouse colon. *Cell Tissue Res*, 325, 211-7.
- Faussone Pellegrini, M. S., Cortesini, C. & Romagnoli, P. 1977. [Ultrastructure of the tunica muscularis of the cardiac portion of the human esophagus and stomach, with special reference to the so-called Cajal's interstitial cells]. *Arch Ital Anat Embriol*, 82, 157-77.
- Forrest, A., Huizinga, J. D., Wang, X. Y., Liu, L. W. & Parsons, M. 2008. Increase in stretch-induced rhythmic motor activity in the diabetic rat colon is associated with loss of ICC of the submuscular plexus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, G315-26.
- Forster, J., Damjanov, I., Lin, Z., Sarosiek, I., Wetzel, P. & McCallum, R. W. 2005. Absence of the interstitial cells of Cajal in patients with gastroparesis and correlation with clinical findings. *J Gastrointest Surg*, 9, 102-8.

- Fujita, A., Takeuchi, T., Saitoh, N., Hanai, J. & Hata, F. 2001. Expression of Ca(2+)-activated K(+) channels, SK3, in the interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281, C1727-33.
- Furness, J. B. 2012. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9, 286-94.
- Garcia-Lopez, P., Garcia-Marin, V., Martinez-Murillo, R. & Freire, M. 2009. Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal. *Brain Res Rev*, 61, 154-69.
- Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. 2014. *Color Atlas and Text of Hystology 6-th ed.*, Baltimore, Walters Kluwer and Lippincot Williams&Wilkins.
- Gianino, S., Grider, J. R., Cresswell, J., Enomoto, H. & Heuckeroth, R. O. 2003. GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development*, 130, 2187-98.
- Giaroni, C., De Ponti, F., Cosentino, M., Lecchini, S. & Frigo, G. 1999. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology*, 117, 1438-58.
- Gibbons, S. J., De Giorgio, R., Fausone Pellegrini, M. S., Garrity-Park, M. M., Miller, S. M., Schmalz, P. F., Young-Fadok, T. M., Larson, D. W., Dozois, E. J., Camilleri, M., Stanghellini, V., Szurszewski, J. H. & Farrugia, G. 2009. Apoptotic cell death of human interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil*, 21, 85-93.
- Gockel, I., Bohl, J. R., Eckardt, V. F. & Junginger, T. 2008. Reduction of interstitial cells of Cajal (ICC) associated with neuronal nitric oxide synthase (n-NOS) in patients with achalasia. *Am J Gastroenterol*, 103, 856-64.
- Golbidi, S., Ebadi, S. A. & Laher, I. 2011. Antioxidants in the treatment of diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 7, 106-25.
- Gomez-Pinilla, P. J., Gibbons, S. J., Bardsley, M. R., Lorincz, A., Pozo, M. J., Pasricha, P. J., Van De Rijn, M., West, R. B., Sarr, M. G., Kendrick, M. L., Cima, R. R., Dozois, E. J., Larson, D. W., Ordog, T. & Farrugia, G. 2009. Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G1370-81.
- Goyal, R. K. 2000. Targets of enteric motor neurones: smooth muscle cells. *Gut*, 47 Suppl 4, iv38-9; discussion iv52.
- Goyal, R. K. & Hirano, I. 1996. The enteric nervous system. *N Engl J Med*, 334, 1106-15.
- Grover, M., Farrugia, G., Lurken, M. S., Bernard, C. E., Fausone-Pellegrini, M. S., Smyrk, T. C., Parkman, H. P., Abell, T. L., Snape, W. J., Hasler, W. L., Unalp-Arida, A., Nguyen, L., Koch, K. L., Calles, J., Lee, L., Tonascia, J., Hamilton, F. A. & Pasricha, P. J. 2011.

- Cellular changes in diabetic and idiopathic gastroparesis. *Gastroenterology*, 140, 1575-85 e8.
- Hasler, W. L., Soudah, H. C., Dulai, G. & Owyang, C. 1995. Mediation of hyperglycemia-evoked gastric slow-wave dysrhythmias by endogenous prostaglandins. *Gastroenterology*, 108, 727-36.
- He, C. L., Soffer, E. E., Ferris, C. D., Walsh, R. M., Szurszewski, J. H. & Farrugia, G. 2001. Loss of interstitial cells of cajal and inhibitory innervation in insulin-dependent diabetes. *Gastroenterology*, 121, 427-34.
- He, W. Q., Peng, Y. J., Zhang, W. C., Lv, N., Tang, J., Chen, C., Zhang, C. H., Gao, S., Chen, H. Q., Zhi, G., Feil, R., Kamm, K. E., Stull, J. T., Gao, X. & Zhu, M. S. 2008. Myosin light chain kinase is central to smooth muscle contraction and required for gastrointestinal motility in mice. *Gastroenterology*, 135, 610-20.
- Hirst, G. D., Beckett, E. A., Sanders, K. M. & Ward, S. M. 2002. Regional variation in contribution of myenteric and intramuscular interstitial cells of Cajal to generation of slow waves in mouse gastric antrum. *J Physiol*, 540, 1003-12.
- Hirst, G. D. & Edwards, F. R. 2004. Role of interstitial cells of Cajal in the control of gastric motility. *J Pharmacol Sci*, 96, 1-10.
- Hirst, G. D. & Edwards, F. R. 2006. Electrical events underlying organized myogenic contractions of the guinea pig stomach. *J Physiol*, 576, 659-65.
- Horiguchi, K. & Komuro, T. 2000. Ultrastructural observations of fibroblast-like cells forming gap junctions in the W/W(nu) mouse small intestine. *J Auton Nerv Syst*, 80, 142-7.
- Horiguchi, K., Semple, G. S., Sanders, K. M. & Ward, S. M. 2001. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum. *J Physiol*, 537, 237-50.
- Horvath, V. J., Vittal, H., Lorincz, A., Chen, H., Almeida-Porada, G., Redelman, D. & Ordog, T. 2006. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology*, 130, 759-70.
- Horvath, V. J., Vittal, H. & Ordog, T. 2005. Reduced insulin and IGF-I signaling, not hyperglycemia, underlies the diabetes-associated depletion of interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *Diabetes*, 54, 1528-33.
- Hu, W. & Feng, P. 2012. Myosin light chain kinase is involved in the mechanism of gastrointestinal dysfunction in diabetic rats. *Dig Dis Sci*, 57, 1197-202.
- Hudson, N. P., Mayhew, I. G. & Pearson, G. T. 2006. Interstitial cells of Cajal and electrical activity of smooth muscle in porcine ileum. *Acta Physiol (Oxf)*, 187, 391-7.
- Huizinga, J. D. 1998. Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract. IV. Pathophysiology of GI motility related to interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol*, 275, G381-6.

- Huizinga, J. D. & Lammers, W. J. 2009. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G1-8.
- Huizinga, J. D., Liu, L. W., Fitzpatrick, A., White, E., Gill, S., Wang, X. Y., Zarate, N., Krebs, L., Choi, C., Starret, T., Dixit, D. & Ye, J. 2008a. Deficiency of intramuscular ICC increases fundic muscle excitability but does not impede nitrergic innervation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, G589-94.
- Huizinga, J. D., Martz, S., Gil, V., Wang, X. Y., Jimenez, M. & Parsons, S. 2011. Two independent networks of interstitial cells of cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns. *Front Neurosci*, 5, 93.
- Huizinga, J. D., Reed, D. E., Berezin, I., Wang, X. Y., Valdez, D. T., Liu, L. W. & Diamant, N. E. 2008b. Survival dependency of intramuscular ICC on vagal afferent nerves in the cat esophagus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294, R302-10.
- Huizinga, J. D., Thuneberg, L., Kluppel, M., Malysz, J., Mikkelsen, H. B. & Bernstein, A. 1995. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*, 373, 347-9.
- Huizinga, J. D., Zarate, N. & Farrugia, G. 2009. Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science. *Gastroenterology*, 137, 1548-56.
- Hwang, S. E., Cho, B. H., Hirai, I., Kim, H. T., Kim, J. H., Fujimiya, M., Murakami, G. & Kimura, W. 2010. Topographical anatomy of Spiegel's lobe and its adjacent organs in mid-term fetuses: Its implication on the development of the lesser sac and adult morphology of the upper abdomen. *Clin Anat*, 23, 712-9.
- Hwang, S. J., Blair, P. J., Britton, F. C., O'Driscoll, K. E., Hennig, G., Bayguinov, Y. R., Rock, J. R., Harfe, B. D., Sanders, K. M. & Ward, S. M. 2009. Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol*, 587, 4887-904.
- Iino, S., Ward, S. M. & Sanders, K. M. 2004. Interstitial cells of Cajal are functionally innervated by excitatory motor neurones in the murine intestine. *J Physiol*, 556, 521-30.
- Imaeda, K., Takano, H., Koshita, M., Yamamoto, Y., Joh, T. & Suzuki, H. 1998. Electrical properties of colonic smooth muscle in spontaneously non-insulin-dependent diabetic rats. *J Smooth Muscle Res*, 34, 1-11.
- Imaizumi, M. & Hama, K. 1969. An electron microscopic study on the interstitial cells of the gizzard in the love-bird (*Uroloncha domestica*). *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 97, 351-7.
- Intagliata, N. & Koch, K. L. 2007. Gastroparesis in type 2 diabetes mellitus: prevalence, etiology, diagnosis, and treatment. *Curr Gastroenterol Rep*, 9, 270-9.
- Iwasaki, H., Kajimura, M., Osawa, S., Kanaoka, S., Furuta, T., Ikuma, M. & Hishida, A. 2006. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression

- of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol*, 41, 1076-87.
- Jain, D., Moussa, K., Tandon, M., Culpepper-Morgan, J. & Proctor, D. D. 2003. Role of interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel. *Am J Gastroenterol*, 98, 618-24.
- Jiang, Y., Liu, M. T. & Gershon, M. D. 2003. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol*, 258, 364-84.
- Jimenez, M., Borderies, J. R., Vergara, P., Wang, Y. & Daniel, E. E. 1999. Slow waves in circular muscle of porcine ileum: structural and electrophysiological studies. *Am J Physiol*, 276, G393-406.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. 2005. Basic Histology 11-th ed. *Acta Anat (Basel)*. New York: McGraw-Hill Medical.
- Kashyap, P. & Farrugia, G. 2010. Diabetic gastroparesis: what we have learned and had to unlearn in the past 5 years. *Gut*, 59, 1716-26.
- Kashyap, P. & Farrugia, G. 2011. Oxidative stress: key player in gastrointestinal complications of diabetes. *Neurogastroenterol Motil*, 23, 111-4.
- Kim, E. R., Kim, K. M., Lee, J. Y., Joo, M., Kim, S., Noh, J. H., Ward, S. M., Koh, S. D. & Rhee, P. L. 2012. The clue of Interstitial Cell of Cajalopathy (ICCpathy) in human diabetic gastropathy: the ultrastructural and electrical clues of ICCpathy in human diabetic gastropathy. *Exp Toxicol Pathol*, 64, 521-6.
- Kindblom, L. G., Remotti, H. E., Aldenborg, F. & Meis-Kindblom, J. M. 1998. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol*, 152, 1259-69.
- Kinekawa, F., Kubo, F., Matsuda, K., Fujita, Y., Tomita, T., Uchida, Y. & Nishioka, M. 2001. Relationship between esophageal dysfunction and neuropathy in diabetic patients. *Am J Gastroenterol*, 96, 2026-32.
- Kito, Y. 2011. The functional role of intramuscular interstitial cells of Cajal in the stomach. *J Smooth Muscle Res*, 47, 47-53.
- Kluppel, M., Huizinga, J. D., Malysz, J. & Bernstein, A. 1998. Developmental origin and Kit-dependent development of the interstitial cells of cajal in the mammalian small intestine. *Dev Dyn*, 211, 60-71.
- Knowles, C. H., De Giorgio, R., Kapur, R. P., Bruder, E., Farrugia, G., Geboes, K., Gershon, M. D., Hutson, J., Lindberg, G., Martin, J. E., Meier-Ruge, W. A., Milla, P. J., Smith, V. V., Vandervinden, J. M., Veress, B. & Wedel, T. 2009. Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Acta Neuropathol*, 118, 271-301.

- Komuro, T. 1989. Three-dimensional observation of the fibroblast-like cells associated with the rat myenteric plexus, with special reference to the interstitial cells of Cajal. *Cell Tissue Res*, 255, 343-51.
- Komuro, T. 1990. Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. *Anat Embryol (Berl)*, 182, 103-12.
- Komuro, T. 1999. Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc Res Tech*, 47, 267-85.
- Komuro, T. 2006. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol*, 576, 653-8.
- Komuro, T. 2012. *Atlas of Interstitial Cells of Cajal in the Gastrointestinal Tract.*, Heidelberg London New York, Springer Science+Business Media.
- Komuro, T., Seki, K. & Horiguchi, K. 1999. Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Arch Histol Cytol*, 62, 295-316.
- Lammers, W. J., Al-Bloushi, H. M., Al-Eisaei, S. A., Al-Dhaheri, F. A., Stephen, B., John, R., Dhanasekaran, S. & Karam, S. M. 2011. Slow wave propagation and plasticity of interstitial cells of Cajal in the small intestine of diabetic rats. *Exp Physiol*, 96, 1039-48.
- Langton, P., Ward, S. M., Carl, A., Norell, M. A. & Sanders, K. M. 1989. Spontaneous electrical activity of interstitial cells of Cajal isolated from canine proximal colon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7280-4.
- Lin, L., Xu, L. M., Zhang, W., Ge, Y. B., Tang, Y. R., Zhang, H. J., Li, X. L. & Chen, J. D. 2010. Roles of stem cell factor on the depletion of interstitial cells of Cajal in the colon of diabetic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298, G241-7.
- Lin, S., Kajimura, M., Takeuchi, K., Kodaira, M., Hanai, H., Nishimura, M. & Kaneko, E. 2000. Alterations of GTP-binding proteins (G α and Gq/11 α) in gastric smooth muscle cells from streptozotocin-induced and WBN/Kob diabetic rats. *Dig Dis Sci*, 45, 1517-24.
- Liu, D., Wang, F., Zou, Z., Dong, S., Wang, J., Ran, X., Li, C., Shi, C. & Su, Y. 2010. Bone marrow derivation of interstitial cells of cajal in small intestine following intestinal injury. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 164986.
- Llewellyn-Smith, I. J., Furness, J. B., O'brien, P. E. & Costa, M. 1984. Noradrenergic nerves in human small intestine. Distribution and ultrastructure. *Gastroenterology*, 87, 513-29.
- Long, Q. L., Fang, D. C., Shi, H. T. & Luo, Y. H. 2004. Gastro-electric dysrhythm and lack of gastric interstitial cells of cajal. *World J Gastroenterol*, 10, 1227-30.
- Lorincz, A., Redelman, D., Horvath, V. J., Bardsley, M. R., Chen, H. & Ordog, T. 2008. Progenitors of interstitial cells of cajal in the postnatal murine stomach. *Gastroenterology*, 134, 1083-93.

- Lou, Z. & Li, J. S. 2009. Interstitial cells of Cajal in abdominal sepsis and hypertension-induced ileus in rats. *Eur Surg Res*, 43, 47-52.
- Maeda, H., Yamagata, A., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Kobayashi, S., Nishi, K. & Nishikawa, S. 1992. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development*, 116, 369-75.
- Malas, M. A., Aslankoc, R., Ungor, B., Sulak, O. & Candir, O. 2004a. The development of large intestine during the fetal period. *Early Hum Dev*, 78, 1-13.
- Malas, M. A., Sulak, O., Gokcimen, A. & Sari, A. 2004b. Development of the vermiform appendix during the fetal period. *Surg Radiol Anat*, 26, 202-7.
- Mazet, B. & Raynier, C. 2004. Interstitial cells of Cajal in the guinea pig gastric antrum: distribution and regional density. *Cell Tissue Res*, 316, 23-34.
- Mei, F., Han, J., Huang, Y., Jiang, Z. Y., Xiong, C. J. & Zhou, D. S. 2009. Plasticity of interstitial cells of cajal: a study in the small intestine of adult Guinea pigs. *Anat Rec (Hoboken)*, 292, 985-93.
- Mescher, A. L. 2010. *Junqueira's basic histology : text and atlas* New York : McGraw Hill, New York, McGraw Hill.
- Moore, K. L. & Persaud, T. V. 2003. *The Developing Human*, Philadelphia, WB Saunders.
- Moscoso, G. J., Driver, M. & Guy, R. J. 1986. A form of necrobiosis and atrophy of smooth muscle in diabetic gastric autonomic neuropathy. *Pathol Res Pract*, 181, 188-94.
- Mostafa, R. M., Moustafa, Y. M. & Hamdy, H. 2010. Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease. *World J Gastroenterol*, 16, 3239-48.
- Nakahara, M., Isozaki, K., Hirota, S., Vanderwinden, J. M., Takakura, R., Kinoshita, K., Miyagawa, J., Chen, H., Miyazaki, Y., Kiyohara, T., Shinomura, Y. & Matsuzawa, Y. 2002. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol*, 17, 666-70.
- Nakayama, H., Enzan, H., Miyazaki, E., Kuroda, N., Naruse, K. & Hiroi, M. 2000. Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol*, 53, 626-9.
- Natarajan, D., Marcos-Gutierrez, C., Pachnis, V. & De Graaff, E. 2002. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development*, 129, 5151-60.
- Nikolic, I., Rančić, G., Radenkovic, G., Lačković, V., Todorović, V. & Mitić, D. 2007. *Embriologija čoveka tekst i atlas*, Beograd, Data status.
- Nishida, T., Tsuji, S., Tsujii, M., Arimitsu, S., Sato, T., Haruna, Y., Miyamoto, T., Kanda, T., Kawano, S. & Hori, M. 2004. Gastroesophageal reflux disease related to diabetes: Analysis of 241 cases with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol*, 19, 258-65.

- Nishiyama, C., Uesaka, T., Manabe, T., Yonekura, Y., Nagasawa, T., Newgreen, D. F., Young, H. M. & Enomoto, H. 2012. Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat Neurosci*, 15, 1211-8.
- Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A., Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., Cuomo, R. & Christofi, F. L. 2016. Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 22, 433-49.
- Ordog, T. 2008. Interstitial cells of Cajal in diabetic gastroenteropathy. *Neurogastroenterol Motil*, 20, 8-18.
- Ordog, T., Hayashi, Y. & Gibbons, S. J. 2009. Cellular pathogenesis of diabetic gastroenteropathy. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 55, 315-43.
- Ordog, T., Takayama, I., Cheung, W. K., Ward, S. M. & Sanders, K. M. 2000. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes*, 49, 1731-9.
- Pardi, D. S., Miller, S. M., Miller, D. L., Burgart, L. J., Szurszewski, J. H., Lennon, V. A. & Farrugia, G. 2002. Paraneoplastic dysmotility: loss of interstitial cells of Cajal. *Am J Gastroenterol*, 97, 1828-33.
- Pasricha, P. J., Pehlivanov, N. D., Gomez, G., Vittal, H., Lurken, M. S. & Farrugia, G. 2008. Changes in the gastric enteric nervous system and muscle: a case report on two patients with diabetic gastroparesis. *BMC Gastroenterol*, 8, 21.
- Pluja, L., Alberti, E., Fernandez, E., Mikkelsen, H. B., Thuneberg, L. & Jimenez, M. 2001. Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G255-66.
- Portbury, A. L., Furness, J. B., Young, H. M., Southwell, B. R. & Vigna, S. R. 1996. Localisation of NK1 receptor immunoreactivity to neurons and interstitial cells of the guinea-pig gastrointestinal tract. *J Comp Neurol*, 367, 342-51.
- Powley, T. L. & Phillips, R. J. 2011. Vagal intramuscular array afferents form complexes with interstitial cells of Cajal in gastrointestinal smooth muscle: analogues of muscle spindle organs? *Neuroscience*, 186, 188-200.
- Powley, T. L., Wang, X. Y., Fox, E. A., Phillips, R. J., Liu, L. W. & Huizinga, J. D. 2008. Ultrastructural evidence for communication between intramuscular vagal mechanoreceptors and interstitial cells of Cajal in the rat fundus. *Neurogastroenterol Motil*, 20, 69-79.
- Publicover, N. G., Horowitz, N. N. & Sanders, K. M. 1992. Calcium oscillations in freshly dispersed and cultured interstitial cells from canine colon. *Am J Physiol*, 262, C589-97.

- Radenkovic, G. 2012. Two patterns of development of interstitial cells of Cajal in the human duodenum. *J Cell Mol Med*, 16, 185-92.
- Radenkovic, G. & Abramovic, M. 2012. Differentiation of interstitial cells of Cajal in the human distal colon. *Cells Tissues Organs*, 196, 463-9.
- Radenkovic, G., Ilic, I., Zivanovic, D., Vlajkovic, S., Petrovic, V. & Mitrovic, O. 2010a. C-kit-immunopositive interstitial cells of Cajal in human embryonal and fetal oesophagus. *Cell Tissue Res*, 340, 427-36.
- Radenkovic, G., Radenkovic, D. & Velickov, A. 2017. Development of interstitial cells of Cajal in the human digestive tract as the result of reciprocal induction of mesenchymal and neural crest cells. *J Cell Mol Med*.
- Radenkovic, G., Savic, V., Mitic, D., Grahovac, S., Bjelakovic, M. & Krstic, M. 2010b. Development of c-kit immunopositive interstitial cells of Cajal in the human stomach. *J Cell Mol Med*, 14, 1125-34.
- Richardson, K. C. 1958. Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. *Am J Anat*, 103, 99-135.
- Rolle, U., Piotrowska, A. P., Nemeth, L. & Puri, P. 2002. Altered distribution of interstitial cells of Cajal in Hirschsprung disease. *Arch Pathol Lab Med*, 126, 928-33.
- Rosa-E-Silva, L., Troncon, L. E., Oliveira, R. B., Foss, M. C., Braga, F. J. & Gallo Junior, L. 1996. Rapid distal small bowel transit associated with sympathetic denervation in type I diabetes mellitus. *Gut*, 39, 748-56.
- Ross, M. H. & Pawlina, W. 2016. *Histology: a text and atlas : with correlated cell and molecular biology. 7th ed*, Philadelphia, Wolters Kluwer.
- Rumessen, J. J., Peters, S. & Thuneberg, L. 1993. Light- and electron microscopical studies of interstitial cells of Cajal and muscle cells at the submucosal border of human colon. *Lab Invest*, 68, 481-95.
- Sadler, T. W. 2004. *Langman's Medical Embryology.*, Philadelphia, Lippincott.
- Sanders, K. M. 1998. G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. IV. Neural regulation of gastrointestinal smooth muscle. *Am J Physiol*, 275, G1-7.
- Sanders, K. M. 2000. Postjunctional electrical mechanisms of enteric neurotransmission. *Gut*, 47 Suppl 4, iv23-5; discussion iv26.
- Sanders, K. M., Ordog, T., Koh, S. D., Torihashi, S. & Ward, S. M. 1999. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil*, 11, 311-38.
- Sanders, K. M., Salter, A. K., Hennig, G. W., Koh, S. D., Perrino, B. A., Ward, S. M. & Baker, S. A. 2014a. Responses to enteric motor neurons in the gastric fundus of mice with reduced intramuscular interstitial cells of cajal. *J Neurogastroenterol Motil*, 20, 171-84.

- Sanders, K. M. & Ward, S. M. 2007. Kit mutants and gastrointestinal physiology. *J Physiol*, 578, 33-42.
- Sanders, K. M., Ward, S. M. & Koh, S. D. 2014b. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiol Rev*, 94, 859-907.
- Seki, K. & Komuro, T. 2002. Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx 43 in the stomach of wild-type and W/W^v mutant mice. *Anat Embryol (Berl)*, 206, 57-65.
- Seki, K., Zhou, D. S. & Komuro, T. 1998. Immunohistochemical study of the c-kit expressing cells and connexin 43 in the guinea-pig digestive tract. *J Auton Nerv Syst*, 68, 182-7.
- Sellin, J. H. & Hart, R. 1992. Glucose malabsorption associated with rapid intestinal transit. *Am J Gastroenterol*, 87, 584-9.
- Sfarti, C., Trifan, A., Hutanasu, C., Cojocariu, C., Singeap, A. M. & Stanciu, C. 2010. Prevalence of gastroparesis in type 1 diabetes mellitus and its relationship to dyspeptic symptoms. *J Gastrointestin Liver Dis*, 19, 279-84.
- Shimajima, N., Nakaki, T., Morikawa, Y., Hoshino, K., Ozaki, H., Hori, M. & Kitajima, M. 2006. Interstitial cells of Cajal in dysmotility in intestinal ischemia and reperfusion injury in rats. *J Surg Res*, 135, 255-61.
- Shu-Xin, Z. 1999. *An Atlas of Histology*, New York, Springer.
- Shuttleworth, C. W., Xue, C., Ward, S. M., De Vente, J. & Sanders, K. M. 1993. Immunohistochemical localization of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate in the canine proximal colon: responses to nitric oxide and electrical stimulation of enteric inhibitory neurons. *Neuroscience*, 56, 513-22.
- Sivarao, D. V., Mashimo, H. L., Thatte, H. S. & Goyal, R. K. 2001. Lower esophageal sphincter is achalasic in nNOS(-/-) and hypotensive in W/W^v mutant mice. *Gastroenterology*, 121, 34-42.
- Sohal, G. S., Ali, M. M. & Farooqui, F. A. 2002. A second source of precursor cells for the developing enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. *Int J Dev Neurosci*, 20, 619-26.
- Standring, S. 2005. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of clinical practice 39-th ed.*, Philadelphia, Elsevier Chuchill Livingstone
- Sternini, C., Su, D., Gamp, P. D. & Bunnett, N. W. 1995. Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract. *J Comp Neurol*, 358, 531-40.
- Stevens, A. & Lowe, J. 2005. *Human Histology*, Philadelphia, Elsevier-Mosby.
- Streutker, C. J., Huizinga, J. D., Campbell, F., Ho, J. & Riddell, R. H. 2003. Loss of CD117 (c-kit)- and CD34-positive ICC and associated CD34-positive fibroblasts defines a subpopulation of chronic intestinal pseudo-obstruction. *Am J Surg Pathol*, 27, 228-35.

- Suzuki, H., Ward, S. M., Bayguinov, Y. R., Edwards, F. R. & Hirst, G. D. 2003. Involvement of intramuscular interstitial cells in nitrergic inhibition in the mouse gastric antrum. *J Physiol*, 546, 751-63.
- Suzuki, M., Takahashi, A., Toki, F., Hatori, R., Tomomasa, T., Morikawa, A. & Kuwano, H. 2008. The effects of intestinal ischemia on colonic motility in conscious rats. *J Gastroenterol*, 43, 767-73.
- Suzuki, T., Won, K. J., Horiguchi, K., Kinoshita, K., Hori, M., Torihashi, S., Momotani, E., Itoh, K., Hirayama, K., Ward, S. M., Sanders, K. M. & Ozaki, H. 2004. Muscularis inflammation and the loss of interstitial cells of Cajal in the endothelin ETB receptor null rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G638-46.
- Sweeney, J. L. 1998. *Basic Concepts in Embryology*, New York, McGraw-Hill.
- Szkudelski, T. 2012. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237, 481-90.
- Takahashi, T., Kojima, Y., Tsunoda, Y., Beyer, L. A., Kamijo, M., Sima, A. A. & Owyang, C. 1996. Impaired intracellular signal transduction in gastric smooth muscle of diabetic BB/W rats. *Am J Physiol*, 270, G411-7.
- Takaki, M. 2003. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res*, 39, 137-61.
- Tamada, H. & Komuro, T. 2011. Three-dimensional demonstration of the interstitial cells of Cajal associated with the submucosal plexus in guinea-pig caecum. *Cell Tissue Res*, 344, 183-8.
- Tamada, H. & Komuro, T. 2012. Ultrastructural characterization of interstitial cells of Cajal associated with the submucosal plexus in the proximal colon of the guinea pig. *Cell Tissue Res*, 347, 319-26.
- TAXI, J. 1964. [Electron Microscope Study of the Innervation of Intestinal Smooth Muscle, Compared to that of Some Other Mammalian Smooth Muscles]. *Arch Biol (Liege)*, 75, 301-28.
- Thuneberg, L. 1982. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 71, 1-130.
- Thuneberg, L. 1999. One hundred years of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech*, 47, 223-38.
- Thuneberg, L. & Peters, S. 2001. Toward a concept of stretch-coupling in smooth muscle. I. Anatomy of intestinal segmentation and sleeve contractions. *Anat Rec*, 262, 110-24.
- Tong, W., Jia, H., Zhang, L., Li, C., Ridolfi, T. J. & Liu, B. 2010. Exogenous stem cell factor improves interstitial cells of Cajal restoration after blockade of c-kit signaling pathway. *Scand J Gastroenterol*, 45, 844-51.

- Torihashi, S., Kobayashi, S., Gerthoffer, W. T. & Sanders, K. M. 1993. Interstitial cells in deep muscular plexus of canine small intestine may be specialized smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 265, G638-45.
- Torihashi, S., Nishi, K., Tokutomi, Y., Nishi, T., Ward, S. & Sanders, K. M. 1999. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology*, 117, 140-8.
- Torihashi, S., Ward, S. M., Nishikawa, S., Nishi, K., Kobayashi, S. & Sanders, K. M. 1995. c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res*, 280, 97-111.
- Torihashi, S., Ward, S. M. & Sanders, K. M. 1997. Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology*, 112, 144-55.
- Torihashi, S., Yoshida, H., Nishikawa, S., Kunisada, T. & Sanders, K. M. 1996. Enteric neurons express Steel factor-lacZ transgene in the murine gastrointestinal tract. *Brain Res*, 738, 323-8.
- Touw, K., Chakraborty, S., Zhang, W., Obukhov, A. G., Tune, J. D., Gunst, S. J. & Herring, B. P. 2012. Altered calcium signaling in colonic smooth muscle of type 1 diabetic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302, G66-76.
- Undeland, K. A., Hausken, T., Aanderud, S. & Berstad, A. 1997. Lower postprandial gastric volume response in diabetic patients with vagal neuropathy. *Neurogastroenterol Motil*, 9, 19-24.
- Vanderwinden, J. M. & Rumessen, J. J. 1999. Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Microsc Res Tech*, 47, 344-60.
- Vanderwinden, J. M., Rumessen, J. J., Bernex, F., Schiffmann, S. N. & Panthier, J. J. 2000. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the mouse colon, using antibodies to Kit and Kit(W-lacZ) mice. *Cell Tissue Res*, 302, 155-70.
- Vanderwinden, J. M., Rumessen, J. J., De Laet, M. H., Vanderhaeghen, J. J. & Schiffmann, S. N. 1999. CD34+ cells in human intestine are fibroblasts adjacent to, but distinct from, interstitial cells of Cajal. *Lab Invest*, 79, 59-65.
- Velickov, A., Mitrovic, O., Djordjevic, B., Sokolovic, D., Zivkovic, V., Velickov, A., Pantovic, V., Urlih, N. P. & Radenkovic, G. 2016. The effect of bilberries on diabetes-related alterations of interstitial cells of Cajal in the lower oesophageal sphincter in rats. *Histol Histopathol*, 11829.
- Vinik, A. I., Anandacoomaraswamy, D. & Ullal, J. 2005. Antibodies to neuronal structures: innocent bystanders or neurotoxins? *Diabetes Care*, 28, 2067-72.
- Vinik, A. I., Maser, R. E., Mitchell, B. D. & Freeman, R. 2003. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*, 26, 1553-79.

- Wallace, A. S. & Burns, A. J. 2005. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res*, 319, 367-82.
- Wang, H., Hughes, I., Planer, W., Parsadanian, A., Grider, J. R., Vohra, B. P., Keller-Peck, C. & Heuckeroth, R. O. 2010. The timing and location of glial cell line-derived neurotrophic factor expression determine enteric nervous system structure and function. *J Neurosci*, 30, 1523-38.
- Wang, X. Y., Huizinga, J. D., Diamond, J. & Liu, L. W. 2009. Loss of intramuscular and submuscular interstitial cells of Cajal and associated enteric nerves is related to decreased gastric emptying in streptozotocin-induced diabetes. *Neurogastroenterol Motil*, 21, 1095-e92.
- Wang, X. Y., Paterson, C. & Huizinga, J. D. 2003. Cholinergic and nitrergic innervation of ICC-DMP and ICC-IM in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil*, 15, 531-43.
- Wang, X. Y., Zarate, N., Soderholm, J. D., Bourgeois, J. M., Liu, L. W. & Huizinga, J. D. 2007. Ultrastructural injury to interstitial cells of Cajal and communication with mast cells in Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil*, 19, 349-64.
- Ward, S. M. 2000. Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. *Gut*, 47 Suppl 4, iv40-3; discussion iv52.
- Ward, S. M., Beckett, E. A., Wang, X., Baker, F., Khoyi, M. & Sanders, K. M. 2000. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci*, 20, 1393-403.
- Ward, S. M., Burns, A. J., Torihashi, S. & Sanders, K. M. 1994. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol*, 480, 91-7.
- Ward, S. M., Harney, S. C., Bayguinov, J. R., McLaren, G. J. & Sanders, K. M. 1997. Development of electrical rhythmicity in the murine gastrointestinal tract is specifically encoded in the tunica muscularis. *J Physiol*, 505 (Pt 1), 241-58.
- Ward, S. M., McLaren, G. J. & Sanders, K. M. 2006. Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *J Physiol*, 573, 147-59.
- Ward, S. M., Morris, G., Reese, L., Wang, X. Y. & Sanders, K. M. 1998. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology*, 115, 314-29.
- Ward, S. M. & Sanders, K. M. 2001. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec*, 262, 125-35.

- Ward, S. M. & Sanders, K. M. 2006. Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract. *J Physiol*, 576, 675-82.
- Wei, J. Y., Adelson, D. W., Tache, Y. & Go, V. L. 1995. Centrifugal gastric vagal afferent unit activities: another source of gastric "efferent" control. *J Auton Nerv Syst*, 52, 83-97.
- Wester, T., Eriksson, L., Olsson, Y. & Olsen, L. 1999. Interstitial cells of Cajal in the human fetal small bowel as shown by c-kit immunohistochemistry. *Gut*, 44, 65-71.
- Won, K. J., Sanders, K. M. & Ward, S. M. 2005. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 14913-8.
- Wood, J. D., Alpers, D. H. & Andrews, P. L. 1999. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut*, 45 Suppl 2, II6-II16.
- Wouters, M., De Laet, A., Donck, L. V., Delpire, E., Van Bogaert, P. P., Timmermans, J. P., De Kerchove D'exaerde, A., Smans, K. & Vanderwinden, J. M. 2006. Subtractive hybridization unravels a role for the ion cotransporter NKCC1 in the murine intestinal pacemaker. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G1219-27.
- Wu, J. J., Rothman, T. P. & Gershon, M. D. 2000. Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand. *J Neurosci Res*, 59, 384-401.
- Yamamoto, T., Watabe, K., Nakahara, M., Ogiyama, H., Kiyohara, T., Tsutsui, S., Tamura, S., Shinomura, Y. & Hayashi, N. 2008. Disturbed gastrointestinal motility and decreased interstitial cells of Cajal in diabetic db/db mice. *J Gastroenterol Hepatol*, 23, 660-7.
- Yarandi, S. S. & Srinivasan, S. 2014. Diabetic gastrointestinal motility disorders and the role of enteric nervous system: current status and future directions. *Neurogastroenterol Motil*, 26, 611-24.
- Yin, J. & Chen, J. D. 2008. Roles of interstitial cells of Cajal in regulating gastrointestinal motility: in vitro versus in vivo studies. *J Cell Mol Med*, 12, 1118-29.
- Young, B., O'dowd, G. & Woodford, P. 2014. *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas (6 Ed.)*, Philadelphia, Elsevier.
- Young, H. M. 1999. Embryological origin of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech*, 47, 303-8.
- Young, H. M., Ciampoli, D., Southwell, B. R. & Newgreen, D. F. 1996. Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Dev Biol*, 180, 97-107.
- Young, H. M., Hearn, C. J. & Newgreen, D. F. 2000. Embryology and development of the enteric nervous system. *Gut*, 47 Suppl 4, iv12-4; discussion iv26.
- Young, H. M., Mcconalogue, K., Furness, J. B. & De Vente, J. 1993. Nitric oxide targets in the guinea-pig intestine identified by induction of cyclic GMP immunoreactivity. *Neuroscience*, 55, 583-96.

- Young, H. M., Torihashi, S., Ciampoli, D. & Sanders, K. M. 1998. Identification of neurons that express stem cell factor in the mouse small intestine. *Gastroenterology*, 115, 898-908.
- Zarate, N., Mearin, F., Wang, X. Y., Hewlett, B., Huizinga, J. D. & Malagelada, J. R. 2003. Severe idiopathic gastroparesis due to neuronal and interstitial cells of Cajal degeneration: pathological findings and management. *Gut*, 52, 966-70.
- Zarate, N., Wang, X. Y., Tougas, G., Anvari, M., Birch, D., Mearin, F., Malagelada, J. R. & Huizinga, J. D. 2006. Intramuscular interstitial cells of Cajal associated with mast cells survive nitrergic nerves in achalasia. *Neurogastroenterol Motil*, 18, 556-68.
- Zhu, Y., Mucci, A. & Huizinga, J. D. 2005. Inwardly rectifying chloride channel activity in intestinal pacemaker cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288, G809-21.
- Zhu, Y. F., Wang, X. Y., Lowie, B. J., Parsons, S., White, L., Kunze, W., Pawelka, A. & Huizinga, J. D. 2014. Enteric sensory neurons communicate with interstitial cells of Cajal to affect pacemaker activity in the small intestine. *Pflugers Arch*, 466, 1467-75.

Биографија кандидата

Александра И Величков, девојачко Ђорђевић, рођена је 13. 11. 1979. године у Нишу, где је завршила основну и средњу школу, гимназију „Бора Станковић”, са одличним успехом и Вуковом дипломом. Студије на Медицинском факултету у Нишу (студијска група медицина) уписала је школске 1998/99. године, а дипломирала јуна 2006. године са просечном оценом 9,51. Докторске студије, смер молекуларна медицина на Медицинском факултету у Нишу уписала је 2007/08. године и положила све предвиђене испите са оценом 10. Специјализацију из области патологије је уписала 20.5.2013. године на Медицинском факултету Универзитета у Нишу.

Др Александра Величков је током студија радила као демонстратор на Катедри за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Нишу. За сарадника у настави на Катедри за хистологију и ембриологију Медицинског факултета у Нишу изабрана је 2008. године. У звање асистента, за ужу научну област Хистологија и ембриологија, први пут је бирана септембра 2010. године. Члан је више домаћих и европских удружења лекара. Добитник је Награде Српског лекарског друштва на XXVII конгресу опште медицине Србије, 2006 године. Боравила је на студијским усавршавањима у иностранству, на Институту за неуробиологију, на Карловом Универзитету у Прагу, Република Чешка и на Клиници за торакалну хирургију, Клиничког Центара Љубљана–Словенија. Била је руководилац Центра за научно-истраживачки рад студената Медицинског факултета 2002. године. Аутор је и коаутор више публикованих радова у иностраним часописима и часописима од националног значаја. Презентовала је своја истраживања на скуповима у иностранству и на националним конгресима.

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ИНТЕРСТИЦИЈАЛНЕ ЋЕЛИЈЕ КАХАЛА У ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОМ ТРАКТУ ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ МЕЛИТУСОМ ИЗАЗВАНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИН- НИКОТИНАМИДОМ

која је одбрањена на ... факултету Универзитета у Нишу:

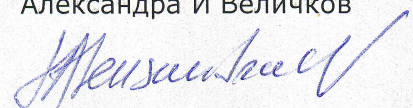
- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 19.1.2018.

Потпис аутора дисертације:

Александра И Величков



Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСKE
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

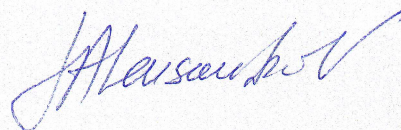
**ИНТЕРСТИЦИЈАЛНЕ ЋЕЛИЈЕ КАХАЛА У ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОМ ТРАКТУ
ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ МЕЛИТУСОМ ИЗАЗВАНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИН-
НИКОТИНАМИДОМ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 19.1.2018.

Потпис аутора дисертације:

Александра И Величков



Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ИНТЕРСТИЦИЈАЛНЕ ЋЕЛИЈЕ КАХАЛА У ГАСТРОИНТЕСТИНАЛНОМ ТРАКТУ ПАЦОВА СА ДИЈАБЕТЕСОМ МЕЛИТУСОМ ИЗАЗВАНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИН-НИКОТИНАМИДОМ

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (CreativeCommons), за коју сам се одлучио/ла.

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

У Нишу, 19.1.2018.

Потпис аутора И дисертације:

Александра И Величков

¹Аутор дисертације обавезан је да изабере и означи (заокружи) само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста.