

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04.2016. godine, broj 5940/4 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Analiza glija indeksa i Kahalovih ćelija u biopsijama debelog creva kod dece sa Hiršprungovom bolešću i srodnim oboljenjima”

kandidata mr dr Radmile Janković, zaposlene na Katedri patologije Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao lekar specijalista patološke anatomije i stručni saradnik van nastave. Mentor doktorske disertacije je prof. dr Milica Skender-Gazibara, redovni profesor na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, a komentor prof. dr Sanja Sindić-Antunović, vanredni profesor na Katedri hirurgije (dečija hirurgija) Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Za članove komisije za ocenu završene doktorske disertacije određeni su:

1. Prof. dr Zorica Stojšić, redovni profesor, Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Marija Lukač, vanredni profesor, Univerzitetska dečija klinika, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Doc. dr Slaviša Đuričić, docent, Medicinski fakultet, Banja Luka

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 mr sci Radmile Janković napisana je na 106 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 10 grafikona, 16 tabela i 31 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

Uvod je napisan na 18 strana i sadrži 5 slika i 2 tabele. Podeljen je u šest delova koji su napisani jasno i koncizno. U prva tri dela prikazana je osnovna morfologija gastrointestinalnog trakta, enteričkog nervnog sistema i intersticijskih Kahalovih ćelija. U četvrtom delu su prikazani različiti pristupi analizi elemenata enteričkog nervnog sistema i intersticijskih Kahalovih ćelija. U petom delu je prikazana klasifikacija disganglioneza, a šesti deo je posvećen Hiršprungovoj bolesti kao najčešćem obliku disganglioneze. U ovom delu je opisana patogeneza Hiršprungove bolesti sa osvrtom na genetsku osnovu bolesti i dati su literaturni podaci o incidenciji ove bolesti u različitim delovima sveta, kao i njena distribucija u odnosu na pol i varijantu bolesti. Prikazane su kliničke manifestacije Hiršprungove bolesti, a posebna pažnja je posvećena njenoj dijagnostici. U okviru ovog dela su izloženi i najvažniji podaci u vezi sa terapijom i prognozom Hiršprungove bolesti.

Ciljevi rada su napisani na jednoj strani. Precizno i jasno su definisana četiri glavna cilja: 1. Određivanje vrednosti glija indeksa u submukoznom i mijenteričkom nervnom pleksusu u biopsijama debelog creva kod dece sa hroničnom opstipacijom i u kontrolnoj grupi, 2. Određivanje vrednosti glija indeksa u normoganglijskom segmentu na proksimalnoj liniji resekcije debelog creva kod dece operisane zbog Hiršprungove bolesti u odnosu na dužinu trajanja opstipacije pre postavljanja dijagnoze, 3. Analiza broja i distribucije Kahalovih ćelija primenom imunohistohemijskog bojenja u biopsijama debelog creva kod dece sa hroničnom opstipacijom i u kontrolnoj grupi i 4. Ispitivanje broja i distribucije Kahalovih ćelija u normoganglijskoj i tranzicionoj zoni u Hiršprungovoj bolesti i analiza dobijenih vrednosti u odnosu na dužinu trajanja opstipacije pre operacije.

Poglavlje **Materijal i metode** je napisano na četiri strane. Podeljeno je u tri celine. U prvom delu su definisani i opisani eksperimentalna i kontrolna grupa. Ovaj deo sadrži jednu sliku. U drugom delu su prikazane karakteristike antitela korišćenih za imunohistohemijska bojenja. U trećem delu je detaljno opisana morfometrijska analiza submukoznog i mijenteričkog nervnog plexusa sa posebnim osvrtom na indeks glija ćelija, kao i analizu intersticijskih Kahalovih ćelija u različitim slojevima zida creva.

Poglavlje **Rezultati** je napisano na 47 strana i sadrži originalne rezultate dobijene u ovom istraživanju. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani kroz 25 slika, 14 tabela i 10 grafikona, uz dodatna objašnjenja u pratećem tekstu i sistematizovani su u skladu sa ciljevima istraživanja.

Diskusija je napisana jasno i pregledno na 18 strana, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci su napisani na dve strane gde sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 164 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U ovom istraživanju je pokazano da u mijenteričkom plexusu tranzicione zone Hiršprungove bolesti postoji ne samo redukcija broja ganglijskih ćelija, već i redukcija broja glija ćelija. Takođe je pokazano da je redukcija glija ćelija u mijenteričkom plexusu tranzicione zone izraženija u odnosu na redukciju broja ganglijskih ćelija, što se manifestuje nižim glija indeksom u mijenteričkom plexusu ove zone. Na osnovu ROC analize pokazano je da mijenteričke ganglije u tranzicionoj zoni sadrže prosečno manje od dve ganglijske ćelije po gangliji, a da je prosečan odnos glija i ganglijskih ćelija u ovoj zoni manji od 5,8. Nije nađena korelacija između vrednosti glija indeksa u normoganglijskoj zoni i uzrasta pacijenata, to jest dužine trajanja simptoma pre operacije. Vrednosti glija indeksa pacijenata sa Hiršprungovom bolešću u normoganglijskoj zoni i u kontrolnoj grupi odgovarajućeg uzrasta, se nisu značajno razlikovale.

U istraživanju su primenjena različita imunohistohemijska bojenja za ganglijske i glija ćelije. Antitelo na kalretinin je korisno u isključivanju aganglionarne zone. Kalretinin pozitivna intrinzična nervna vlakna se u tranzicionoj zoni uočavaju bar fokalno u lamini propriji mukoze, što je i najčešći obrazac vizualizacije intrinzičnih nervnih vlakana u ovoj zoni. U normoganglijskoj zoni najčešće postoji difuzna ekspresija kalretinin pozitivnih intrinzičnih nervnih vlakana u lamini propriji mukoze. U istraživanju je uočena intenzivnija ekspresija kalretinina u ganglijskim ćelijama submukoznog pleskusa u odnosu na mijenterički pleskus u obe ispitivane zone resećiranog creva zbog Hiršprungove bolesti, kao i u kontrolnoj grupi. U mijenteričkim ganglijama su uočene pojedinačne kalretinin negativne ganglijske ćelije u normoganglijskoj zoni i kontrolnoj grupi pored kalretinin pozitivnih ćelija koje su pokazivale različite nivoe ekspresije kalretinina. Pojedinačne ganglijske ćelije u tranzicionoj zoni su po pravilu bile kalretinin negativne. Za razliku od kalretinina, u ovim ganglijskim ćelijama je uvek postojala imunoekspresija MAP-2 antitela. Nivo ekspresije MAP-2 u ganglijskim ćelijama je manje varirao u odnosu na kalretinin. Za vizualizaciju glija ćelija se bolje pokazalo S100 β antitelo u odnosu na GFAP: Ekspresija S100 β je bila prisutna u statistički značajno većem broju glija ćelija u odnosu na GFAP.

U istraživanju je pokazano da u Hiršprungovoj bolesti postoji značajna redukcija Kahalovih ćelija u obe ispitivane zone (normoganglijskoj i tranzicionoj). Pokazano je da je redukcija broja Kahalovih ćelija ispod 60% u odnosu na minimalne vrednosti ustanovljene u kontrolnoj grupi odgovarajućeg uzrasta bila klinički značajna jer su se samo u tim slučajevima javile postoperativne tegobe (opstipacija i enterokolitis). U slučajevima sa i bez postoperativnih tegoba nije nađena statistički značajna razlika u vrednosti glija indeksa u normoganglijskoj zoni.

Istraživanjem je obuhvaćeno i deset slučajeva biopsija pune debljine zida creva kod dece sa hroničnom opstipacijom. I u ovim slučajevima primenjena su imunohistohemijska bojenja i izračunate vrednosti glija indeksa i Kahalovih ćelija. Analizom biopsija debelog creva sa uobičajenim nalazom nervnih pleskusa na rutinskoj dijagnostici, nalazom imaturnih ganglijskih ćelija ili ektopičnih ganglija, nisu ustanovljene abnormalnosti u glija indeksu i intersticijskim Kahalovim ćelijama. U slučaju gde je na rutinskoj dijagnostici primećen veći broj glija ćelija u odnosu na ganglijske ćelije u mijenteričkim ganglijama, glija indeks je bio

povećan, a u slučaju hipoganglionoze indeks glija ćelija je bio smanjen. U oba slučaja distribucija i broj Kahalovih ćelija su bili očuvani.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati istraživanja su sistematično, redosledom kojim su prikazani, upoređivani sa rezultatima drugih autora u poglavlju Diskusija.

U ovom istraživanju je analiziran broj ganglijskih ćelija na preparatima bojenim različitim antitelima. Broj ganglijskih i glija ćelija na analiziranim presecima je varirao u zavisnosti od primenjenog antitela, kao što su primetili i drugi autori (Ippolito et al., 2009.; Hoff et al, 2008.). Pored toga, broj ganglijskih ćelija zavisi i od dela gastrointestinalnog trakta i od uzrasta (Knowle et al, 2011.). Rezultati prethodne studije (Hoff et al, 2008.) ukazuju na to da u različitim delovima gastrointestinalnog trakta (ileumu, ascendentnom i sigmoidnom kolonu) postoje najmanja odstupanja u glija indeksu (indeksu glija ćelija, IGĆ), što je uzeto kao pretpostavka i u ovom istraživanju. Indeks glija ćelija je do sada analiziran samo u pojedinim bolestima kao što su divertikuloza creva (Bassotti et al., 2005; Wedel et al., 2010.) i inflamatorna bolest creva (Villanacci et al., 2008.). Ovo je prva studija u kojoj je analiziran indeks glija ćelija u normoganglijskoj i tranzicionoj zoni u Hiršprungovoj bolesti. Pokazano je da je indeks glija ćelija u tranzicionoj zoni bio statistički značajno niži u odnosu na normoganglijsku zonu i da bi vrednosti glija indeksa niže od 5,8 sa velikom verovatnoćom išle u prilog dijagnoze tranzicione zone. U ovoj studiji je pokazano da je vrednost glija indeksa nezavisna od uzrasta deteta (od dužine trajanja opstipacije). S druge strane, broj ganglijskih ćelija u mijenteričkom pleksusu u tranzicionoj zoni Hiršprungove bolesti je bio statistički značajno niži, što je i očekivano (Kapur et al., 2012., Knowles et al., 2011., Schäppi et al., 2013). Do sada se niko nije posebno bavio brojem glija ćelija u tranzicionoj zoni iako se zna da glija ćelije imaju veliki značaj za pravilno funkcionisanje ENS-a (De Giorgio et al., 2012.).

Imunoekspresija kalretinina u intrinzičkim nervnim vlaknima lamine proprije u normoganglijskoj i tranzicionoj zoni je bila u saglanosti sa drugim autorima (Barshack et al., 2004; Morris et al., 2013.; Bachman et al., 2015.). Iako su pojedini autori opisali samo

postojanje jake jedarne i citoplazmatske pozitivnosti u ganglijskim ćelijama (Hiradfar et al., 2012.; Guinard-Samuel et al., 2009.; Kapur R, 2006.), u ovoj studiji je detaljno opisana različita ekspresija kalretinina u ganglijskim ćelijama submukoznog i mijenteričkog pleksusa. Varijabilnu ekspresiju kalretinina u ganglijskim ćelijama (posebno u mijenteričkom pleksusu) opisali su i drugi autori (Kustermann et al., 2011; Beuscher et al., 2014.).

Rezultati analize intersticijskih Kahalovih ćelija u Hiršprungovoj bolesti drugih autora su kontroverzni (Gfroerer et al., 2013.; Newman et al., 2003; Rolle et al., 2002; Wang et al., 2009; Bettolli et al., 2008.). U ovom istraživanju je ustanovljeno da je broj intersticijskih Kahalovih ćelija u normoganglijskoj zoni bio značajno manji u odnosu na kontrolnu grupu. Slično zapažanje su imali i drugi autori (Rolle et al., 2002), iako najveći broj istraživača nije uočio značajnu redukciju u broju intersticijskih Kahalovih ćelija u normoganglijskoj zoni pacijenata sa urednim postoperativnim tokom (Bettilli et al., 2008; Taguchi et al., 2005). Ovo istraživanje je potvrdilo rezultate pojedinih autora (Taguchi et al., 2005; Anatol et al., 2008.) da izrazita redukcija intersticijskih Kahalovih ćelija u normoganglijskoj zoni može biti uzrok postoperativnih tegoba (opstipacije i enterokolitisa) u slučaju kada su isključene abnormalnosti enteričkog nervnog sistema.

Imunohistohemijska i morfometrijska analiza su sprovedene i u odabranim slučajevima Hiršprungu sličnih stanja (heterotopija ganglijskih ćelija, hipoganglionozna, imaturna ganglijska ćelija, hiperplazija glija ćelija), kao i u četiri slučaja sa odgovarajućom morfologijom nervnih pleksusa na rutinskoj dijagnostici. Vrednosti glija indeksa nisu odstupale od prethodno dobijenih vrednosti u normoganglijskoj zoni Hiršprungove bolesti i kontrolnoj grupi, izuzev u dva slučaja gde se radilo o hiperplaziji glija ćelija (veća vrednost mijenteričkog glija indeksa) i hipoganglionozni (niža vrednost glija indeksa u odnosu na dobijene referentne vrednosti). Ni u jednom od ovih slučajeva nije uočena značajna redukcija broja Kahalovih ćelija. Da bi motilitet creva bio odgovarajući neophodno je prisustvo svih elemenata enteričkog nervnog sistema (glija i ganglijskih ćelija) i Kahalovih ćelija u adekvatnom broju, i njihov koordinisan rad (Wedel et al., 2010; Villanacci et al., 2008.; Breuer C, 2012.; Bassotti et al., 2013; Yu et al., 2002.). U debelom crevu Kahalove ćelije grade gustu mrežu koja je najgušća u zoni mijenteričkog pleksusa (Gfroerer et al., 2013.).

U radu je posebno prikazan slučaj udruženosti Hiršprungove bolesti sa kompleksnom disganglionozom. Pored glavne karakteristike ove disganglionoze - hipoganglionoze, uočena je izražena imaturnost ganglijskih ćelija, kao i veći broj ektopičnih ganglija i brojni snopovi nervnih vlakana u submukozi. Glija indeks u ovom slučaju je bio niži od referentnih vrednosti, a takođe je uočen i redukovan broj Kahalovih ćelija. Pored abnormalnosti nervnih pleksusa, uočeni su prekobrojni snopovi mišićnih vlakana uz cirkularni mišićni sloj i abnormalni krvni sudovi. Osobitost opisanog slučaja je i kompleksnost ove anomalije koja ukazuje na značaj koordinisanog razvoja nervnih pleksusa, mišićnog omotača creva i Kahalovih ćelija (Wallace et al., 2005.).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Jankovic RM, Djuricic SM, Sindjic-Antunovic SM, Lukac MK, Skender-Gazibara MK. Additional criteria in diagnosis of transitional zone in Hirschsprung disease. Int J Clin Exp Pathol 2016 (in press), M23, IF 1,581.

E) ZAKLJUČAK (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Analiza glija indeksa i Kahalovih ćelija u biopsijama debelog creva kod dece sa Hiršprungovom bolešću i srodnim oboljenjima**” kandidata mr sci med Radmile Janković predstavlja originalni naučni doprinos u oblasti poremećaja motiliteta creva.

Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da određivanje vrednosti glija indeksa može predstavljati važan kriterijum za razlikovanje normoganglijske i tranzicione zone u Hiršprungovoj bolesti kod hirurške resekcije. U ovom istraživanju je pokazan veliki značaj imunohistohemijskih bojenja koja značajno doprinose kvalitetu histopatološke analize u intestinalnim neuropatijama. Rezultati analize Kahalovih ćelija u Hiršprungovoj bolesti u normoganglijskoj zoni na liniji resekcije ističu da izrazita redukcija ovih ćelija može biti uzrok postoperativnih tegoba u slučajevima gde je status nervnih pleksusa creva odgovarajući.

Ova doktorska disertacija 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 Radmile Janković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 23.06. 2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Zorica Stojšić

Prof. dr Marija Lukač

Doc. dr Slaviša Đuričić

Mentor:

Prof. dr Milica Skender-Gazibara

Komentor:

Prof. dr Sanja Sinđić-Antunović