

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 05.07.2022. godine, broj 11/VII-3/2-JJ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Biohemijska karakterizacija tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma“

Kandidata kliničkog asitenta dr Jovana Julskog, zaposlenog na Klinici za hirurgiju „Nikola Spasić“ Kliničko-bolničkog centra Zvezdara, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
Mentor je Prof. dr Silvio de Luka.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandar Karamarković, profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Branka Popović, profesor Stomatološkog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Dr sci. Tamara Popović, Viši naučni saradnik, Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu
4. Dr sci. Saša Janković, Viši naučni saradnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd
5. Prof. dr Miroslav Stojanović, profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Nišu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Jovana Julskog napisana je na ukupno 111 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i reference. U disertaciji se nalazi ukupno 1 šema, 32 tabele, 24 grafikona i 10 formula. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je istaknut javno-zdravstveni značaj kolorektalnog karcinoma, njegove epidemiološke karakteristike u svetu i u Srbiji. Navedeni su najznačajniji faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma (genetski faktori rizika, način života i ishrane, gojaznost, fizička aktivnost, stres). Prikazana je patogeneza bolesti, putevi širenja karcinoma i prirodan tok bolesti. Takođe, opisani su i načini skrininga i ranog otkrivanja kolorektalnog karcinoma. Dalje, u uvodu je opisana klinička prezentacija, preoperativna evaluacija bolesti i određivanje stadijuma. Zasebno su opisani: kvantitativna analiza parametara digitalizovanih mikrografa i infracrvena spektroskopija, kao potencijalna nova dijagnostička i prognostička sredstva.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Sastoje se od određivanja (u odnosu na pol, starosnu dob pacijenta i stadijum tumora): morfometrijskih, teksturnih i fraktalnih analiza digitalizovanih mikrografa; koncentracije mikro- i makroelemenata u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi; parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi; koncentracija masnih kiselina u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi; dužine telomera u tumorskom tkivu kolona/rektuma, zdravoj mukozi i perifernim leukocitima; spektara apsorbiranih talasnih dužina infracrvenom spektroskopijom, čime se određuje biohemijski sastav u tumorskom tkivu kolona/rektuma i zdravoj mukozi.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka. Pacijenti uključeni u istraživanje su bili lečeni u Klinici za hirurgiju „Nikola Spasić“ Kliničko-bolničkog centra Zvezdara. Morfometrijska, teksturna i fraktalna analiza je bila sprovedena u Institutu za fiziku u Beogradu, kao i analiza uzoraka infracrvenom spektroskopijom. Merenje koncentracije mikroelemenata i makroelemenata je bilo sprovedeno u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa. Parametri oksidativnog i nitrozativnog stresa su određivani u Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Koncentracija masnih kiselina je merena u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Merenje dužine telomera u tkivnim uzorcima i uzorcima krvi rađeno je u Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Detaljno je opisan dizajn studije, uključujući i isključujući kriterijumi. Ova studija je sprovedena u skladu sa principa Dobre Kliničke Prakse, a odobrena je i od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj: 1322/III-13, datum: 17.3.2021.), kao i Etičkog odbora Kliničko-bolničkog centra Zvezdara (datum: 29.06.2016.). Sve analize, korišćene za merenje parametara definisanih ciljevima istraživanja su detaljno i na razumljiv način opisane.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 379 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate, kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „**Biohemijska karakterizacija tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma**“, autora **dr Jovana Juloskog**, konstatujemo da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 16%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je navođenja citata, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

U ovom istraživanju su pronađene značajne promene u koncentracijama mikro- i makro-elemenata, pre svega natrijuma, kalijuma, magnezijuma, kalcijuma, bakra, cinka, selena, mangana, kadmijuma, hroma i žive u tumorskom tkivu kolorektalnog karcinoma u odnosu na zdravu mukožu. Naime, u tumoru su značajno veće koncentracije kalijuma, magnezijuma, bakra, selena i kalcijuma, dok su natrijum, cink, kadmijum, živa i hrom u značajno manjoj koncentraciji u odnosu na zdravo tkivo. Ostali ispitivani elementi, mangan, gvožđe, aluminijum, olovo, uranijum, arsen, kobalt, nikl i kalaj, nisu pokazali značajnu razliku u koncentracijama. Pokano je i da je odnos bakar/cink značajno veći u tumorskom tkivu nego u zdravoj mukozi, kao i da pacijenti u više uznapredovalim stadijumima karcinoma takođe imaju veći odnos bakar/cink. Zato je predložen potencijalni značaj odnosa bakar/cink kao prognostičkog faktora za invazivnost i progresiju kolorektalnog karcinoma. Dalje, ispitivanjem parametara

oksidativnog i nitrozativnog stresa, ovo istraživanje je pokazalo značajno veće koncentracije malondialdehida u tumorskom tkivu u odnosu na zdravu mukožu, dok nije bilo razlike u koncentracijama, tj. aktivnosti katalaze ni u koncentracijama azot monoksida. Takođe je ukazano na značajno veće koncentracije serumske mokraćne kiseline kod muškaraca u odnosu na žene, i pozitivnu korelaciju nivoa serumske mokraćne kiseline sa relativnom dužinom telomera u leukocitima periferne krvi. Ispitivanjem sastava masnih kiselina pronađene su značajne razlike u sastavu masnih kiselina između tumorskog tkiva i zdrave mukože: nije bilo razlike u koncentracijama palmitoleinske kiseline između tumorskog tkiva i zdrave mukože, ali je to jedina masna kiselina čiji je sadržaj zavisio od stadijuma tumora; pokazan je značajno veći odnos AA/EPA u tumorskom tkivu, što potvrđuje da je inflamatorno okruženje tumora nezaobilazan faktor u neoplastičnom procesu, podstičući proliferaciju, preživljavanje i migraciju malignih ćelija. Zato je predložen AA/EPA odnos kao pouzdaniji pokazatelj inflamatornog statusa tumora i njegove progresije; veće vrednosti saturacionog indeksa govore u prilog biološki manje agresivnog tumora i jačeg imunskog odgovora. Ispitivanjem dužine telomera, rezultati su pokazali da su najduže telomere u tumorskom tkivu, značajno duže nego u zdravoj mukoži i leukocitima periferne krvi, dok su najkraće telomere bile u zdravoj mukoži. Uzimajući u obzir stadijum tumora, C1 gradus modifikovane Astler-Coller skale je pokazao najkraće telomere u odnosu na više i niže stadijume. Takođe je pokazana pozitivna korelacija između relativne dužine telomera između tumorskog tkiva i zdrave mukože. Osim toga, pokazana je i negativna korelaciju između relativne dužine telomera između leukocita periferne krvi i godina života pacijenata. Kvantitativnom karakterizacijom strukturnih i teksturnih parametara hromatina, nakon digitalizacije patohistoloških mikrografa i izdvajanja jedra ćelija iz tumorskog tkiva, uočene su značajne razlike u vrednostima pojedinih parametara između prvog i drugog stadijuma sa jedne strane, i trećeg i posebno četvrtog sa druge. U prvom i drugom stadijumu bi se lako moglo automatski izdvojiti tumorsko tkivo odnosno zdrava mukoža, dok, posebno u četvrtom stadijumu, karakterizacija daje sličan rezultat i za tumorsko tkivo i za zdravu mukožu. Prikazane su različite spektralne karakteristike zdravog i kancerogenog tkiva u ovoj disertaciji. Na osnovu toga, u malignim tkivima prisutna je manja količina lipida, kao i nukleinskih kiselina, dok se količina prisutnih molekula proteina uvećava.

Promene u sastavu elemenata, proinflamatornih parametara, masnih kiselina i telomera, koje je ovo istraživanje pokazalo, jasno ukazuju da je tkivo kolorektalnog karcinoma metabolički veoma aktivno i izmenjenih fizioloških procesa. Rezultati koji su dobijeni će doprineti boljem

razumevanju svih ovih promena. Veoma je važna dalja i detaljna karakterizacija tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma, sve do molekularnog nivoa. Sa boljim razumevanjem ovih procesa pružiće se nove mogućnosti u ranijoj dijagnostici i efikasnijem lečenju pacijenata. Kao relativno novu metodu izneta je i infracrvenu spektroskopiju, koja se nameće kao nov alat u ranom otkrivanju kolorektalnog karcinoma, ne samo u laboratorijskom, već i u kliničkom radu. Dodatno, ispitana je i mogućnost upotrebe strukturnih i teksturnih parametara jedara ćelija, kako u tumorskom tkivu tako i u zdravoj mukozi, za raspoznavanje tkiva i stadijuma. Ove metode bi se mogle primeniti u kompjuterizovanom pregledu histopatoloških mikrografa.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Esencijalni elementi kao što su Se (rezultati ove disertacije su pokazali veći nivo u tumorskom tkivu) i Zn (veći nivo u zdravom tkivu) imaju značajnu ulogu u imunološkom statusu (Prasad, 2014, Kipp, 2020), i utvrđivanje njihovog viška ili manjka može imati potencijalni prognostički značaj kod malignih bolesnika. Pokazano je da cink može da prouzrokuje zastoj u rastu ćelija KRK time što narušava stabilnost ćelijskih mikrotubula i stabilizuje nivoe divljeg tipa proteina adenomatozne polipoze kolona (APC protein) (Jaiswal i sar., 2004). U sličnim studijama postoje razlike u nivoima cinka između tumorskog i zdravog tkiva, gde neke od tih studija nisu pronašle značajnu razliku (Lavilla i sar., 2009, Rinaldi i sar., 2015), dok je jedna novija studija iznela podatke o nižim nivoima cinka u tumorskom tkivu (Sohrabi i sar., 2018). Iznešena je pretpostavka, da se u metastazama KRK u jetri u odnosu na zdravo tkivo jetre, niže koncentracije cinka mogu objasniti povećanim iskorišćavanjem cinka od strane tumorskih ćelija, kao i izmenama u transporterima cinka (Gurusamy i sar., 2007, Gurusamy i sar., 2008), te ovaj mehanizam bi mogao da objasni i niže koncentracije cinka u tumorskom tkivu i u ovoj studiji. Kao i u jednoj prethodnoj, sličnoj studiji, i ovo istraživanje je pokazalo značajno veće koncentracije bakra u malignom tkivu (Juloski i sar., 2020, Lavilla i sar., 2009). Druge studije su pokazale povišene vrednosti koncentracije bakra u različitim humanim tumorima, uključujući tumor dojke i limfome, i mnoge od njih su isticale ulogu bakra u angiogenezi, krucijalnom događaju u razvoju karcinoma (Lavilla i sar., 2009, Folkman i sar., 1985, Nasulewicz i sar., 2004, Brem i sar., 1999). Takođe je, u studiji koja je istraživala i bakar, između ostalih elemenata, kod karcinoma štitaste žlezde i njenih benignih oboljenja, pronađen značajno veći serumski nivo

bakra u grupi pacijenata za karcinomom štitaste žlezde u odnosu na grupu sa benignim stanjima štitaste žlezde (Dragutinović i sar., 2014). U prethodnim studijama je primećeno da je odnos Cu/Zn u serumu povećan u KRK-u i mogao bi biti dobar prediktor za invazivnost i prognozu određenih karcinoma (Gupta i sar., 2005, Khoshdel i sar., 2016, Ribeiro i sar., 2016). Ovaj odnos je i u ovoj studiji izmeren u KRK i u susednom zdravom tkivu. Koliko znamo, nijedna druga studija nije uporedila ovaj odnos u malignom i zdravom tkivu (Juloski i sar., 2020). Odnos Cu/Zn je bio značajno veći u malignom tkivu u ovoj studiji, a takođe je bio veći kod muškaraca, kako kod starijih tako i kod sredovečnih. Kod ženskih pacijenata razlika u odnosu Cu/Zn između malignog tkiva i zdravog tkiva nije bila značajna. Uloga odnosa bakra i cinka u tkivu KRK-a zahteva dodatna istraživanja, ali rezultati ove studije ukazuju na to da bi, poput serumskog Cu/Zn odnosa, ovaj odnos u tkivu takođe mogao biti dobar prediktor agresivnosti karcinoma i, verovatno, loše prognoze (Juloski i sar., 2020). Ovo istraživanje pokazalo je značajno veću koncentraciju selena u malignom tkivu u poređenju sa susednim zdravim tkivom (Juloski i sar., 2020), što je u skladu sa rezultatima sličnih studija (Lavilla i sar., 2009). U ovoj studiji nije bilo razlika u koncentracijama gvožđa (Fe) i mangana (Mn) između malignog i zdravog tkiva creva (Juloski i sar., 2020), iako su druge studije pokazale značajno niže koncentracije gvožđa i više nivoa mangana u kolorektalnom karcinomu (Lavilla i sar., 2009, Sohrabi i sar., 2018, Wurzelmann i sar., 1996, Drake i sar., 1989). Ovo istraživanje je pokazalo značajno niže nivoa natrijuma u tumorskom tkivu u odnosu na zdravu mukozu (Juloski i sar., 2020). Pretraživanjem dostupne literature nisu pronađene druge studije koje su se bavile merenjem natrijuma u tumorskom tkivu. Kalijum je bio značajno veći u malignom tkivu u poređenju sa zdravim susednim tkivom u ovoj studiji (Juloski i sar., 2020). Postoji veliki broj radova koji se bavio nivoima kalijuma u kolorektalnom karcinomu. Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa onima iz prethodne dve studije (Lavilla i sar., 2009, Gregoriadis i sar., 1983) koje su, između ostalih, istraživale nivoa kalijuma u tkivu KRK u poređenju sa zdravim kolorektalnim tkivom. U ovoj studiji nivoi magnezijuma bili su veći u tumorskom tkivu u poređenju sa susednim zdravim tkivom (Juloski i sar., 2020). In vitro studije su pokazale unutarćelijsku akumulaciju magnezijuma u neoplastičnim ćelijama (Sara i sar., 2012). Prethodni rezultati, koji povezuju Mg sa angiogenezom, posebno sa funkcijama vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i migracijom endotelnih ćelija (Lapidos, 2001). Budući da je angiogeneza jedno od obeležja karcinoma (Hanahan i sar., 2011), odnos između povišenog Mg u tkivu KRKa i ovog, ključnog procesa za rast tumora i njegovu malignu transformaciju, treba uzeti u obzir. U ovom istraživanju nivo hroma (Cr) bio je značajno niži u tumorskom tkivu u poređenju sa

zdravim tkivom. Nije bilo razlika u nivoima Cr malignog tkiva između muškaraca i žena ili između različitih starosnih grupa u ovom istraživanju. Nedavna studija pokazala je veće nivoe Cr u tkivu KRK u poređenju sa zdravim susednim tkivom (Sohrabi i sar., 2018). S druge strane, Rinaldi i saradnici su prikazali rezultate u kojima nema razlike u nivoima Cr između kancerogenog tkiva i zdravih kontrola, kao i niže nivoe Cr u KRK tkivu u poređenju sa susednim zdravim tkivom (Rinaldi i sar., 2017). Postoji veliki broj studija koje su ispitivale razlike u nivoima žive (Hg), olova (Pb) i arsena (As) između zdravog i malignog kolorektalnog tkiva. U ovoj studiji, nivoi žive bili su značajno manji u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom, dok nije bilo značajnih razlika u nivoima Pb i As između zdravog i malignog tkiva debelog creva (Juloski i sar., 2020). Izloženost žive označena je kao faktor rizika za kolorektalni karcinom i predloženo je da viši nivoi Hg i Pb mogu da promovišu pojavu i progresiju gastrointestinalnog karcinoma, što je pokazano u nedavnoj kineskoj studiji (Lin i sar., 2018). Nivoi kadmijuma (Cd) bili su značajno niži u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom u ovoj studiji (Juloski i sar., 2020). Cd je verifikovani kancerogen za ljude (Boffeta i sar., 1993). Veruje se da je ovaj element uključen u različite procese kao što su stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), inhibicija apoptoze, inhibicija mehanizma popravljavanja DNK i supresija ekspresije gena (Bishak i sar., 2015). Pokazalo se da je nivo Cd povišen u tkivima karcinomima dojke i pluća u poređenju sa zdravim kontrolama (Mateo i sar., 1990, Ionescu i sar., 2006), ali druge studije nisu pokazale razlike u nivoima Cd u jetri (Mai i sar., 2006). S druge strane, nema mnogo studija koje su istraživale njegovu ulogu u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma. Jedna studija (Alimonti i sar., 2008) je otkrila niže nivoe Cd u kolorektalnim polipima, za koje se zna da nose rizik od maligne transformacije u kolorektalni karcinom (Grady i sar., 2015).

U ovoj studiji je pokazana značajna razlika u serumskoj koncentraciji mokraćne kiseline, gde su je muškarci imali značajno više u odnosu na žene, a značajna razlika se pokazala u četiri formirane grupe po polu i godinama, gde su stariji i sredovečni muškarci imali značajno više vrednosti u odnosu na starije i sredovečne žene. Ovi rezultati se poklapaju sa drugim studijama koji su ispitivali nivo mokraćne kiseline kod drugih, nemalignih oboljenja, u kojima su muškarci imali veće vrednosti, i da su mlađi muškarci imali nešto veće vrednosti od starijih ispitanika (Kawamoto i sar., 2018, Park i sar., 2019, Liu i sar., 2020). Pokazana je razlika u koncentraciji malondialdehida (MDA) između tumorskog tkiva i zdrave mukoze, gde je u tumorskom tkivu bilo značajno većih količina MDA. U malignom tumorskom tkivu dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika, porasta oksidativnog stresa, peroksidacije

lipida i stvaranja njenih metabolita, kao što je MDA, što potvrđuju studije koje su ispitivale tkivo kolorektalnog karcinoma kod ljudi (Zińczuk i sar., 2019, Zińczuk i sar., 2020, Skrzydlewska i sar., 2005). Osim u tkivima, kod pacijenata sa KRK-om dolazi i do porasta MDA u serumu (Leung i sar., 2008). Nije ispitivan nivo serumskog MDA, ali se rezultati istraživanja poklapaju sa rezultatima prethodnih studija da se kod pacijenata nalazi značajno veća koncentracija MDA u tkivima tumora kolona/rektuma u odnosu na zdravu mukožu. Ovo istraživanje je potvrdilo činjenicu da u tumorskom tkivu dolazi do promene u metabolizmu ćelije, kao i do povećane peroksidacije lipida. Osim koncentracije MDA ispitivana je i aktivnost katalaze u uzorcima, međutim za razliku od drugih studija (Zińczuk i sar., 2020, Skrzydlewska i sar., 2005) koje su pokazale razliku u aktivnosti katalaze, između uzoraka pacijenata ovog istraživanja nije bilo statistički značajne razlike. U ovom istraživanju nije bilo značajne razlike u koncentraciji NO između tumorskog tkiva i zdrave mukoze. Takođe, T, N i M stadijumi tumora nisu uticali na koncentraciju NO u uzorcima, niti je bilo razlike između gradusa prema AJCC i MAC skali. Prema našim saznanjima ovo je prva studija koja je ispitivala direktno koncentraciju NO u tkivima malignog tumora, jer su sve dosadašnje studije ispitivale stepen ekspresije različitih formi NOS (Choudhari i sar., 2013, Wang i sar., 2020), i prema tome tumačili uticaj NO na razvoj tumora.

Prethodna saznanja su dokazala da je pojačana lipogeneza povezana sa razvojem tumora (Beloribi-Djefafia i sar., 2016). Povećana aktivnost sintaze masnih kiselina (FASN) dovodi do obilja zasićenih masnih kiselina (SFA), koje se zatim ugrađuju u membranske fosfolipide (PHL). Ova akumulacija SFA smanjuje fluidnost ćelijske membrane, čineći je manje podložnom dejstvu slobodnih radikala i prodiranju terapeutika (Rysman i sar., 2010). Zhang i saradnici su pokazali povišeno prisustvo stearinske kiseline u kanceroznom tkivu, ali bez promena uSFA kraćih lanaca (miristinska i palmitinska kiselina) (Zhang i sar., 2013). Ovi rezultati su u skladu sa nalazima ove disertacije. Palmitinska kiselina, masna kiselina dugog lanca, sa ulogom u skladištenju energije, nije se razlikovala između zdravog i tumorskog tkiva u ovoj studiji (Juloski i sar., 2021). To se podudara s rezultatima prethodnih istraživanja (Neoptolemos i sar., 1991), koji su proučavali profile masnih kiselina (MK) u kolorektalnom tumoru indukovanom azoksimetanom kod eksperimentalnih životinja. Kao što je prikazano u istraživanju Neoptolemosa, i ovde je pronađena značajno veća koncentracija stearinske kiseline u tkivu KRK u odnosu na zdravu sluznicu ($p = 0.000$); što je u suprotnosti sa nekim ranijim studijama (Hendrickse i sar., 1994). Različite studije su pokazale da se polinezasićene masne kiseline različito metabolišu u zdravim i tumorskim ćelijama; normalne ćelije

metabolizmom PUFA proizvode zaštitne lipide, dok ćelije tumora stvaraju toksične hidroperoksi masne kiseline (Das i sar., 2011, Mansara i sar., 2015). Ova disertacija pokazuje povećan sadržaj PUFA kod pacijenata sa KRK-om, što su prethodno pokazali Berstad i kolege kod mlađih osoba sa kolorektalnim karcinomom (Berstad i sar., 2012). Rezultati ove disertacije su pokazali značajno veće nivoe omega-3 i omega-6 kiselina u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom, ali je odnos omega-6/omega-3 bio značajno veći u zdravom tkivu. Slični rezultati objavljeni su i ranije (Berstad i sar., 2012, Neoptolemos i sar., 1991), međutim, važnost odnosa n-6/n-3 nije toliko velika, kako pretpostavljaju mnogi istraživači. Uopšteno se veruje da je niži odnos n-6/n-3 povezan sa smanjenim rizikom za mnoge poremećaje, uključujući karcinom, što je više puta potvrđeno. Ipak, postoje studije koje osporavaju ovu tvrdnju (Berstad i sar., 2012, Marventano i sar., 2015). Rezultati ove disertacije su pokazali značajno veće vrednosti SI u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo, dok na vrednosti SI nisu uticali pol, starost, stepen tumora, Astler-Coller stadijum i mucinozna komponenta tumora. Međutim, pokazane su značajno veće vrednosti SI kod tumora sa izraženim peritumorskim limfocitnim odgovorom u odnosu na tumore sa odsutnim limfocitnim odgovorom, i kod tumora sa odsutnom venskom invazijom u odnosu na tumore sa prisutnom venskom infiltracijom. Poznato je da je stearinski i oleinski odnos (Saturacioni Indeks, SI) smanjen u membranama nekih vrsta neoplastičnih ćelija (Wood i sar., 1985, Habib i sar., 1987), što ova studija nije potvrdila, već je dobila suprotne rezultate. Predložena je pretpostavka da nezasićene masne kiseline održavaju strukturu, tj. fluidnost ćelijske membrane, umanjujući razne biofizičke promene štetnog dejstva, dok zasićene masne kiseline narušavaju integritet membrana, odnosno povećavaju njenu rigidnost (Hac-Wydro i sar., 2007, Leekumjorn i sar., 2009). Rezultati ove studije se mogu smatrati kao potvrda ove pretpostavke, jer uvećan SI indeks ukazuje na povećano prisustvo zasićenih masnih kiselina i narušena svojstva ćelijske membrane tumorskih ćelija. Suprotni rezultati iz prethodnih studija se odnose na ćelije tumora jetre (Wood i sar., 1985, Habib i sar., 1987), kao i na uzorke urina, i na lipidni status membrane eritrocita malignih bolesnika (Habib i sar., 1987, Amézaga i sar., 2018). Treba istaći da je, prema našim saznanjima, ova disertacija prva studija koja je istraživala vezu između SI i peritumorskog limfocitnog odgovora i venske invazije (Juloski i sar., 2021). U ovom istraživanju je pokazano da je grupa sa izraženim peritumorskim limfocitnim odgovorom imala veće vrednosti SI, a grupa sa odsutnom venskom invazijom takođe je imala veće vrednosti SI. Generalno, izraženiji peritumorski limfocitni odgovor ukazuje na bolji imunološki odgovor i bolju prognozu (Baba i sar., 2019). Takođe, venska infiltracija je pokazatelj agresivnijeg tumora (Nishibeppu i sar., 2018). Kada se uzmu u obzir

ovi rezultati, veće vrednosti SI u ovoj studijskoj grupi ukazuju na biološki manje agresivan tumor i jači imunološki odgovor, što dovodi do moguće bolje prognoze.

Ova disertacija je prva studija koja je ispitivala dužinu telomera u KRK-u u srpskoj populaciji. U ovoj studiji, srednja vrednost RTL-a bila je značajno veća u tumorskom tkivu u poređenju sa susednom zdravom sluznicom, ali je većina uzoraka (66/111) imala zapravo dužu RTL u zdravoj sluznici, a samo 45 uzoraka imalo je dužu RTL u tumorskom tkivu. Ovi rezultati su donekle uporedivi sa radom Kroupe i saradnika (Kroupa i sar., 2019), gde je 74% uzoraka imalo dužu RTL u zdravoj sluznici, a preostalih 26% je imalo dužu RTL u tumorskom tkivu, međutim njegov krajnji rezultat ipak ističe značajno duže telomere zdrave mukoze. S druge strane, drugi autori (Katayama i sar., 2019, O'Sullivan i sar., 2006) objavili su rezultate koji su pokazali ili duže telomere u karcinomskom tkivu ili telomere bez značajno različite dužine nego u polipima ili normalnom tkivu u sluznici želuca i debelog creva. Ova studija je pokazala značajno dužu RTL u uparenom tumorskom tkivu nego u PBL, a telomere u PBL su bile značajno duže nego u zdravoj sluznici kolona i rektuma; dok drugi autori nisu pronašli značajnu razliku u RTL -u između ovih uzoraka (Kroupa i sar., 2019), ili je RTL tumora bila kraća od dužine telomera PBL (Mzahma i sar., 2015).

U ovoj disertaciji je zaključeno da postoji značajna razlika u IC spektrima zdravog i bolesnog tkiva. Dobijeni spektri su pokazivali određene pikove. Pomoću kompjuterskih programa izračunate su površine ispod tih pikova koji su se nalazili u četiri oblasti sledećih talasnih brojeva: oblast I (1128-1205) cm^{-1} , oblast II (1722-1795) cm^{-1} , oblast III (2750-3055) cm^{-1} i oblast IV (1483-1722) cm^{-1} . Površina I: Proučavanje ovog frekvencijskog opsega ukazuje na značajne razlike infracrvenog spektra zdravog i bolesnog tkiva debelog creva. U ovoj oblasti se javljaju pikovi koji odgovaraju simetričnim i asimetričnim vibracijama –PO₂ funkcionalne grupe. Fosfati su zastupljeni u nukleinskim kiselinama, kao i membranskim fosfolipidima. Na osnovu poređenja sa relativnim intenzitetima ostalih gradivnih grupa fosfolipida, zaključeno je da fosfodiesteranski delovi nukleinskih kiselina daju dominantan doprinos IC spektru u ovom frekvencijskom opsegu. U malignom tkivu vodonična veza između atoma kiseonika i fosfatne baze u nukleinskim kiselinama je jača, što uslovljava da se traka koja potiče od ovih vibracija pomera ka većim talasnim brojevima u odnosu na traku kod zdravog tkiva. Smanjenje intenziteta trake upućuje na smanjen sadržaj fosfata u malignom tkivu debelog creva, što je verovatno posledica smanjene količine ugljenih hidrata. Traka relativno slabog intenziteta na 1164 cm^{-1} (u normalnom tkivu) se pripisuju vibracijama –C-O grupe prisutne u proteinima. U malignim tkivima traka ove vibracije menja svoj oblik i položaj maksimuma pika, pomerajući

opseg u kome se javlja ova traka na više vrednosti. Ona je sada razdvojena na dva maksimuma, jedan ka nižim frekvencijama, a drugi ka višim frekvencijama. Nižefrekventna traka je posledica apsorpcije IC zračenja $-C-O$ grupe koja učestvuje u građenju vodonične veze, a višefrekventna traka je prisutna kao posledica prisustva $-C-O$ grupe koja nije vezana vodoničnom vezom. Prisustvo dve trake, pomerene ka višim frekvencijama, a mnogo manjeg intenziteta su nedvosmislen pokazatelj da većina vodoničnih veza u proteinima malignog tkiva više nije postojana. Ovo ukazuje na promene u strukturi aminokiselina kao što su tirozin, serin i treonin (Sahu i sar., 2005, Rigas i sar., 1990, Rehman i sar., 2013). Takođe, u ovom intervalu se javljaju i trake od apsorpcije lanca acil grupe iz membranskih lipida. Uzimajući u obzir odnos relativnog intenziteta vibracija $-C=O$ i $-C-O$ zaključujemo da je apsorpcija acil grupe zanemarljiva (i i sar., 2017). U oblasti oko 1160 cm^{-1} se javljaju i grupne vibracije $-C-H$ funkcionalne grupe koja je prisutna u lancima ugljenih hidrata (Rehman i sar., 2013). Površina II: Prisustvo intenzivnog, oštrog pika u ovoj oblasti je veoma dobar indikator zdravog tkiva. U uzorcima ove disertacije on se javlja kod svih pacijenata, osim kod pacijenata 2 i 4. Kod malignog tkiva, vibraciona struktura spektra se značajno narušava, a intenzitet trake se hipohromno pomera. Maksimum vibracione trake na talasnom broju 1743 cm^{-1} se pripisuje vibraciji karbonilne funkcionalne grupe $-C=O$, koja je prisutna u lipidima, kao deo nezasićenih masnih kiselina. Kod malignog tkiva ova traka više nema izražen apsorpcioni maksimum, a oblast frekvencija u kom se javlja se pomera ka većim talasnim brojevima. Uzevši u obzir proporcionalnost konstante sile veze i frekvencije kojom vibriraju atomi koji grade tu vezu možemo zaključiti da je u malignom tkivu $-C=O$ veza jača. Može se pretpostaviti da je uzrok tome manji broj vodoničnih veza, koje bi odvlačile naelektrisanje sa atoma kiseonika i slabile vezu u karbonilnoj grupi (Rehman i sar., 2013). Površina III: Ovo je oblast najvećih frekvencija, na kojima se javlja apsorpcija infracrvenog zračenja od strane biomolekula prisutnih u tkivu debelog creva. U zdravom tkivu to je dublet velikog intenziteta. Kod malignog tkiva intenzitet trake primetno slabi. Ovo je oblast u kojoj apsorbuje $-C-H$ grupa. Maksimum na talasnom broju 2850 cm^{-1} se pripisuje simetričnim istezanjima $-CH_2$ u metilenskim lancima koji grade membranske lipide. Drugi pik, na nešto većoj frekvenciji 2960 cm^{-1} potiče od asimetrične istežuće vibracije $-CH_3$ (metilenske) funkcionalne grupe. Metil grupe na krajevima lanaca membranskih lipida, kao i one u proteinima imaju otprilike istu oblast apsorpcije IC zračenja, što znači da podjednako doprinose intenzitetu trake na 2960 cm^{-1} . Sa spektara malignog tkiva je uočljivo da se oblast u kojoj se javlja traka vibracije metil grupe neznatno smanjuju, dok se oblast frekvencija metilenske grupe povećava. To ukazuje da je u malignom tkivu veći broj metil grupa u

odnosu na broj metilenskih grupa. Metilenska grupa se u biomolekulima uglavnom javlja kao most između dva lanca, tako da određuje načine vezivanja lanaca i konformacije biomolekula. Zaključak je da je struktura metilenskih lanaca, koji grade lipide neuređenija kod malignog tkiva, nego kod zdravog tkiva (Artyushenko i sar., 2015). Površina IV: U oblasti ovih frekvencija spektar malignog tkiva pokazuje suprotno ponašanje od spektara prethodne tri oblasti. Intenzitet apsorpcije malignog tkiva, u ovom intervalu je veći nego kod zdravog tkiva. Ovo je oblast apsorpcije amidne grupe. Na talasnom broju 1550 cm⁻¹ se javlja amid II traka, a na 1643 cm⁻¹ amid I traka. Znatno veći intenzitet ovih traka pokazuje da maligno tkivo sadrži veći broj aminokiselina, odnosno proteina, koji su od njih izdruženi (Rigas i sar., 1990).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Juloski JT, Rakic A, Ćuk VV, Ćuk VM, Stefanović S, Nikolić D, Janković S, Trbovich AM, De Luka SR. **Colorectal cancer and trace elements alteration**. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2020 May;59:126451. doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126451. Epub 2020 Jan 11. PMID: 31954212; M22, IF 3.849

Juloski JT, Popovic T, Martacic JD, Cuk VV, S Milic Perovic M, S Stankovic M, Trbovich AM, De Luka SR. **Fatty acid in colorectal cancer in adult and aged patients of both sexes**. Journal of Balkan Union of Oncology. 2021 September-October; 26 (5). PMID: 34761598. ISSN:1107-0625; M23, IF 2.533

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Na osnovu analize priložene disertacije, članovi komisije smatraju da je doktorska disertacija „**Biohemijska karakterizacija tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma**“, kandidata dr Jovana Juloskog, značajna i aktuelna i da u potpunosti ispunjava uslove za originalan naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na ispitivanje biohemijske karakterizacije tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma. Navedena disertacija pruža značajan doprinos u razumevanju navedenih analiza, a na osnovu prikazanih rezultata ovog istraživanja, ukazuje na njihov potencijalni značaj u efikasnijoj i preciznijoj dijagnozi i prognozi kolorektalnog karcinoma. Uzimajući u obzir složenost patogeneze kolorektalnog karcinoma i porast prevalencije KRK širom sveta, ovo istraživanje pruža ohrabrujuće podatke i predstavlja osnovu za planiranje

budućih studija koje bi imale za cilj detaljnije ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog značaja navedenih analiza i njihovu potencijalnu primenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Doktorska disertacija „**Biohemijska karakterizacija tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma**“ je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Jovana Julskog i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 07.07.2022.

Članovi Komisije:

Prof. dr Aleksandar Karamarković

Prof. dr Branka Popović

VNS dr sci. Tamara Popović

VNS dr sci. Saša Janković

Mentor:

Prof. dr Silvio de Luka

Prof. dr Miroslav Stojanović
