

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Strukturne i celularne promene nezahvaćene sluznice debelog creva osoba sa adenokarcinomom kolona “

kandidata dr Sanje Despotović, zaposlene na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Živana Milićević, komentor je prof. dr Dragoslav Milošević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Miljana Obradović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Svetislav Tatić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Akademik Miodrag Čolić

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Sanje Despotović napisana je na ukupno 174 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 69 tabela, 24 grafikona i 28 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je prikazana histološka građa zdravog debelog creva, sa posebnim osvrtom na sluznicu debelog creva: epitel i laminu propriju. Opisani su glavni tipovi ćelija u epitelu sluznice debelog creva, sa naglaskom na enterocitima i peharastim ćelijama. Detaljno su prikazane morfološke i funkcionalne karakteristike svih tipova ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva: fibroblasta i miofibroblasta, makrofaga, dendritskih ćelija, B-limfocita i plazma ćelija i T-limfocita. Opisana je organizacija ekstracelularnog matriksa lamine proprije

sluznice debelog creva, kako vezivno-tkivnih vlakana tako i osnovne supstance. Opisan je značaj ekstracelularnog matriksa lamine proprije sluznice debelog creva, ne samo u pružanju mehaničke potpore, već i u migraciji ćelija.

Ukazano je na učestalost karcinoma debelog creva i značaj skrininga, rane dijagnoze i brze terapije.

Detaljno su opisana dosadašnja saznanja o interakcijama između tumorskih ćelija i strome tumora. Ukazano je na značaj elemenata strome tumora u progresiji maligne bolesti i nastanku metastaza.

Opisan je koncept "prelazne sluznice", sluznice udaljene do 2 cm od tumora, u kojoj su detektovane genetske, epigenetske i biohemijske promene po kojima ova sluznica podseća na tumor.

Ukazano je na izostanak podataka u literaturi o nezahvaćenoj sluznici na većoj udaljenosti od tumora. Navedeni su razlozi na osnovu kojih se može pretpostaviti da i na većoj udaljenosti od tumora postoje promene: uticaj rastućeg tumora ili faktora koje tumor oslobađa, i "*field carcinogenesis*" koncept.

Opisan je "*field carcinogenesis*" koncept u sluznici debelog creva, prema kome genetski faktori i faktori sredine dovode do promena u širem "polju" u sluznici debelog creva.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od morfometrijske analize strukturnih i celularnih elemenata sluznice debelog creva, detektovanja i kvantifikovanja promena na epitelnim ćelijama sluznice debelog creva (promene u sekreciji mucina, proliferaciji i fraktalnoj dimenziji jedara epitelnih ćelija), detektovanja i kvantifikovanja promena strukturnih (krvni i limfni sudovi, kolagena, retikularna vlakna, periostin i hijaluronska kiselina) i celularnih elemenata (fibroblasti, miofibroblasti, makrofazi, T-limfociti, B-limfociti, plazma ćelije i dendritske ćelije) lamine proprije sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora i poređenja sa laminom proprijom sluznice debelog creva uzetom sa iste lokacije kod pacijenata bez malignog tumora.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena na Institutu za Histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta, Centru za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničko-bolničkog centra "Zvezdara" i Institutu za fiziku. Detaljno je opisano na koji način su formirane grupe: uzorci sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm

kaudalno od primarne tumorske lezije uzimani su prilikom dijagnostičke endoskopije od 40 ispitanika sa novootkrivenim tumorom debelog creva (histopatološkom analizom kod svih ispitanika potvrđeno je prisustvo adenokarcinoma debelog creva). Takođe je opisano koji ispitanici su činili kontrolnu grupu: 50 zdravih ispitanika, sa familijarnim opterećenjem za malignitet creva. Ova studija je sprovedena u skladu sa preporukama Helsinške deklaracije o ljudskim pravima, i odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničko-bolničkog centra "Zvezdara" i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Morfometrijska analiza sluznice debelog creva sprovedena je na isečcima obojenim hematoksilinom i eozinom, primenom softvera *Analysis 3.1*. Fraktalna i teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva sprovedene su na isečcima obojenim toluidin plavim, primenom softvera za analizu slike *Fiji*. Identifikacija sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama sluznice debelog creva sprovedena je na isečcima bojenim gvožđe diaminom i alcian plavim. Detektovanje kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva vršeno je histoheмиjski *Masson trichrome* bojenjem i impregnacijom srebrom po Gomoriju. Za vizuelizaciju kolagenih vlakana u nefiksiranom i neobojenom tkivu debelog creva korišćen je nelinearni laserski skenirajući mikroskop sa sposobnošću detekcije drugog harmonika. Proliferacija ćelija, hijaluronska kiselina i periostin kao i ćelije lamine proprije sluznice debelog creva, detektovani su imunohistoheмиjski, primenom odgovarajućih antitela, prema protokolu proizvođača. Zastupljenost i organizacija strukturnih i celularnih komponenata sluznice debelog creva analizirani su primenom softvera *Icy* i *Fiji*.

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 240 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Morfometrijska analiza svih elemenata sluznice debelog creva pokazala je da na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora postoji statistički značajno povećanje visine epitelnih ćelija sluznice debelog creva i smanjenje broja ćelija lamine proprije sluznice debelog creva, u poređenju sa sluznicom debelog creva zdravih ispitanika.

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima, postoji promena u svim parametrima fraktalne i teksturalne analize jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva.

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora detektovana je promena u distribuciji sijalomucina i sulfomucina u poređenju sa zdravim ispitanicima: pokazan je veći procenat sijalomucin-pozitivnih ćelija, pre svega u površnom epitelu i adluminalnim delovima Liberkinovih kripti i smanjen procenat sulfomucin-pozitivnih ćelija duž Liberkinovih kripti.

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, primenom anti-Ki67 antitela, pokazana je povećana proliferacija epitelnih ćelija, u poređenju sa zdravim ispitanicima. Proliferacija epitelnih ćelija je naročito povećana u adluminalnim delovima Liberkinovih kripti.

Pokazano je povećanje broja svih krvnih sudova (detektovanih primenom anti-CD34 antitela), i novoformiranih krvnih sudova (detektovanih primenom anti-CD105 antitela) u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika. Primenom anti-podoplanin antitela (klon D2-40) u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora uočavaju se prošireni limfni sudovi, najčešće neposredno iznad lamine muskularis mukoze, dok se u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika ne uočavaju limfni sudovi.

U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora detektovana je promena u zastupljenosti i organizaciji komponenata ekstracelularnog matriksa: kolagenih vlakana, retikularnih vlakana, periostina i hijaluronske kiseline. Primenom softvera za analizu slike, pokazano je da postoji smanjena zastupljenost svih posmatranih komponenata ekstracelularnog matriksa u poređenju sa laminom proprijom zdravih ispitanika. Između komponenata ekstracelularnog matriksa u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora zapažaju se "prazni" prostori (pore). Merenjem u programu *Fiji*, pokazano je da je dijametar pora između komponenata ekstracelularnog matriksa u lamini propriji sluznice debelog creva statistički značajno povećan na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima.

Dezorganizacija kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora potvrđena je na nefiksiranom i neobojenom tkivu primenom nelinearnog laserskog skenirajućeg mikroskopa sa sposobnošću detekcije drugog harmonika.

Na istom mikroskopu, određivan je koeficijent anizotropije β koji daje informaciju o uređenosti kolagenih vlakana. Pokazano je da je uređenost kolagenih vlakana statistički značajno manja u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika.

Pokazano je da postoji statistički značajno manja zastupljenost miofibroblasta (detektovanih primenom anti- α SMA antitela) u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ova doktorska disertacija je prva koja pokazuje postojanje strukturnih i celularnih promena u naizgled zdravoj sluznici debelog creva na većoj udaljenosti (10 cm i 20 cm) od tumora u poređenju sa sluznicom debelog creva uzetom sa iste lokacije, ispitanika bez tumora. Detektovane su promene u epitelu i u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora.

U epitelu sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, izmerene su promene morfometrijskih parametara, histohemijske promene, promene u proliferaciji i fraktalnoj dimenziji.

Na isečcima obojenim hematoksilinom i eozinom, na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, izmereno je povećanje visine epitelnih ćelija sluznice debelog creva, kako u površnom epitelu, tako i u epitelu Liberkinovih kripti. U literaturi, do sada, nisu bile opisane promene u visini epitela sluznice debelog creva na tako velikoj udaljenosti od tumora, ali je opisano povećanje visine epitelnih ćelija u prelaznoj sluznici debelog creva (Dawson PA i sar., 1976). Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora detektovana je promena u sintezi sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama sluznice debelog creva: povećan broj sijalomucin-pozitivnih ćelija u površnom epitelu i adluminalnim delovima Liberkinovih kripti i smanjen broj sulfomucin-pozitivnih ćelija. Poznato je da se opisane promene uočavaju u karcinomu debelog creva (Filipe MI i sar., 1974) i prelaznoj sluznici (Nairn RC i sar., 1962). Promena u odnosu sulfomucina i sijalomucina u prelaznoj sluznici, i ista promena koja je u istraživanju prvi put opisana na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, može predstavljati dediferencijaciju peharastih ćelija epitela debelog creva, tako da obrazac sekrecije mucina liči na onaj u fetalnim crevima (Filipe MI i sar., 1974; Lev R, 1968). Nedavno je pokazano da sadržaj

sulfomucina i sijalomucina u crevima utiče na kompoziciju mikrobiote u crevima (Croix JA i sar., 2011; Lennon i sar., 2013). Smatra se da kompozicija mikrobiote u crevima igra značajnu ulogu i inicijaciji i progresiji kolorektalnog karcinoma (Gao R i sar., 2107; Gagniere J i sar., 2016). Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovan je statistički značajno veći broj Ki67-pozitivnih ćelija, u poređenju sa zdravim ispitanicima. Posmatrano po regionima, pokazano je statistički značajno povećanje broja Ki67-pozitivnih ćelija u srednjoj i adluminalnoj trećini Liberkinovih kripti. Osim u samom karcinomu debelog creva, povećan broj Ki67-pozitivnih ćelija opisan je i u prelaznoj sluznici (Kuniyasy H i sar., 2000; Yoshikawa R i sar., 1996). Takođe, hiperproliferacija i poremećaj distribucije ćelija u naizgled zdravoj sluznici opisani su i kod pacijenata sa velikim sporadičnim adenomima u debelom crevu (Anti M i sar., 2001; Ponz de Leon M i sar., 1988; Anti M i sar., 1993). Slične rezultate (hiperproliferaciju uz pomeranje proliferišućih ćelija u adluminalne delove Liberkinovih kripti) u sluznici oko tumora, pokazali su Hanna Moris i saradnici (2009) koristeći MCM2 (*Minichromosome maintenance protein 2*) kao marker proliferacije.

Pored promena na epitelnim ćelijama, pokazano je da na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora postoje strukturne i celularne promene lamine proprije sluznice debelog creva. U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovane su promene u zastupljenosti krvnih i limfnih sudova, komponenata ekstracelularnog matriksa i miofibroblasta.

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora detektovan je povećan broj kako ukupnih (CD34-pozitivnih kapilara) tako i novoformiranih (CD105-pozitivnih) kapilara i malih krvnih sudova. Opisani rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja u kojima je primenom metoda optičke spektroskopije na modelu pacova tretiranih azoksimetanom, pokazano da je prokrvljenost sluznice debelog creva u okolini tumora nekoliko puta povećana, u poređenju sa sluznicom sa iste lokacije kod netretiranih pacova (Backman V i sar., 2013; Tiwari AK i sar., 2011). Ovaj fenomen je nazvan ranim povećanjem mikrovaskularnog dotoka krvi (*early increase in microvascular blood supply, EIBS*). *EIBS* je detektovan i u sluznici rektuma kod pacijenta sa adenomom na drugom mestu u kolonu, ali nije detektovan u sluznici rektuma kod pacijenata sa divertikulozom, hiperplastičnim polipima i hemoroidima (Backman V i Roy HK, 2013). *EIBS* je karakterističan za "*Field carcinogenesis*" koncept, smatra se formom neoangiogeneze i najizraženiji je u predelu baza kripti (Backman Vi sar., 2013).

U nezahvaćenoj lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, zapaženi su dobro razvijeni limfni sudovi, neposredno iznad lamine muskularis mukoze. Takođe, duž cele lamine proprije sluznice debelog creva, na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, opisane su pojedinačne ili ređe, prisutne u manjim grupama, D2-40 pozitivne ćelije. U literaturi nedostaju podaci o limfnim sudovima u lamini propriji sluznice debelog creva na ovoj udaljenosti od tumora, ali je opisana povećana gustina limfnih sudova u samom tumoru debelog creva i u prelaznoj sluznici, oko tumora (Barton CK i sar., 2008). Jedan od mogućih mehanizama limfangiogeneze u udaljenoj lamini propriji sluznice debelog creva mogla bi biti sekrecija faktora koji stimulišu limfangiogenezu (VEGF-C, VEGF-D), od strane tumorskih ćelija ili tumorom-aktiviranih ćelija strome. Zapaženo je da tumor indukuje limfangiogenezu u regionalnim limfnim čvorovima, čak i pre pojave metastaza (Das S i sar., 2008). Takođe je pokazano da tumor regrutuje iz kostne srži prekursore endotelnih ćelija limfnih sudova (Wels J i sar., 2008).

Detektovana je promena u zastupljenosti i organizaciji kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora koristeći histohemijske metode, morfometrijska merenja i nelinearni laserski skenirajući mikroskop sa sposobnošću detekcije drugog harmonika. U novije vreme veliki broj istraživanja ukazuje na promene kolagenih i retikularnih vlakana kao na važnu karakteristiku tumora. Prilikom nastanka i progresije tumora konstantno se vrši remodelovanje kolagena: razgradnja, sinteza, unakrsno povezivanje vlakana, promena orijentacije vlakana i interakcija ćelija urođenog i stečenog imunskog sistema sa kolagenim vlaknima (Carey SP i sar., 2012; Kehlet SN i sar., 2016). Promene u zastupljenosti i organizaciji kolagenih vlakana doprinose stvaranju mikrosredine koja pogoduje progresiji tumora preko uticaja na migraciju i polarizaciju ćelija (Wolf K i sar., 2011; Wolf K i sar., 2007). Najvažnije biofizičke karakteristike kolagenih vlakana koje utiču na migraciju i polarizaciju ćelija su: sastav, gustina, orijentacija i poroznost (Wolf K i sar., 2011). U istraživanju je pokazano da postoji smanjena zastupljenost, povećana neuređenost i da su "prostori" između kolagenih i retikularnih vlakana statistički značajno veći na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima. Istraživanja na različitim modelima, pokazala su, da su u ekstracelularnom matriksu sa većim porama ćelije pokretljivije, nezavisno od drugih parametara. U kolagenim gelovima, sa nižom koncentracijom kolagena i većim "porama", ćelije postaju izdužene, polarizovane i veoma mobilne; povećan je i procenat mobilnih ćelija i brzina njihovog kretanja (Carey SP i sar., 2012). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju, u skladu su i sa istraživanjem Shewan PC i

saradnika (2015) koji su detektovali pojavu povećanih "pora" u prelaznoj sluznici oko karcinoma dojke.

Pokazano je da postoji smanjena zastupljenost periostina, praćena povećanim prostorima ("porama") između molekula periostina u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika. Poznato je da su perikriptalni miofibroblasti glavni izvor periostina u lamini propriji sluznice debelog creva (Kikuchi Y i sar., 2008). Sekretijom periostina, perikriptalni miofibroblasti mogu uticati na proliferaciju i diferencijaciju epitelnih ćelija (Lui AY i sar., 2014; Conway SJ i sar., 2014). U samom tumoru debelog creva, količina periostina može biti i povećana i smanjena. U različitim istraživanjima postoje različiti podaci o dinamici sinteze periostina prilikom progresije tumora (Xu X i sar., 2015; Oh HJ i sar., 2017). Rezultati doktorske disertacije, u skladu su sa rezultatima Kikuchi Y i saradnika (2008) koji opisuju rano smanjenje periostina u sluznici debelog creva, prilikom progresije iz normalne sluznice u adenom i adenoma u karcinom. Smanjenje periostina prati smanjenje broja perikriptalnih miofibroblasta (Kikuchi Y i sar., 2008; Li A i sar., 1999). Pokazano je da se količina periostina u lamini propriji sluznice debelog creva smanjuje, čak i pre nego što dođe do smanjenja broja miofibroblasta, prilikom progresije normalne sluznice u hiperplastičnu (Kikuchi Y i sar., 2008). Smanjenje periostina na ovoj udaljenosti od tumora govori u prilog postajanja "*field carcinogenesis*" teorije i to može predstavljati jednu od ranih promena u izmenjenom "polju" u sluznici debelog creva. Epitel sluznice "polja" je hiperproliferativan (Backman V i sar., 2013), stoga smanjenje periostina može predstavljati zaštitni mehanizam, čiji je cilj da se proliferacija smanji.

Analogno zastupljenosti kolagenih i retikularnih vlakana i periostina, postoji smanjena zastupljenost hijaluronske kiseline i povećanje dijametra prostora između lanaca hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva 10 cm i 20 cm od tumora. U literaturi izostaju radovi o zastupljenosti i organizaciji hijaluronske kiseline na tako velikoj udaljenosti od tumora. Promene u sintezi ili razgradnji hijaluronske kiseline karakteristične su za mnoga patološka stanja, pre svega za nastanak tumora i metastaza (Monslow J i sar., 2015). Fragmenti hijaluronske kiseline različite molekularne mase, različito utiču na progresiju tumora, indukovanjem angiogeneze i stimulisanjem migracije tumorskih ćelija (Zhuo L i sar., 2006; Pasonen-Seppanen S i sar., 20003). U tumorima su opisane i povećana sinteza i povećana razgradnja hijaluronske kiseline, pri čemu i jedna i druga mogu stimulisati i inhibisati progresiju maligne bolesti. Efekat hijaluronske kiseline na progresiju maligne

bolesti je u velikoj meri zavisan od složenih interakcija između tumorskih ćelija i ćelijskih i vanćelijskih komponenta mikrosredine tumora (Monslow J i sar., 2015; Tool BP, 2009).

Brojni biološki efekti hijaluronske kiseline, otkriveni su u novije vreme i predmet su velikog interesovanja, zato što govore u prilog konceptu koji stavlja stromu u važan plan, kao aktivnog učesnika u brojnim procesima, uključujući nastanak i progresiju tumora. Međutim, u disertaciji je naglašeno da se ne može zanemariti ni tradicionalna, biomehanička uloga hijaluronske kiseline u regulaciji zapremine tečnosti u tkivima (Voutouri C i sar., 2016). U rezultatima istraživanja opisana je pojava povećanih prostora ("pora") između svih posmatranih komponenta ekstracelularnog matriksa. Jedno od mogućih objašnjenja je da su opisani prostori ("pore") posledica edema lamine proprije sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora. U nastanku edema na ovako velikoj udaljenosti od tumora, analogno edemu unutar samog tumora i u prelaznoj sluznici, mogu učestvovati brojni faktori. Edem se povezuje sa povećanom zastupljenošću hijaluronske kiseline, međutim, uzrok edema mogu biti smanjena zastupljenost kolagena i povećan broj novofomiranih CD105-pozitivnih krvnih sudova, koji su detektovani na ovoj udaljenosti od tumora (Voutouri C i sar., 2016; Wilson W i sar., 2005). Sluznica udaljena 10 cm i 20 cm od tumora, bilo da, prema teoriji polja, sadrži početne promene, koje stvaraju predispoziciju za nastanak tumora, ili reaktivne promene, nastale usled rastućeg tumora, razlikuje se od sluznice pacijenata bez tumora debelog creva u više komponentata. Međusobnom interakcijom svih komponentata, na još uvek nedovoljno jasan način, nastaje edem sluznice.

U disertaciji je pokazano da postoji smanjena zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa laminom proprijom zdravih ispitanika. U tumoru debelog creva naročito su proučavane interakcije između tumorskih ćelija i fibroblasta i miofibroblasta. To nije iznenađujuće, zato što struktura i funkcija zdravog debelog creva u potpunosti zavise od komunikacije između epitelnih ćelija i fibroblasta i miofibroblasta (Gregorieff A i sar., 2005; Tape CJ, 2017; Kalluri R i sar., 2006; Roulis M i sar., 2016). Pokazano je da miofibroblasti svoj efekat na progresiju maligne bolesti, ne ostvaruju samo lokalno, već i na mestima udaljenih metastaza. Kod metastaza kolorektalnog karcinoma u jetru, stelatne ćelije se diferenciraju u miofibroblaste koji zatim učestvuju u formiranju niše pogodne za rast metastaza (Tape CJ, 2017; Nakagawa H i sar., 2004). Pokazano je da miofibroblasti izolovani iz metastaze kolorektalnog karcinoma u jetri, kultivisani sa ćelijama kolorektalnog karcinoma, stimulišu njegovu progresiju. Međutim, i miofibroblasti metastazom zahvaćene jetre, izolovani sa mesta udaljenih od same metastaze,

takođe stimulišu progresiju tumora, značajno više nego miofibroblasti istog pacijenta, izolovani iz kože. Dakle, prisustvo metastaza u jetri, dovodi do promena na svim miofibroblastima jetre, ne samo u području metastaze, predpostavlja se usled parakrinog efekta (Nakawa H i sar., 2004). U saglasnosti sa navedenim istraživanjima su i rezultati doktorske disertacije koji ukazuju na promene miofibroblasta debelog creva zahvaćenog tumorom, ne samo u tumoru i neposrednoj okolini, već i u udaljenim delovima debelog creva. Takođe, rezultati distertacije saglasni su sa nizom istraživanja u kojima je pokazano smanjenje broja perikriptalnih miofibroblasta bilo u želucu (duž progresije intestinalne metaplazije želudačnih žlezda u adenom, adenoma u intramukozni karcinom, intramukoznog karcinoma u submukozni invazivni karcinom želuca) ili u debelom crevu (u prelaznoj sluznici) (Nakayama H i sar., 2006, Balazs M i Kovacs A, 1982). Kao i u rezultatima doktorske disertacije, koji detektuju smanjenu zastupljenosti miofibroblasta na velikoj udaljenosti od tumora, i u navedenim istraživanjima u sluznici želuca i prelaznoj sluznici debelog creva, zastupljenost miofibroblasta je naročito smanjena u delovima Liberkinovih kriпти prema dnu, naročito u samom dnu kriпти. U dnu Liberkinovih kriпти debelog creva nalaze se matične ćelije, a poznato je da miofibroblasti igraju važnu ulogu u održavanju niše matičnih ćelija (Powell DW i sar., 2011).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. *Despotović SZ, Milićević NM, Milošević DP, Despotović N, Erceg P, Bojić B, Bojić D, Svorcan P, Mihajlović G, Đorđević J, Lalić IM, Milićević Z. **Morphometric study of uninvolved rectal mucosa 10 cm and 20 cm away from the malignant tumor.** Histol Histopathol 2014; 29(2):229-34.*
2. *Despotović SZ, Milićević NM, Milošević DP, Despotović N, Erceg P, Svorcan P, Schumacher U, Ullrich S, Mihajlović G, Kalem D, Marković S, Lalić IM, Krmpot AJ, Rabasović MD, Pantelić DV, Jovanić SZ, Rösch T, Milićević Ž. **Remodeling of extracellular matrix of the lamina propria in the uninvolved human rectal mucosa 10 cm and 20 cm away from the malignant tumor.** Tumour Biol 2017; 39(7):1010428317711654.*

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Strukturne i celularne promene nezahvaćene sluznice debelog creva osoba sa adenokarcinomom kolona“ dr Sanje Despotović, je prema našim saznanjima, prvi rad koji opisuje promene sluznice debelog creva na većoj udaljenosti, 10 cm i 20 cm od tumora, koristeći složene analize koje obuhvataju detekciju i kvantifikaciju svih strukturnih i celularnih elemenata sluznice debelog creva. Doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju kompleksnih interakcija tumora i tkiva domaćina i predstavlja korak ka boljem razumevanju mehanizama pojave tumora, njegovog rasta i nastanka metastaza. Disertacija pokazuje da postoje promene epitelnih ćelija i strukturnih i celularnih elemenata lamine proprije sluznice debelog creva, na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa sluznicom debelog creva zdravih ispitanika. Detektovanje i kvantifikovanje promena u nezahvaćenoj, naizgled zdravoj, sluznici debelog creva može imati potencijalni klinički značaj, pre svega u ranoj dijagnozi i kao indikator okultnih tumora u debelom crevu. Poznavanje promena u naizgled zdravoj sluznici moglo bi dovesti do razvoja testova kojima je moguće identifikovati pacijenta sa karcinomom debelog creva na osnovu biopsije "zdravog" tkiva sa udaljenog mesta.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je 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 Sanje Despotović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 4.06.2018. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Miljana Obradović

Prof. dr Svetislav Tatić

Akademik Miodrag Čolić

Mentor:

Prof. dr Živana Milićević

Komentor:

Prof. dr Dragoslav Milošević
