

## EFEKTI 9,10-DIMETHYL-1,2-BENZANTRACENA (DMBA) NA ENDOKRINI PANKREAS PACOVA

Ljiljana A. Novković, Snežana Jančić  
Institut za patologiju Medicinskog fakulteta u Kragujevcu, Srbija i Crna Gora

## EFFECTS OF 9,10-DIMETHYL-1,2-BENZANTHRACEN (DMBA) ON ENDOCRINE PANCREAS OF THE RATS

Ljiljana A. Novkovic, Snezana Jancic  
Institute of Pathology Medical faculty of Kragujevac, Serbia and Montenegro

Primljen/Received: 20. 10. 2003.

Prihvaćen/Accepted: 26. 03. 2004.

### ABSTRACT

Many experimental models of carcinogenesis have been formed because many explorers aspired to find experimental model of prophylaxis for malignant diseases that are increasing day by day. The aim of our research is the examination of micromorphological effect of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracen (DMBA) on endocrine pancreas of the rats and establishing of immunocytological characteristics A, B, D and F (PP) cells in the chemical carcinogenesis. 60 female Wistar rats, 45 days old were used in the experiment. Animals were divided into four experimental groups. The first and the third group were treated with DMBA for 30-60 days, and the second one and the fourth one, were control groups. Analysis of our results has shown that DMBA has toxic effects on endocrine pancreas of the rats and that micromorphological and functional damage is proportional to the amount of applied dose of DMBA and the time exposition of experimental animal.

**Key words:** polycyclic-carbonhydrogen, 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracen, endocrine pancreas, carcinogenesis

**Abbreviations:** DMBA: 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracen, PYY: peptide YY

### SAŽETAK

Zbog težnje mnogih istraživača da nađu eksperimentalni model profilakse od malignih bolesti, čiji se broj svakim danom sve više povećava, formirani su mnogobrojni eksperimentalni modeli karcinogeneze. Cilj rada je ispitivanje mikromorfološkog efekta 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracena (DMBA) na endokrini pankreas pacova i utvrđivanje imunocitohemijskih karakteristika A, B, D i F (PP) ćelija u hemijskoj karcinogenezi. Eksperimentom je obuhvaćeno 60 Wistar pacova, ženskog pola, starosti 45 dana. Životinje su podeljene u četiri eksperimentalne grupe. Prva i treća grupa su tretirane DMBA-om tokom 30 i 60 dana, a druga i četvrta su bile kontrolne grupe. Analiza naših rezultata je pokazala da DMBA ima toksične efekte na endokrini pankreas pacova i da je mikromorfološko i funkcionalno oštećenje direktno proporcionalno količini aplikovane doze DMBA i vremenskoj ekspoziciji eksperimentalne životinje.

**Ključne reči:** policiklični ugljovodonici, 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracen, endokrini pankreas, karcinogeneza

**Skrćenice:** DMBA- 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracen, PYY- peptide YY

### UVOD

Interes za hemijske materije, kao induktore različitih neoplazmi tj. proučavanje karcinogeneze izazvane hemijskim materijama je otpočelo svoju istoriju još 1759. godine, kada je John Hull saopštio da ušmrkavanje duvana može izazvati karcinome usne duplje. Ovom saopštenju je usledila publikacija Pott-a koji je prvi opisao 1755. godine karcinom kože skrotuma u dimnjačara.

Volkman 1875. godine opisuje profesionalne kožne tumore u radnika parafinske i industrije katrana. Auld 1956. godine sugeriše karcinogeno aktivnost nekih petrolejskih frakcija i ulja koja imaju građu benzantracena, a u poslednje vreme je dokazano prisustvo istih u duvanskom dimu (1-3).

Mehanizam hemijske tumorogeneze je intenzivno proučavan zadnjih decenija, pri čemu je istaknuto da policiklični ugljovodonici, uključujući i DMBA, karcinogeno dejstvo ostvaruju preko svojih epoksinih derivata (3, 4).

Metabolički procesi i enzimske reakcije u koje je karcinogen uključen kada dospe u organizam dovode do izmenjene funkcije jetre što se reperkutuje i na sintezu polipeptidnih hormona endokrinih ćelija pankreasa (1-3).

S obzirom da o uticaju hronične intoksikacije aromatičnim ugljovodonicima na endokrini pankreas u domaćoj literaturi nema podataka, postavljeni su sledeći ciljevi:

- ispitivanje mikromorfološkog efekta DMBA na endokrini pankreas u eksperimentalnih životinja

- utvrđivanje imunocitohemijskih karakteristika A, B, D i F (PP) ćelija pankreasa, u hemijskoj karcinogenezi.

### MATERIJAL I METODE

Za eksperiment su korišćeni beli, nepareni Wistar pacovi, ženskog pola, težine 130g  $\pm$  5 gr, starosti 45 dana. Ukupno 60 životinja je podeljeno u četiri eksperimentalne grupe (u svakoj po 15 životinja). Sve životinje su čuvane u istim eksperimentalnim uslovima laboratorijske štale i hranjene uobičajenom laboratorijskom hranom.

Eksperiment je rađen na Institutu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Prvu i treću eksperimentalnu grupu je činilo po 15 životinja koje su svakodnevno, pored uobičajene ishrane, pile 20 mg karcinogena tipa DMBA rastvorenog u 1 l obične vode. Drugu i četvrtu eksperimentalnu grupu je činilo po 15 životinja koje su pored uobičajene ishrane, pile samo običnu vodu tj. nisu bile podvrgnute nikakvom tretmanu. One su bile kontrolne grupe, i to druga prvoj, a četvrta trećoj eksperimentalnoj grupi.

Nakon 30 dana od početka eksperimenta, žrtvovane su životinje prve i druge eksperimentalne grupe, a nakon 60 dana od početka eksperimenta životinje treće i četvrte eksperimentalne grupe.

Posle žrtvovanja, svim životinjama je otvaran trbuh i ektirpiran pankreas. Svi izvađeni pankreasi eksperimentalnih životinja su, posle makroskopskog pregleda i merenja

dijametra, bili fiksirani u rastvoru Bouin-a u trajanju od 24 h. Nakon toga je od svih pankreasa uzimano po 9 isečaka (po 3 iz glave, 3 iz tela i 3 iz repa pankreasa) koji su ručno obrađivani i kalupljeni u parafin. Sečenje je obavljeno na mikrotomu, a preseci su bili debljine 5 mikrometara. Od svakog kalupa je pravljeno po 9 preseka. Preseci namenjeni imunocitohemijskom ispitivanju su držani 24h u termostatu, na temperaturi od 45°C stepeni zbog boljeg fiksiranja preseka na pločice.

Metode bojenja korišćene za realizaciju postavljenih zadataka:

- Klasična HE (hematoksilin-eozin) metoda za verifikaciju histopatoloških procesa
- Citohemijska argirofilna reakcija po Grimelius-u, za detekciju neuroendokrinih ćelija
- Imunoenzimska Avidin-Biotin-peroxidasa (ABC) sa specifičnim, monoklonskim antitelima na insulin, glukagon, pankreatični polipeptid, peptide YY, chromogranin (A+B) i "neuron-specific" enolazu, u cilju diferencijacije ćelija endokrinog pankreasa.

Obrada materijala, kalupljenje, histomorfološke, citohemijske i imunoenzimske reakcije su rađene na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Kragujevcu.

## REZULTATI

Mikromorfološkim ispitivanjem kontrolnih grupa eksperimentalnih životinja, rutinskim H-E bojenjem verifikovane su insule u celom pankreasu, sa najvećom distribucijom u telu i repu. Insule su okruglog ili ovoidnog oblika, uglavnom identične po veličini.

Grimeliusovom argirofilnom reakcijom su u insulama pankreasa kontrolnih životinja verifikovane A i PP ćelije. Ovom metodom nije moguće detektovati B ćelije.

S obzirom da na osnovu klasične H-E i Grimelius-ove argirofilne metode nije moguće razlikovanje A-, B-, D-, PP- i PYY- ćelija, na bazi imunocitohemijskih ispitivanja, ABC metodom sa monoklonskim antitelima na chromogranin A+B, insulin, glukagon, pankreatični polipeptid, somatostatin i peptide YY konstatovano je da B- ćelije posedaju centralne delove insula endokrinog pankreasa kontrolnih grupa životinja, dok su A- i PP- ćelije uglavnom lokalizovane na njihovoj periferiji. PP- ćelije se od A- ćelija razlikuju ne samo po svetlo braon depositima, već i dijametralno, budući da su malih dimenzija. D- ćelije endokrinih pankreasa kontrolnih životinja su zauzimale uglavnom paracentralne delove insula.

U životinja tretiranih DMBA-om i žrtvovanih nakon 30 kao i nakon 60 dana uočene su sledeće promene: hiperplazija i hipertrofija insula, hiperplaziju B-ćelija, hipertrofija i "piknoza" A- ćelija, "piknoza" i perinsularna ektopija PP- ćelija, gubitak citoplazmatskih produžetaka i izražen celularni polimorfizam D- ćelija kao i pojavu PYY- ćelija na periferiji insula, sa identičnom topografijom A- ćelija ali u značajno manjem broju.

U životinja žrtvovanih 60-og dana od početka tretmana DMBA-om, pored opisanih promena prisutna je i markantna hiperplazija i funkcionalni polimorfizam svih endokrinih ćelija pankreasa, povećan mitotski indeks i anizo-

horiya jedara somatostatinskih ćelija. Upadljiva je nezidioblastoza svih ćelijskih tipova, odnosno osim u insulama. A, B, D PP i PYY ćelije su nađene i u acinusima, u hiperplastično i displastično izmenjenom epitelu duktusa pa čak i periduktalno.

Analiza naših rezultata je pokazala da DMBA ima toksične efekte na endokrini pankreas i da je mikromorfološko oštećenje pankreasa direktno proporcionalno količini aplikovane doze DMBA i vremenskoj ekspoziciji eksperimentalne životinje.

## DISKUSIJA

Zbog težnje mnogih istraživača da nađu model profilakse od malignih bolesti, čiji se broj svakim danom sve više povećava, formirani su mnogobrojni eksperimentalni modeli karcinogeneze (1).

Izloženost policikličnim aromatičnim ugljovodonicima se decenijama dovodi u vezu sa povećanim rizikom karcinoma pluća i kože. Mnogobrojne epidemiološke studije ukazuju da industrijska zagađenja, fosilna goriva i duvanski dim predstavljaju osnovne izvore karcinogenih materija u urbanim sredinama. Karcinogeni policiklični ugljovodonici su prisutni i u pojedinim vrstama hrane, prvenstveno u prokuvanom mesu i mesu pečenom na ćumurskom roštilju, pa se danas sve više ističe njihova uloga u tumorogenezi želuca, jetre, mokraćne bešike, dojke i drugih organa (5, 6).

Smatra se da policiklični ugljovodonici mogu svoje karcinogene efekte ispoljiti posrednim i neposrednim oštećenjem DNK. Za DMBA, koji smo koristili u eksperimentu, postoji jedinstven stav da su njegova dejstva neposredna. Naime, DMBA metabolišu citohrom – P 450 monooksigenaze, čija je osnovna uloga detoksikacija. Najvažniji reaktivni produkti tokom metabolizma DMBA su epoksini derivati, što je i potkrepljeno saopštenjima Greiner-a da su u tumorima indukovanim DMBA-om povišene vrednosti epoxid-hidrataze (4, 7).

Reaktivna epoksidno intermedijarna jedinjenja menjaju način na koji je DNK pakovana u jedru, pa nastaje poremećaj ravnoteže, disbalans i dediferenciranje ćelije (4, 8).

Analizom pankreasa životinja kontrolnih grupa konstatovani smo da je prisustvo endokrinih ćelija isključivo unutar insula.

Mikromorfologija, topografija i imunocitohemijske karakteristike A-, B-, D- i PP- ćelija endokrinog pankreasa naših kontrolnih životinja su u korelaciji sa poznatim podacima iz literature.

U tretiranih životinja, razlike u broju, morfologiji, topografiji i hormonskoj aktivnosti endokrinih ćelija su evidentne u odnosu na ćelije endokrinog pankreasa kontrolnih grupa. Ćelije A, B, D, PP i PYY su u duže tretiranih životinja, osim u insulama, verifikovane i u acinusima, duktusima i periduktalno, čime je potvrđeno prisustvo nezidioblastoze (termin koji opisuje in situ formacije insularnog tkiva poreklom od duktula kao i novoformiranje insula uključujući i tumore).

Do danas ne postoji jedinstven stav o tome da li nezidioblastoza stvarno doprinosi uvećanju mase ostrvaca ili je u pita-

nju gubitak acinusnog tkiva pankreasa tako da hiperplazija ostvaca nastaje usled kolapsa egzokrinog pankreasa. Posebno interesantan nalaz u endokrinom pankreasu životinja duže tretiranih DMBA-om predstavlja nalaz peptida YY koji je zajedno sa glukagonom deponovan u granulama A ćelija. Iako su neuroendokrine ćelije tipa PYY poslednjih godina intenzivno proučavane u ileumu, kolonu i rektumu, o morfoloiji i funkciji ovih ćelija u pankreasu postoji malo podataka. Bazalna lokalizacija PYY ćelija i citoplazmatski produžetci koji dopiru do susednih peharastih ćelija u rektumu, sugerišu da bi peptid YY mogao da utiče na lučenje mukusa parakrinim putem. Studije su pokazale da peptid YY inhibiše glukozom stimulisanu insulinsku sekreciju za 30% i izaziva značajnu vazokonstrikciju u izolovanom pankreasu pacova, psa i miša (9, 10). S obzirom da je on prisutan u A ćelijama endokrinog pankreasa, predpostavlja se da peptid YY može imati direktni lokalni inhibicioni efekat na sekreciju B ćelija pankreasa (10). Naši rezultati, koji se odnose na koegzistenciju peptida YY u A ćelijama insula u kojima je istovremeno prisutna hiperplazija i hipogranulacija B ćelija, govore u prilog ove hipoteze. Naši rezultati koji se odnose na koegzistenciju PYY i glukagona u A ćelijama insula, kao i prisustvo PYY, A, B, D i PP ćelija u acinusima, epitelu duktusa i periduktalno otvaraju pitanje histogeneze ovih ćelija, o čemu postoje brojna spekulativna saopštenja u literaturi. Iza zov tradicionalnoj histogenetskoj klasifikaciji endokrinih ćelija pankreasa predstavlja. Koncept multidirekciono diferencijacije "STEM" ćelije, koji baca nova svetla na patobiologiju tumorogeneze. Istovremeno se smatra da fenomen multidiferencijacije nije specifičan samo za neoplastične ćelije. Razna normalna tkiva, pod određenim uslovima kao što su subletalna lezija, hronično zapaljenje ili nedostatak vitamina A, mogu podležati metaplaziji pri čemu ćelija pokazuje karakteristike i mehanizme multidiferencijacije (11).

Smatra se da je najuobičajeniji vid multidirekciono diferencijacije prisutan kod neuroendokrinih tumora koji proizvode više hormona. U nekim slučajevima oni su isti kao i kod normalne ćelije "majke" pa se nazivaju eutopičnim. Međutim, razlika između eutopične i ektopične produkcije hormona su po nekima veštačke, jer su hormoni za koje se nekada smatra da su ektopični, ipak sintetisani od strane normalne ćelije, ali u manjoj količini. To je verovatno slučaj sa peptidom YY u našem eksperimentu, prisutnom u A ćelijama pankreasa. Iz ovog razloga se preporučuje opreznost kod ocene ektopičnosti i eutopičnosti hormona. Fenomen multihormonalnosti sa produkcijom oba, ektopična i eutopična peptida je često opisan kod endokrinih tumora pankreasa i gastrointestinalnog trakta (11).

Kao dodatak fenomenu multicentričnosti sa produkcijom multiplih eutopičnih i ektopičnih peptida su saopštenja da mnogi endokrini tumori pokazuju i ne-neuroendokrinu diferencijaciju (poput medularnog karcinoma štitaste žlezde koji sekretuje vimentin ili pak keratin), dok mnogi ne-neuroendokrini tumori mogu sadržati subpopulacije neuroendokrinih ćelija (tumori dojke, uterusa, žučne kese i dr.) (12-15). Sličan fenomen je primećen i u pankreasu. Tumori pankreasa su tradicionalno klasifikovani kao duktalni, endokrini i tumori tipa acinusnih ćelija. Detaljnije studije endokrinih tumora pankreasa su opisale njihovu mukusnu sekreciju, što je odlika duktalnih

karcinoma pankreasa. Slično ovome, studije mukusnih karcinoma su otkrile 30-40% neuroendokrinih ćelija. Navedena zapažanja potvrđuju stav da tumori sa jasnom neuroendokrinom funkcijom mogu voditi poreklo od "STEM" ćelije koja ima sposobnost multidirekcionog potencijala (11). Naši rezultati koji se odnose na sekreciju peptida YY u A ćelijama pankreasa, kao i prisustvo svih tipova endokrinih ćelija pankreasa u acinusima, duktusima i periduktalno, navode nas da se priklonimo konceptu Damjanova i sar. i De Lellis-a i sar. po kome i epitelne i endokrine ćelije potiču iz iste pra-ćelije, koja se u zavisnosti od uslova diferentuje u različitim pravcima.

## ZAKLJUČAK

Osim poznatih preneoplastičnih i neoplastičnih proliferacija u koži, plućima, jetri, želucu i kolonu, policiklični ugljovodonici tipa DMBA prisutni u roštiljskom mesu, pojedinim vrstama alkoholnih pića, duvanskom dimu i industriji sa ter-postrojenjima, izazivaju patološke proliferacije svih endokrinih ćelija pankreasa koje su potvrđene morfo-funkcionalnim lezijama u našem eksperimentu.

## LITERATURA

1. Anisimov VN, Turusov VS. Modifying effect of aging on chemical carcinogenesis. A Review. *Mech Ageing Dev* 1981; 14: 399-414.
2. Harris CC. Multistep carcinogenesis: advances and perspectives. *JPN J Cancer Res* 1993; 84-7.
3. Yuspa SH, Poirier MC. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv Cancer Res* 1988; 50: 25-70.
4. Ebbesen P. Aging increases susceptibility of mouse skin to DMBA carcinogenesis independent of general immune status. *Science* 1974; 183: 217-8.
5. Ames BN. Mutagenesis and carcinogenesis endogenous and exogenous factors. *Environ Mo Mutagen* 1989; 14 (suppl 16): 66-77.
6. Weinstein IB. Growth factors, oncogenes and multistage carcinogenesis. *J Cell Biochem* 1987; 33: 213-24.
7. Jančić S. Promene u dojci indukovane policikličnim ugljovodnikom tipa DMBA i hipofunkcijom štitaste žlezde. Doktorska disertacija. Niš: Medicinski fakultet, 1990.
8. Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1447-50.
9. Guan D, Maouyo D, Taylor IL, Gettys TW, Greeley GH Jr, Morisset J. Peptide-YY, a new partner in the negative feedback control of pancreatic secretion. *Endocrinology* 1991; 128: 911-5.
10. Guslaine B, Gross R, Roye M, Ahren B, Ribes G. Evidence for a direct inhibitory effect of PYY on insulin secretion in rats. *Pancreas* 1992; 7: 595-600.
11. De Lellis R, Tishler A, Wolfe HJ. Multidirectional differentiation in neuroendocrine neoplasms. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 899-904.
12. Jančić S, Katić V, Jovanović T, Andelković I. Neuroendocrine cells in breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 1989; 185: 75.
13. Jančić S, Stanković V, Milosavljević Z, et al. Imunocitohemijski i citofluorometrijski parametri prognoze medularnih Ca štitaste žlezde. VII Jugoslovenski simpozijum o štitastoj žlezdi. Zbornik radova. Beograd, 1994: 25.
14. Rounbehler RJ, Rogers PM, Conti CJ, Johnson DG. Inactivation of E 2f1 enhances tumorigenesis in a myc transgenic models. *Cancer Res* 2002; 62: 3276-81.
15. Yamasaki H, Omori Y, Zaidan-Dagli ML, Mirmov N, Mesnil M, Krutovskikh V. Genetic and epigenetic changes of intercellular communication genes during multistage carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 1999; 23: 273-9.