

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Sanja Z. Despotović

**STRUKTURNE I CELULARNE PROMENE
NEZAHVAĆENE SLUZNICE DEBELOG
CREVA OSOBA SA
ADENOKARCINOMOM KOLONA**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Sanja Z. Despotović

**STRUCTURAL AND CELLULAR
CHANGES OF THE UNINVOLVED
COLONIC MUCOSA FROM PATIENTS
WITH COLORECTAL
ADENOCARCINOMA**

doctoral dissertation

Belgrade, 2018

Mentor:

Prof. dr Živana Milićević

Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

Prof. dr Dragoslav Milošević

KBC Zvezdara, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Miljana Obradović

Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Svetislav Tatić

Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Akademik Miodrag Čolić

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Svojoj mentorki prof. dr Živani Milićević i prof. dr Novici Milićeviću na ukazanom poverenju, velikoj podršci i pomoći u svim fazama izrade disertacije

Svom komentoru, prof. Dragoslavu Miloševiću i timu iz KBC Zvezdara na velikoj pomoći prilikom prikupljanja uzoraka

Članovima komisije, prof. dr Miljani Obradović, prof. dr Svetislavu Tatiću i akademiku Miodragu Čoliću, na korisnim savetima pri pisanju disertacije

Timu sa Instituta za fiziku, Centar za fotoniku, na pomoći prilikom analiziranja kolagena

Docentu Igoru Pantiću sa Instituta za fiziologiju, na pomoći prilikom fraktalne i teksturalne analize

Svim zaposlenima na Institutu za Histologiju i embriologiju koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove disertacije

Disertaciju posvećujem roditeljima, Vesni i Zoranu

STRUKTURNE I CELULARNE PROMENE NEZAHVAĆENE SLUZNICE DEBELOG CREVA OSOBA SA ADENOKARCINOMOM KOLONA

Sažetak

Uvod. U novije vreme sve češći predmet istraživanja su interakcije između tumorskih ćelija i vezivno-tkivnih elemenata koji čine stromu tumora. Pored istraživanja interakcija tumorskih ćelija i stromalnih elemenata samog tumora u progresiji maligne bolesti, pokazano je da postoje promene u nezahvaćenoj sluznici u neposrednoj okolini tumora (tzv. prelaznoj sluznici). Međutim, zanemareno je proučavanje nezahvaćene sluznice na većoj udaljenosti od tumora. U literaturi izostaju jasni podaci o tome da li su promene opisane u prelaznoj sluznici ograničene samo na neposrednu blizinu tumora ili postoje u nezahvaćenoj sluznici i na većoj udaljenosti od malignog tumora. Uprkos ovome, pojedini istraživači ovu sluznicu koriste kao normalno, nepromenjeno tkivo.

Za proučavanje udaljene nezahvaćene sluznice u okolini tumora odabrali smo debelo crevo, pošto je ovaj organ često zahvaćen malignom bolešću, a primarna tumorska lezija i nezahvaćeni deo organa su relativno lako dostupni.

Ciljevi istraživanja. Detektovanje i kvantifikovanje promena epitelnih ćelija debelog creva (promene u sekreciji sulfomucina i sijalomucina, proliferaciji i fraktalnoj dimenziji jedara epitelnih ćelija) i strukturnih (krvni i limfni sudovi, kolagena, retikularna vlakana, 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 poredenje sa laminom proprijom sluznice debelog creva uzetom sa iste lokacije kod pacijenata bez malignog tumora.

Materijal i metode. Uzorci sluznice debelog creva, na udaljenosti 10 cm i 20 cm kaudalno od primarne tumorske lezije, dobijeni su biopsijom u Centru za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“ u Beogradu prilikom dijagnostičkog pregleda osoba sa malignim tumorom ovog organa (n=40). Kao kontrola korišćeni su uzorci sluznice debelog creva 50 zdravih osoba sa familijarnim opterećenjem za malignitet creva.

Morfometrijska analiza svih parametara sluznice debelog creva kod pacijenata sa i bez malignog tumora ovog organa rađena je na isečcima bojenim hematoksilinom i eozinom uz primenu softvera za obradu slike *Analysis, Icy* i *Fiji*.

Za detektovanje promena u sekreciji mucina u peharastim ćelijama epitela sluznice debelog creva korišćeno je histohemijsko bojenje sa gvožđe diaminom i alcian plavim. U programu *Fiji* kvantifikovan je odnos sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama u tri regiona: u donjoj, srednjoj i gornjoj trećini Liberkinovih kripti. Za detektovanje proliferacije epitelnih ćelija debelog creva korišćeno je anti-Ki67 antitelo. Određivan je broj proliferišućih epitelnih ćelija duž celih Liberkinovih kripti i po regionima (u donjoj, srednjoj i gornjoj trećini Liberkinovih kripti). Rađene su fraktalna i teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva na isečcima obojenim toluidin plavim.

Za detekciju krvnih i limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva korišćena su sledeća antitela: anti-CD34, anti-CD105 i anti-podoplanin antitelo. Određivani su distribucija i broj krvnih i limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva.

Za vizualizaciju komponenata ekstracelularnog matriksa (ECM) korišćena su: histohemijska bojenja (*Masson trichrome* bojenje za kolagena vlakna i impregnacija srebrom po Gomoriju za retikularna vlakna) i antitela (anti-periostin antitelo i anti-HABP antitelo). Određivana je zastupljenost komponenata ECM u lamini propriji sluznice debelog creva. Takođe, mereni su prostori između retikularnih vlakana, periostina i lanaca hijaluronske kiseline, kao i debljina lanaca hijaluronske kiseline.

Za vizualizaciju kolagenih vlakana u nefiksiranom i neobojenom tkivu pacijenata korišćen je nelinearni laserski skenirajući mikroskop sa sposobnošću detekcije drugog harmonika (SHG). Na istom mikroskopu, određivan je i koeficijent anizotropije β koji daje informaciju o uređenosti kolagenih vlakana.

Za detaljnu analizu celularnih komponenata lamine proprije sluznice debelog creva korišćena su sledeća antitela: za T-limfocite (anti-CD3 antitelo), B-limfocite (anti-CD20), makrofage (anti-CD68), plazma ćelije (anti-CD138), dendritske ćelije (anti-S100), fibroblaste (anti-S100A4) i miofibroblaste (anti- α SMA antitelo). Na isečcima obojenim antitelima za detekciju ćelija lamine proprije sluznice debelog creva određivani su distribucija i broj ćelija.

Rezultati. Detektovali smo promene na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora i u epitelu i u lamini propriji sluznice debelog creva. U epitelu sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovali smo promene morfometrijskih parametara, histohemijske promene, promene u proliferaciji i fraktalnoj dimenziji. U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovali smo promene u zastupljenosti krvnih i limfnih sudova, komponenata ekstracelularnog matriksa i miofibroblasta.

Zaključak. Pokazali smo postojanje strukturnih i celularnih promena u nezahvaćenoj sluznici debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora u poređenju sa sluznicom uzetom sa iste lokacije, ispitanika bez tumora.

Ključne reči. Kolon, karcinom, epitel, lamina proprija, ekstracelularni matriks, miofibroblasti

NAUČNA OBLAST: Medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna medicina

STRUCTURAL AND CELLULAR CHANGES OF THE UNINVOLVED COLONIC MUCOSA FROM PATIENTS WITH COLORECTAL ADENOCARCINOMA

Abstract

Introduction. Recently, increasingly frequent subjects of research are interplays between tumor cells and tumor-associated stromal elements. In addition to investigating the interaction of tumor cells and tumor-associated stromal elements in the progression of malignant disease, it has been shown that there are changes in uninvolved mucosa in the close vicinity of the tumor (so-called transitional mucosa). However, no attention has been devoted to the studies of uninvolved tissue in the remote surrounding of the tumor. In the literature, there is no clear indication whether the changes in the transitional mucosa are limited only to the immediate proximity of the tumor, or they also exist in the uninvolved mucosa at a greater distance from the malignant tumor. Despite this, some researchers use this remote mucosa as normal, unchanged tissue.

To study the uninvolved mucosa at a greater distance from the malignant tumor, we selected colon, as this organ is often affected by malignant disease, and both the primary tumor and the uninvolved mucosa are relatively easy to access.

Aims. Determination and quantification of changes of colonic epithelial cells (changes in sulfomucin and sialomucin secretion, proliferation and fractal dimension of nuclei) and structural (blood and lymphatic vessels, collagen, reticular fibers, periostin and hyaluronic acid) and cellular elements (fibroblasts, myofibroblasts, macrophages, T-lymphocytes, B-lymphocytes, plasma cells and dendritic cells) of colonic lamina propria at a distance 10 cm and 20 cm away from the tumor, and comparison with mucosa taken from the same location from patients without malignant tumor.

Materials and methods. Tissue samples of colonic mucosa 10 cm and 20 cm away in caudal direction from the tumor, were endoscopically collected at the Center for Gastroenterology and Hepatology, Zvezdara Clinical Center, Belgrade, during diagnostic examination of patients with colorectal adenocarcinoma (n=40). As control, the samples of colonic mucosa taken from 50 healthy persons, with a family history of intestinal malignancy, were used.

The morphometric measurements of all parameters of colonic mucosa of patients with and without malignant tumor were performed on hematoxylin-eosin stained sections, using image analysis softwares *Analysis*, *Icy* and *Fiji*.

To detect changes in mucin secretion in goblet cells in colonic epithelium, histochemical staining with high iron diamine and alcian blue was used. In *Fiji* software we quantified the sulfomucin-sialomucin ratio in colonic goblet cells in three regions: in the lower, middle and upper third of crypts of Lieberkuhn. For detecting epithelial cell proliferation, anti-Ki67 antibody was used. We calculated the number of proliferating cells along all length of crypts of Lieberkuhn and by regions (in the lower, middle and upper third of crypts of Lieberkuhn). The fractal and textural analysis of colonic epithelial cells nuclei was performed on toluidine-blue stained sections.

To detect blood and lymphatic vessels in colonic lamina propria, the following antibodies were used: anti-CD34, anti-CD105 i anti-podoplanin antibody. The distribution and the number of blood and lymph vessels were assessed.

For visualising extracellular matrix (ECM) components, the following methods were used: histochemical staining (Masson trichrome for collagen fibers, Gomori's silver impregnation for reticular fibers) and antibodies (anti-periostin and anti-HABP antibody). The presence of ECM components in colonic lamina propria was determined. Also, the diameter of spaces between reticular fibers, periostin and hyaluronan, and the diameter of hyaluronan chains were measured.

For the identification of collagen fibers in the unfixed and label free colon tissue samples, an original labframe nonlinear laser scanning microscope (NLM) was used for second harmonic generation (SHG) imaging. On the same microscope, the anisotropy parameter β , which provides information about collagen fibers alignment, was calculated.

For detailed analysis of cellular components of colonic lamina propria, the following antibodies were used: for T-lymphocytes (anti-CD3), B-lymphocytes (anti-CD20), macrophages (anti-CD68), plasma cells (anti-CD138), dendritic cells (anti-S100), fibroblasts (anti-S100A4) i myofibroblasts (anti- α SMA antibody). The distribution and number of each cell types in colonic lamina propria were assessed.

Results. We demonstrated changes in colonic epithelium and lamina propria 10 cm and 20 cm away from the malignant tumor. In the colonic epithelium at the distance 10 cm

and 20 cm away from the tumor, we detected changes in morphometric parameters, histochemical changes, changes in proliferation and fractal dimension. In colonic lamina propria at the distance 10 cm and 20 cm away from the tumor, we detected changes in representation of blood and lymph vessels, ECM components and myofibroblasts.

Conclusion. We demonstrated the existence of structural and cellular changes in the uninvolved colonic mucosa 10 cm and 20 cm away from the malignant tumor, compared with the mucosa taken from the same location from patients without tumor.

Key words. Colon, cancer, epithelium, lamina propria, extracellular matrix, myofibroblasts

RESEARCH AREA: Medicine

RESEARCH FIELD: Molecular medicine

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 <i>Histološka građa debelog creva</i>	1
1.2 <i>Epitel sluznice debelog creva</i>	2
1.3 <i>Lamina proprija sluznice debelog creva</i>	7
1.4 <i>Karcinom debelog creva</i>	20
1.5 <i>Interakcije između tumorskih ćelija i strome tumora</i>	20
1.6 <i>Prelazna sluznica</i>	23
1.7 <i>Nezahvaćena sluznica na većoj udaljenosti od tumora</i>	23
1.8 <i>"Field carcinogenesis" koncept</i>	23
2. Ciljevi istraživanja	25
3. Materijal i metode	26
3.1 <i>Uzorci sluznice debelog creva</i>	26
3.2 <i>Morfometrijska analiza sluznice debelog creva</i>	26
3.3 <i>Fraktalna i teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva</i>	28
3.4 <i>Identifikacija sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama sluznice debelog creva</i>	30
3.5 <i>Detektovanje krvnih i limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	31
3.6 <i>Detektovanje kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	32
3.7 <i>Detektovanje periostina u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	36
3.8 <i>Detektovanje hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	37
3.9 <i>Detektovanje ćelija lamine proprije sluznice debelog creva</i>	38
3.10 <i>Statistička obrada podataka</i>	39
4. Rezultati	41
4.1 <i>Morfometrijska analiza sluznice debelog creva</i>	41
4.2 <i>Fraktalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva</i>	45
4.3 <i>Identifikacija sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama sluznice debelog creva</i>	52
4.4 <i>Detektovanje proliferacije epitelnih ćelija sluznice debelog creva</i>	59
4.5 <i>Detektovanje krvnih i limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	66
4.6 <i>Zastupljenost i organizacija kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	75
4.7 <i>Primena nelinearnog laserskog skenirajućeg mikroskopa sa sposobnošću detekcije drugog harmonika za vizualizaciju kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	79
4.8 <i>Zastupljenost i organizacija retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	83
4.9 <i>Zastupljenost i organizacija periostina u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	88
4.10 <i>Zastupljenost i organizacija hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva</i>	93
5. Diskusija	128
6. Zaključci	150
7. Literatura	152

1. Uvod

1.1 Histološka građa debelog creva

Debelo crevo je izduženi i specifično savijeni deo digestivne cevi u kome se, pre svega, vrše apsorpcija vode i elektrolita, a neiskorišćeni ostaci hrane se izbacuju u spoljnu sredinu (1).

Debelo crevo obuhvata: slepo crevo (*cecum*), crvuljak (*appendix vermiformis*), ascendentni kolon (*colon ascendens*), poprečni kolon (*colon transversum*), descendentni kolon (*colon descendens*), sigmoidni kolon (*colon sigmoideum*) i rektum (*rectum*) (1, 2).

Zid debelog creva grade 4 glavna sloja: Tunika mukoza (*tunica mucosa*), tunika submukoza (*tunica submucosa*), tunika muskularis (*tunica muscularis*) i tunika seroza ili adventicija (*tunica serosa s. adventitia*).

Tuniku mukoza debelog creva, posmatrano od lumena, čine 3 lamine: lamina epitelijalis (*lamina epithelialis*), lamina proprija (*lamina propria*) i lamina muskularis mukoze (*lamina muscularis mucosae*) (1, 2).

Laminu epitelijalis (epitel) debelog creva čini prost cilindričan epitel. Epitel oblaže površinu debelog creva koja je u kontaktu sa lumenom i nastavlja se u kontinuitetu kroz laminu propriju kao epitel tubularnih Liberkinovih žlezda/kripti (*glandule Liberkuhni*) (1, 2). Epitelne ćelije debelog creva možemo podeliti na apsorptivne i sekretorne. Apsorptivne ćelije, enterociti (odnosno kolonociti), su najbrojnije ćelije epitela debelog creva. U sekretorne ćelije spadaju peharaste ćelije, enteroendokrine ćelije i M-ćelije. Svi tipovi ćelija nastaju deobom i diferencijacijom matičnih ćelija epitela debelog creva (3).

Laminu propriju debelog creva čini rastresito vezivno tkivo bogato krvnim sudovima i nervnim vlaknima. U lamini propriji sluznice debelog creva, za razliku od drugih delova digestivne cevi, ne nalaze se limfni sudovi. U lamini propriji debelog creva nalazi se veliki broj rezidentnih ćelija rastresitog vezivnog tkiva (fibroblasti/fibroцити, miofibroblasti) i imigrantskih ćelija, poreklom iz kostne srži (limfociti, makrofazi, neutrofilni granulociti, eozinofilni granulociti, mastociti i druge ćelije) (1, 2).

Za laminu propriju sluznice debelog creva karakteristično je prisustvo Liberkinovih kripti, koje su prave tubularne žlezde i pružaju se celom širinom mukoze.

U epitelu Liberkinovih kripti, kao i u površnom epitelu, dominiraju enterociti i peharaste ćelije. U samom dnu Liberkinovih kripti nalaze se matične ćelije sluznice debelog creva. Oko bazalne membrane epitela Liberkinovih kripti, u lamini propriji sluznice debelog creva, uočava se sloj perikriptalnih miofibroblasta (1, 2).

Lamina muskularis mukoze (lmm) se sastoji od glatkih mišićnih ćelija koje se pružaju kružno u odnosu na dužu osu debelog creva (1).

Tuniku submukozu debelog creva čini rastresito vezivno tkivo. I u ovom sloju se nalazi veoma veliki broj ćelija vezivnog tkiva, krvni sudovi i limfni sudovi. U tunici submukozi nalazi se submukozni Majsnerov (*Meissner*) nervni plexus. Tu se nalaze senzorna i motorna vlakna kao i ganglijske ćelije enteričkog nervnog sistema koji sadrži simpatički i parasimpatički deo (1, 2).

Tuniku muskularis čini glatko mišićno tkivo raspoređeno u dva podsloja: kružni (*stratum circulare*) i uzdužni (*stratum longitudinale*). Stratum longitudinale u debelom crevu ima specifičnu garđu: čine ga tri dužne trake (*taenia coli*), dok je prisustvo mišićnih ćelija između traka kontinuirano, ali su raspoređene u veoma tankom sloju. Između dva podsloja tunike muskularis nalaze se neuroni enteričkog nervnog sistema u okviru Auerbahovog (*Auerbach*) mijenteričnog plexusa (1, 2).

Tunika seroza ili tunika adventicija su zastupljene u zavisnosti od toga koji deo debelog creva se nalazi intraperitonealno (tunika seroza), a koji ekstraperitonealno (tunika adventicija). Tunike serozu i tuniku adventiciju čini rastresito vezivno tkivo, koje je kod tunike seroze pokriveno prostim ljuspastim epitelom-mezotelom visceralnog lista peritoneuma (1, 2).

1.2 Epitel sluznice debelog creva

Glavne ćelije epitela debelog creva su enterociti (kolonociti). Osim njih, nalaze se i peharaste ćelije, M-ćelije, enteroendokrine ćelije i matične ćelije (1, 2).

Enterociti

Enterociti su visoke cilindrične polarizovane ćelije. Bazalna plazmalema enterocita leži na bazalnoj lamini, dok je apikalna plazmalema je u kontaktu sa sadržajem lumena debelog creva. Na lateralnim stranama ovih ćelija, između susednih enterocita, nalaze se spojni kompleksi. Najapikalnije su lokalizovane okludentne veze koje onemogućavajući paracelularni transport vode i elektrolita iz lumena debelog creva u intersticijum. U

predelu okludentnih veza, spoljašnji listovi plazma membrana susednih enterocita su fuzionisani i paracelularni prostor je potpuno obliterisan. Ispod okludentnih veza nalaze se adherentne veze: zonula adherens i dezmozomi (1, 2).

Apikalni deo enterocita karakteriše se prisustvom brojnih mikrovila. Na mikrovilima se nalazi veoma debeo sloj glikokaliksa. Glikokaliks ima zaštitnu ulogu, ulogu selektivne barijere, ulogu u integrisanju signala iz okolne sredine, koncentrisanju jona i uspostavljanje negativnog naboja apikalne plazmaleme (1, 4).

Nukleus enterocita je pretežno euhromatičan. U citoplazmi enterocita perinukleusno se uočavaju cisterne granulisanog i glatkog endoplazminog retikuluma, dok je dobro razvijen Goldžijev aparat postavljen supranukleusno. U citoplazmi enterocita postoje brojne mitohondrije naročito u bazolateralnom delu. Kroz membranu bazolateralnog odeljka enterocita odvija se intezivan transport preko brojnih transmembranskih proteina od kojih su najzastupljenije $\text{N}^+\text{-K}^+$ pumpe (1, 2).

Enterociti imaju važnu ulogu u očuvanju integriteta sluznice debelog creva. Broj bakterija u lumenu creva (oko 10^{14}) jednak je broju ćelija u ljudskom organizmu (5). Sluznica digestivnog trakta mora biti selektivno permeabilna tako da omogući prolaz hranljivim materijama a da istovremeno predstavlja barijeru pretnjama iz spoljašnje sredine. Dakle, specifični uslovi koji ovde vladaju doveli su do strukturnih i funkcionalnih adaptacija epitelnih, ali i svih drugih ćelija, kako u epitelu tako i u lamini propriji, koje moraju biti spremne da odgovore na patogene mikroorganizme a da sa druge strane uspostave toleranciju prema fiziološkoj mikroflori i antigenima poreklom iz hrane (6).

Enterociti debelog creva sekretuju brojne antimikrobne peptide, kao što su REGIII α (C-tip lektina), β -defenzini i katelicidini (7).

Enterociti imaju ulogu sekrecije imunoglobulina A (IgA) (8).

Intestinalne epitelne ćelije ekspimiraju receptore za prepoznavanje obrazaca patogena (*pattern-recognition receptors*, PRR), što im omogućava da deluju kao dinamični senzori mikroorganizama i aktivni učesnici u imunološkoj odbrani sluznica (9, 10).

Intestinalne epitelne ćelije igraju značajnu ulogu u regulaciji aktivnosti ćelija urođenog i stečenog imunskog sistema, pre svega u indukciji tolerancije na komensalne mikroorganizme. Komensalni mikroorganizmi preko PRR-a na instestinalnim epitelnim ćelijama indukuju produkciju brojnih citokina, među kojima su naročito važni: timusni

stromalni limfopoetin (TSLP), faktor transformacije rasta beta (TGF β), IL-25, ligand koji indukuje proliferaciju (APRIL), faktor aktivacije B-ćelija (BAFF). TSLP, TGF β i retinoična kiselina koje stvaraju intestinalne epitelne ćelije pod dejstvom komensalnih mikroorganizma, stimulišu nastanak dendritskih ćelija i makrofaga koji imaju tolerogena svojstva, uključujući produkciju IL-10 i retinoične kiseline (10, 11, 12).

Dakle, intestinalne epitelne ćelije imaju veoma važnu ulogu u integraciji signala iz okoline i regulaciji ćelija imunskog sistema u zavisnosti od prirode navedenih signala.

Peharaste ćelije

U epitelu debelog creva peharaste ćelije su veoma brojne i njihov broj raste duž debelog creva ka rektumu (1).

Peharaste ćelije imaju proširen apikalni deo jer se u njemu nalaze nagomilane granule mucina. U užem, bazalnom delu ćelije smešten je pretežno heterohromatičan nukleus i organele koje učestvuju u sintezi mucina (granulisani endoplazmin retikulum, Goldžijev aparat, mitohondrije). Granule sa mucinom se oslobađaju egzocitozom u apikalnom delu ćelije (1, 2).

Peharaste ćelije sintetišu i sekretuju brojne produkte od kojih je najvažniji glikoprotein mucin. Mucin se u lumenu creva jedini sa vodom dajući mukus koji oblaže i štiti apikalnu površinu epitelnih ćelija debelog creva (1, 2). Mucini su veliki glikoproteini koji se sastoje od centralnog proteina koji je bogat serinom i treoninom, za koji su O-glikozidnim vezama vezani brojni i različiti oligosaharidni bočni lanci. Postoji više od 20 gena za mucine (*MUC1-MUC20*) i njihova ekspresija je tkivno-specifična. Grubo ih možemo podeliti na sekretorne i vezane za membranu. U debelom crevu najvažniji je sekretorni *MUC2* (13).

U zavisnosti od bočnih oligosaharidnih lanaca mucini digestivnog trakta se dele na neutralne i kisele. Kiseli mucini su sulfomucini i sijalomucini. Neutralni mucini su zastupljeni pretežno u kranijalnim delovima digestivnog trakta, dok su u debelom crevu dominantni kiseli mucini. Dominantan mucin u debelom crevu je sulfomucin, ali postoje regionalne razlike u zastupljenosti sulfomucina i sijalomucina u različitim delovima debelog creva kao i razlike duž Liberkinovih kripti. I sulfomucin i sijalomucin su najzastupljeniji u rektumu. Sulfomucin dominira u dubljim delovima Liberkinovih kripti, dok sijalomucina ima više u predelu vrata kripti i u površnom epitelu.

Distribucija i odnos sulfomucina i sijalomucina značajno se menjaju u tumoru debelog creva (14, 15).

Generalno, postoje dva principa organizacije mukusa u gastrointestinalnom traktu. U želucu i debelom crevu mukus je organizovan u dva sloja, unutrašnji i spoljašnji sloj, dok u tankom crevu postoji samo jedan sloj mukusa. Bakterije koje naseljavaju lumen debelog creva nisu u direktnom kontaktu sa epitelnim ćelijama debelog creva zato što je unutrašnji sloj mukusa nepermeabilan za njih. Sa druge strane, permeabilni spoljašnji sloj mukusa je stanište velikog broja komensalnih bakterija. Mukus nije samo prosta barijera koja sprečava prodor bakterija, već sastav mukusa utiče na tip bakterija koje naseljavaju određene delove digestivnog trakta, zato što ugljeni hidrati i različite terminalne grupe na oligosaharidnim lancima služe i kao mesta za vezivanja i kao izvor nutrijenata za mikroorganizme (16).

Osim mucina, peharaste ćelije stvaraju i sekretuju peptid treofil, molekul sličan rezistinu beta (resistin-like molecule β , RELM β) i Fc- γ vezujući protein (Fcgbp). (17). Navedeni peptidi imaju ulogu u održavanju integriteta debelog creva i stabilizaciji mucina (17).

U novije vreme, poznato je da peharaste ćelije pored uloge u sintezi mukusa, preuzimaju antigene iz lumena debelog creva i prosleđuju ih dendritskim ćelijama u lamini propriji sluznice debelog creva (18).

M-ćelije

M-ćelije se prvensteno nalaze u epitelu ileuma, iznad Pajerovih ploča, ali se nalaze i u epitelu debelog creva koji pokriva izolovane limfne folikule lamine proprije sluznice debelog creva. U odsustvu inflamacije, oko 10% epitelnih ćelija iznad izolovanih limfnih folikula debelog creva su M-ćelije. M-ćelije se morfološki razlikuju od enterocita: imaju redukovani glikokaliks i mikrovile. Na apikalnoj plazmalemi M-ćelija zapažaju se nabori (*microfolds*). Ove ćelije iz lumena preuzimaju antigene, transportuju ih do bazalnog dela gde ih egzocitozom oslobađaju kroz bazolateralnu plazmalemu. Posredstvom M-ćelija antigeni transcitozom dospevaju u intraepitelne džepove ispod bazolateralne plazmaleme M-ćelija gde se nalaze limfociti, dendritske ćelije i makrofazi. Dakle, ove ćelije ostvaruju kontakt između antigena u lumenu creva i imunokompetentnih ćelija lamine proprije sluznice debelog creva (19, 20).

Enteroendokrine ćelije

Enteroendokrine ćelije se nalaze između enterocita i peharastih ćelija. Pripadaju difuznom neuroendokrinom sistemu (DNES) organizma. U kontaktu su sa bazalnom membranom, ali njihov apikalni deo nije uvek u kontaktu sa lumenom. Sekretuju supstance koje imaju endokrino, parakrino ili autokrino dejstvo. U citoplazmi enteroendokrinih ćelija nalaze se organele koje učestvuju u sintezi proteina (granulisani endoplazmin retikulum, Goldzijeve aparate) i brojne sekretorne granule. Ćelije su polarizovane i svoje produkte sekretuju u krvne sudove u lamini propriji, uz bazalnu membranu (1). U debelom crevu postoji najmanje 5 tipova enteroendokrinih ćelija: ćelije koje sekretuju serotonin, polipeptid YY, oksintomodulin (enteroglukagon), pankreasni polipeptid i somatostatin. Hromogranin A eksprimiraju sve enteroendokrine ćelije i koristi se kao njihov zajednički marker (21). U debelom crevu su naročito zastupljene enteroendokrine ćelije koje sekretuju serotonin. Serotonin stimuliše intestinalni motilitet i sekreciju elektrolita i mukusa (22).

Matične ćelije

Intestinalni epitel se obnavlja veoma brzo, na svakih 4-5 dana, aktivnošću matičnih ćelija creva. Matične ćelije su lokalizovane u dnu Liberkinovih kripti. Važna karakteristika intestinalnih matičnih ćelija je sposobnost asimetričnih deoba, gde jedna ćerka ćelija zadržava karakteristike matičnih ćelija i ostaje u dnu kripti, dok druga ćerka ćelija postaje tzv. *transit amplifying* (TA) ćelija, koja se veoma brzo deli i progresivno penje duž kripe ka površnom epitelu (23).

Nišu intestinalnih matičnih ćelija u debelom crevu grade same matične ćelije, enterociti, enteroendokrine ćelije, peharaste ćelije, miofibroblasti, enterički neuroni, mikrovaskulatura, intraepitelni limfociti i mikroorganizmi koji naseljavaju debelo crevo. Deoba i diferencijacija intestinalnih matičnih ćelija regulisane su brojnim i kompleksnim signalnim putevima unutar niše od kojih su najvažniji Wnt/ β -katenin, Notch, Hedgehog, BMP, TGF β i Jak/Stat signalni putevi (24).

Postoje brojne tvrdnje da su intestinalne matične ćelije važne u nastanku tumora debelog creva, pre svega u inicijaciji tumorogeneze. Dug životni vek i česte deobe čine ih naročito osetljivim na ponovljeno izlaganje onkogenim stimulusima i povećavaju verovatnoću nastanka genetskih ili epigenetskih mutacija u njima. Takođe, složeni i dinamični odnosi koji vladaju unutar niše matičnih ćelija mogu biti narušeni različitim

agensima, što za posledicu može imati gubitak kontrole deoba matičnih ćelija i neoplastičnu transformaciju (25, 26).

1.3 Lamina proprija sluznice debelog creva

Laminu propriju sluznice debelog creva čini rastresito vezivno tkivo bogato krvnim sudovima i nervnim vlaknima. Rastrestito vezivno tkivo lamine proprije čine ćelije i ekstracelularni matriks. Glavne ćelije lamine proprije sluznice debelog creva su: fibroblasti i miofibroblasti, makrofazi, dendritske ćelije, T-limfociti, B-limfociti i plazma ćelije. Ekstracelularni matriks se sastoji iz vezivnih vlakana i osnovne supstance (1, 2).

Fibroblasti i miofibroblasti

Fibroblasti sintetiziraju i sekretuju sve komponente ekstracelularnog matriksa (ECM): vezivna vlakna i osnovnu supstancu. Izgled fibroblasta zavisi od njegove aktivnosti: aktivni fibroblasti su krupne razgranate ćelije sa svetlim citoplazmatskim produžecima, euhromatičnim ovalnim jedrom sa jasno uočljivim jedarcem, obilnom citoplazmom u kojoj se zapažaju dobro razvijeni granulisani endoplazminski retikulum, Goldžijev aparat i brojne mitohondrije. Za fibroblaste je karakterističan konstitutivni tip sekrecije, tako da se u ovim ćelijama ne nakupljaju sekretorne granule, već se sintetisani molekuli (kolagen, elastin, fibronektin i dr.) putem vezikula formiranih u Goldžijevom aparatu veoma brzo fuzioniraju sa plazma membranom i oslobađaju u ekstracelularni prostor. Neaktivni fibroblasti (fibrociti) su vretenaste ćelije, sa oskudnijom citoplazmom i manjim brojem produžetaka od aktivne forme ćelije. Obično se nalaze uz vezivna vlakna koja su nastala njihovom prethodnom aktivnošću. Imaju vretenasto, pretežno heterohromatično jedro vretenastog oblika, acidofilnu citoplazmu i znatno manje zastupljen granulisani endoplazminski retikulum (2, 27).

U zarastanju rana, inflamaciji i tumorima dolazi do aktivacije i transdiferencijacije fibroblasta u miofibroblaste, koji imaju brojne važne uloge (27).

Miofibroblasti predstavljaju poseban ćelijski entitet, koji se po morfološkim karaktersistikama nalazi između glatkih mišićnih ćelija i fibroblasta (28). Sekretijom različitih citokina, hemokina, prostaglandina, faktora rasta i komponenata ekstracelularnog matriksa, miofibroblasti igraju značajnu ulogu u razvoju, inflamaciji, zarastanju rana i nastanku i propagaciji tumora (29).

Intestinalni miofibroblasti su vretenaste ćelije, nalik glatkim mišićnim ćelijama, predominantno lokalizovane oko kriпти i ispod površnog epitela (29). Iako su najrasprostranjeniji subepitelno, formiraju sincicijum kroz celu laminu propriju. Međusobno su povezani poroznim vezama (gap junction). U predelu baza kriпти miofibroblasti su ovalnog ili čunastog oblika, dok u gornjim delovima kriпти poprimaju stelatnu morfologiju (30). U direktnom su kontaktu sa mišićnim ćelijama lamine muskularis mukoze (29) i pericitima (30).

Posmatrani transmisionim elektronskim mikroskopom, miofibroblasti su krupne ćelije sa brojnim produžecima. Na ćelijskoj membrani nalazi se mnoštvo kaveola, u citoplazmi dobro razvijen granulirani endoplazmatski retikulum i Goldži kompleks, snopovi mikrofilamenata i pridružena gusta tela. Produžeci miofibroblasta prolaze kroz fenestre na kolagenoj ploči i završavaju se u predelu bazalne membrane, u podnožju epitelnih ćelija, stopalastim produžecima koji podsećaju na one u glomerulu bubrega. Na ovaj način, subepitelni prostor lamine proprije sadrži dve fenestrirane barijere, obe izgrađene od vlakana vezivnog tkiva, koje sekretuju miofibroblasti. Ovakva anatomska osobenost može biti od značaja za transport vode i elektrolita u crevima (30).

Ne postoji imunohistohemijski marker specifičan isključivo za miofibroblaste. U upotrebi su kombinacije različitih markera: glatko-mišićnog alfa-aktina (α SMA), tip 3 intermedijarnih filamenata kao što su vimentin ili dezmin i odsustvo epitelnih citokeratina. I drugi mezenhimalni elementi lamine proprije sluznice debelog creva ekspimiraju α SMA: periciti, matične ćelije kostne srži, glatke mišićne ćelije lamine muskularis mukoze. Glatke mišićne ćelije lamine muskularis mukoze veoma slabo se prebojavaju antitelima na vimentin, ali snažno reaguju sa antitelima na dezmin, dok miofibroblasti i periciti zdrave lamine proprije sluznice debelog creva ne pokazuju pozitivnu reakciju na antitela na dezmin. Mezenhimalni elementi lamine proprije sluznice debelog creva mogu se identifikovati i antitelima na CD90, takođe poznat kao antigen diferencijacije timocita 1. Intestinalni miofibroblasti se u praksi najčešće identifikuju na osnovu ekspresije α SMA, specifične lokacije i strukturnih karakteristika (31).

Miofibroblasti regulišu proliferaciju, diferencijaciju i regeneraciju epitelnih ćelija creva. Imaju veoma važnu ulogu u održavanju niše matičnih ćelija regulacijom

Wnt/β-katenin signalnog puta. U osnovi ovih procesa je epitelno-mezenhimna interakcija koja se odvija na svim stupnjevima razvića (31).

Nedavno je pokazano da miofibroblasti i fibroblasti lamine proprije sluznice debelog creva zdravih osoba eksprimiraju na svojoj površini MHC molekule II klase i regulišu aktivnost CD4⁺ limfocita. Dakle, s obzirom na subepitelnu lokaciju i brojnost ovih ćelija u lamini proprije creva, miofibroblasti predstavljaju značajnu frakciju neprofesionalnih antigen prezentujućih ćelija (31).

U novije vreme, fibroblasti su prepoznati kao veoma važne ćelije u nastanku i svim stadijumima progresije maligne bolesti. Tumorske ćelije sekrecijom brojnih faktora rasta (najvažniji su TGFβ, PDGF i FGF2) aktiviraju fibroblaste. Fibroblasti, aktivirani faktorima koje sekretuju tumorske ćelije, označavaju se kao CAFs (Cancer/Carcinoma-associated fibroblasts). CAFs imaju karakteristike aktiviranih fibroblasta koji učestvuju u procesu zarastanja rana. Dvorak je predložio koncept po kojem se tumori smatraju ranama koje ne zarastaju. Iz ovog koncepta proizilaze dva tipa aktivacije fibroblasta: reverzibilna i ireverzibilna. U tumorima nastaje tzv. ireverzibilna aktivacija fibroblasta. CAFs se razlikuju od fibroblasta osoba bez tumora po genima koje eksprimiraju, faktorima koje sekretuju, i posledično, funkciji koju obavljaju (32, 33)

Makrofazi

Makrofazi čine 10-20% svih mononuklearnih ćelija intestinalne lamine proprije sluznice creva čineći na taj način gastrointestinalni trakt najvećim rezervoarom makrofaga u ljudi (34). Nalaze se svuda u lamini proprije gastrointestinalnog trakta, sa najgušćim rasporedom subepitelno. Zahvaljujući ovakvoj strateškoj poziciji, makrofazi su prve ćelije urođene imunosti koje dolaze u kontakt sa mikroorganizmima i njihovim produktima koji su prošli epitelnu barijeru (35).

Dakle, intestinalni makrofazi nalaze se u neposrednoj blizini ogromne količine mikroorganizama smeštenih u lumenu creva. Međutim, intestinalna sluznica normalno pokazuje minimalne znake inflamacije. Ovo se pripisuje posebnim funkcionalnim karakteristikama intestinalnih makrofaga, koji ne funkcionišu kao profesionalne antigen prezentujuće ćelije, odnosno nemaju sposobnost aktivacije naivnih T-limfocita. Sa druge strane, imaju očuvanu fagoctnu i baktericidnu aktivnost i efikasno uklanjaju oštećene i mrtve sopstvene ćelije (36).

Makrofazi su krupne ćelije (15–80 μm), nepravilnog oblika. Izrazita sposobnost fagocitovanja stranih čestica odražava se na morfologiju ovih ćelija. Površina makrofaga je neravna, sa brojnim mikrovilima i krilastim produžecima. Krilasti produžeci učestvuju u procesu makropinocitoze. Na ćelijskoj membrani se zapažaju brojni pinocitotski uvrati (glatki ili ogrnuti), koji ukazuju na mikropinocitotsku aktivnosti ovih ćelija. Imaju krupan nukleus ovalnog oblika, sa više indentacija, koji sadrži periferno raspoređen heterohromatin i jedan ili više nukleolusa. U citoplazmi dominiraju organele koje su uključene u razne faze fagocitoze: dobro razvijen Goldžijev aparat, veliki broj vezikula, vakuola, primarnih i sekundarnih lizozoma, fagolizozoma i rezidualnih tela. Umereno su zastupljene mitohondrije, slobodni ribozomi i granulisani endoplazmin retikulum (19).

U zavisnosti od mikrosredine u kojoj se nalaze, makrofazi mogu sekretovati više od stotinu različitih aktivnih substanci (na primer, polipeptidne hormone, proteine sistema komplementa, razne enzime, uključujući enzime koji remodeluju ECM, bioaktivne lipide, rektivne intermedijare kiseonika i azota) (19). Ovi produkti deluju na brojne, najčešće susedne ćelije (pre svega na ćelije imunskog sistema). Makrofazi lamine proprije sluznice debelog creva, na primer, indukuju ekspanziju regulatornih T-limfocita putem kaskade događaja koja uključuje detektovanje mikroflora iz lumena creva posredstvom TLR, aktivaciju MyD88 i sekreciju Il-1 β , aktivaciju ILC3 (*innate lymphoid cell*), i sekreciju Il-10 i retinoične kiseline (36, 37). Sa druge strane, produkti okolnih ćelija deluju na makrofage. Na primer, sekrecija Il-10 i TSLP od strane intestinalnih epitelnih ćelija se smatra bar delom odgovorna za specifičnosti makrofaga u lamini propriji sluznice debelog creva (36). Ove, i brojne druge interakcije, određuju funkcionalno stanje i morfološke aspekte makrofaga.

U istraživanjima tumora, sve češće je u upotrebi funkcionalna podela makrofaga na M1 (tzv. klasične makrofage) i M2 (tzv. alternativne makrofage). M1 makrofazi učestvuju u inflamaciji i imunskom odgovoru usmerenom na tumore, dok M2 makrofazi imaju brojne funkcije kojima stimulišu progresiju tumora. M2 makrofazi pre svega sintetišu i sekretuju faktore rasta i enzime koji učestvuju u angiogenezi i remodelovanju ekstracelularnog matriksa (38, 39).

Dendritske ćelije

Dendritske ćelije su dobile ime po brojnim, dugim, razgranatim produžecima. Predstavljaju najefikasnije antigen-prezentujuće ćelije organizma (40). Dendritske ćelije imaju sposobnost da preuzimaju i prerađuju antigene, migriraju u drenirajuće limfne čvorove i prezentuju antigene naivnim T-limfocitima, indukujući na taj način njihovu proliferaciju i diferencijaciju (19, 40). Populacija dendritskih ćelija je veoma heterogena, što otežava njihovu klasifikaciju (41). Postoji veliki broj podtipova koje se nalaze u limfatičnim i nelimfatičnim tkivima i organima i međusobno se razlikuju u pogledu stepena zrelosti i brzine obnavljanja. Nezrele dendritske ćelije su lokalizovane u nelimfatičnim tkivima, gde imaju "stražarsku" ulogu u imunskom sistemu. Veoma efikasno hvataju, preuzimaju i obrađuju antigene, dok su relativno neefikasne u prikazivanju antigena T-limfocitima. Nezrele dendritske ćelije cirkulišu između nelimfatičnih i limfatičnih tkiva. Na tom putu sazrevaju u zrele dendritske ćelije i naseljavaju timus-zavisne zone sekundarnih limfatičnih organa. Zrele dendritske ćelije gube sposobnost hvatanja i obrade antigena, ali se njihova sposobnost prikazivanja antigena naivnim T-limfocitima povećava, što predstavlja jedan od osnovnih signala za započinjanje primarnog antigen-specifičnog T-ćelijskog odgovora (19, 40).

Dendritske ćelije poseduju brojne razgranate citoplazmatske produžetke. Nukleus dendritskih ćelija je nepravilnog oblika, sa uskim periferno raspoređenim pojasom heterohromatina i izraženim nukleolusom. U citoplazmi se uočavaju mitohondrije, granulirani endoplazmin retikulum i Goldžijev aparat u čijoj blizini se nalaze lizozomi, multivezikularna tela i brojne vezikule (19). Na površini dendritskih ćelija veoma snažno su eksprimirani MHC molekuli II klase, kao i koreceptorni molekuli (na primer, CD80, CD86 i CD40) (19, 41).

Zrele dendritske ćelije su krupne ćelije, sa svetlom citoplazmom i brojnim, dugim citoplazmatskim produžecima, čija površina pokazuje obilje interdigitacija sa membranom okolnih limfocita. Nukleus ima karakterističan, bizaran oblik. U citoplazmi se uočava perinukleusno postavljen Goldžijev aparat i uz njega primarni lizozomi, brojne vezikule i Birbeck-ove granule. Na površini ovih ćelija veoma snažno su eksprimirani MHC molekuli druge klase (19).

Smatra se da su dendritske ćelije u lamini proprijii sluznice debelog creva ključne u indukciji tolerancije na neškodljive antigene. Jedan od važnih načina je

konstitutivna migracija dendritskih ćelija u mezenterijalne limfne čvorove, čak i u odsustvu inflamacije (42).

Funkcija dendritskih ćelija lamine proprije sluznice debelog creva je tesno regulisana lokalnom mikrosredinom, koja uključuje imunske ćelije, neimunske ćelije i mikrobiotu. Svi navedeni činioci neophodni su za održavanje intestinalne homeostaze. Poremećaji na jednom ili više nivoa mogu uticati na funkciju dendritskih ćelija i nastanak zapaljenskih bolesti creva. Dendritske ćelije mogu indukovati abnormalan T-ćelisljki odgovor na normalnu crevnu floru, što se smatra veoma značajnim u nastanku inflamatornih bolesti creva; mogu delovati direktno, putem kontakta sa T-limfocitima ili funkcionisati kao efektorske ćelije i sekretovati proinflamatorne citokine (43).

Istraživanja dendritskih ćelija u solidnim tumorima ukazala su da dendritske ćelije mogu imati pro-tumorogene i anti-tumorogene funkcije, u zavisnosti od mikrosredine u kojoj se nalaze. U brojnim tumorima, uključujući adenokarcinom debelog creva, opisane su kvantitativne i funkcionalne promene dendritskih ćelija. Smatra se da ove promene predstavljaju jedan od mehanizama tumorskih ćelija da izbegnu imunski sistem domaćina. Dendritske ćelije se naročito intezivno proučavaju kao potencijalno moćno oruđe u brobi protiv tumora, konstruisanjem različitih vakcina koje sadrže dendritske ćelije aktivirane tumorskim antigenima (44, 45, 46).

B-limfociti i plazma ćelije

B-limfociti su male ćelije, veličine do 8 μm . Imaju okruglo jedro sa kondenzovanim heterohromatinom. U uskom prstenu citoplazme nalazi se mnoštvo slobodnih ribozoma, malobrojne mitohondrije, kratke cisterne granulisanog endoplazminog retikuluma i Goldžijev aparat. B-limfociti se najčešće identifikuju na osnovu ekspresije CD19 i CD20 molekula. Navedene morfološke osobine B-limfocita karakteristične su za ove ćelije u stanju mirovanja. Aktivacija B-limfocita praćena je karakterističnim morfološkim promenama: povećava se sintetska aktivnost ćelije, što se manifestuje povećanjem volumena citoplazme i jedra, jedro postaje euhromatično, sa jednim ili više krupnih nukleolusa, u citoplazmi se povećava zastupljenost svih organela, naročito slobodnih ribozoma i poliribozoma. Terminalni stadijum diferencijacije aktiviranog, antigen-specifičnog B-limfocita predstavljaju plazma ćelije (plazmociti) (19, 40).

Plazma ćelije, već na svetlosnoj mikroskopiji, imaju karakterističan izgled: to su krupne ćelije (do 20 μm), poligonalnog oblika i obilne, izrazito bazofilne citoplazme u kojoj se perinuklearno uočava malo rasvetljenje. Nukleus je okrugao, ekscentrično postavljen, sa malim nukleolusom i karakterističnim zrakastim rasporedom heterohromatina poput "paoka na točku". Najizraženija ultrastrukturalna osobina plazmocita je dobro razvijen granulirani endoplazmni retikulum. U citoplazmi se nalaze brojni slobodni ribozomi, dobro razvijen Goldžijev aparat (nalazi se u perinuklearnom rasvetljenju citoplazme), mitohondrije i malobrojni lizozomi i multivezikularna tela. Životni vek plazma ćelija je 10–30 dana, ali ima i dugoživećih (duže od 1 god.) (19, 40).

Humoralni imunski odgovor na nivou intestinalne sluznice je u 75–90% slučajeva IgA izotipa. U debelom crevu ovaj procenat je još veći: oko 90% plazma ćelija sekretuju IgA antitela, 6% IgM i 4% IgG antitela (47).

U lamini propriji creva se nalazi 80% svih efektornih B-limfocita, odnosno na svaki kvadratni metar površine creva dolazi oko 10^{10} ćelija. Zbog toga se smatra da je intestinalna sluznica kvantitativno najvažniji efektorni organ stečenog humoralnog imuniteta. Nespecifični mehanizmi odbrane i stečeni imunski odgovor na nivou gastrointestinalnog trakta funkcionišu kao jedinstvena celina. To, sa jedne strane, omogućava zaštitu domaćina od patogenih agenasa, a sa druge strane, obezbeđuje toleranciju prema normalnoj crevnoj flori i antigenima u sastavu hrane (19, 47).

B-limfociti se u lamini propriji sluznice debelog creva nalaze pre svega u izolovanim limfnim folikulima (ILF). U crevima ljudi nalazi se najmanje 30 000 ILF-a i njihov broj se povećava distalno (47).

Uloga B-limfocita i plazma ćelija u solidnim tumorima je znatno manje proučavana u odnosu na T-limfocite, ali postepeno dobija na značaju.

T-limfociti

T-limfociti u crevima zauzimaju tri glavna odeljka: (a) organizovano limfatično tkivo digestivnog trakta (GALT); (b) intestinalnu laminu propriju i (c) epitel koji oblaže lumen digestivnog trakta. Distribucija različitih fenotipova T-limfocita u crevima razlikuje se o odnosu na perifernu krv, a postoji i značajna razlika u okviru tri navedena intestinalna odeljka. U svakom od intestinalnih odeljaka postoje dalje razlike u fenotipu T-limfocita. Na primer, u okviru GALT-a, razlikuju se T-limfociti u interfolikularnim

zonama, u germinativnim centrima i kupoli (48). (Deo lamine proprije, koji se nalazi iznad limfnih čvorića, a ispod M-ćelija naziva se kupola.)

Aktivacija naivnih T-limfocita antigenima prezentovanim od strane antigen prezentujućih ćelija (APC) u sklopu MHC molekula I i II klase, proliferacija i parcijalna diferencijacija naivnih T-limfocita, odigravaju se primarno u GALT-u. Smatra se da aktivirani T-limfociti migriraju u mezenterijalne limfne čvorove gde se dalje diferencijuju, a zatim, putem ductus thoracicusu dospevaju u krv. Efektorske/memorijske ćelije aktivirane antigenom u crevima, bivaju predominantno regrutovane u lamini propriji sluznice creva (40, 48).

Broj T-limfocita u crevima je veliki. Podaci o broju ćelija u svakom od odeljaka nisu do kraja ustanovljeni, zbog česte kontaminacije uzoraka ćelijama iz drugih odeljaka intestinalne sluznice. Kod miševa, na primer, broj intraepitelnih limfocita u crevima (intraepitelni limfociti su predominantno T-limfociti) čini više od polovine ukupnog broja T-limfocita u perifernim limfatičnim organima. Dalje, smatra se da lamina proprija creva sadrži približno isti broj T-limfocita kao i epitel creva. Relativan broj T-limfocita u GALT-u je teško proceniti, ali se smatra da čine oko 10% od ukupnog broja ćelija u okviru GALT-a. Dakle, crevo sadrži više T-limfocita nego bilo koji drugi organ (48).

Morfološki, najveći procenat T-limfocita su male ćelije (oko 8 μm), sa sferičnim, pretežno heterohromatičnim jedrom. Perinuklearno, u uskom prstenu citoplazme, uočava se *Gall*-ovo telašće, koje čine primarni lizozomi i lipidne kapi. Manji procenat citotoksičnih T-limfocita ima izgled velikih limfocita sa granulama (LGL; engleski, large granular lymphocytes). To su krupne ćelije (do 12 μm), sa širim prstenom citoplazme oko ugnutog jedra. Zrnast izgled ovim ćelijama daju azurofilne granule u citoplazmi (azurofilne granule predstavljaju primarne lizosome). U citoplazmi se nalaze i brojne mitohondrije kao i dobro razvijen Goldžijev aparat (19).

T-limfociti su najintezivnije proučavane imunske ćelije u tumorima. Danas im se pridaje veliki značaj i smatra se da je povećan broj citotoksičnih i memorijskih T-limfocita unutar samog tumora, povoljan prognostički faktor (49, 50).

Ekstracelularni matriks

Ekstracelularni matriks se sastoji iz osnovne supstance i vezivnih vlakana. On ne samo da obezbeđuje mehaničku potporu ćelijama i transport hranljivih materija, već predstavlja i organizovanu mrežu u kojoj ćelije migriraju i međusobno interaguju (51, 52). Ekstracelularni matriks ima važnu ulogu u biohemijskim i biomehaničkim procesima tokom morfogeneze i diferencijacije. Na njegov značaj jasno ukazuje širok raspon sindroma koji se javljaju usled poremećaja različitih proteina ekstracelularnog matriksa (53).

Ekstracelularni matriks je veoma dinamična struktura koja podleže neprekidnom remodelovanju. Njegove molekularne komponente su podvrgnute brojnim posttranslacionim modifikacijama. Zahvaljujući svojim fizičkim i biohemijskim karakteristikama, ekstracelularni matriks obezbeđuje mehaničke osobenosti svakog organa (kao što su otpor silama istezanja i pritiska) i posreduje u održavanju ekstracelularne homeostaze i retencije vode u organizmu. Dodatno, ekstracelularni matriks doprinosi odgovarajućoj morfologiji i funkciji tkiva i organa vezujući brojne faktore rasta i interagujući sa receptorima na površini ćelija (51, 52).

Osnovna supstanca se sastoji od proteoglikana, glikozaminoglikana i glikoproteina.

Proteoglikani, u formi hidratisanog gela, zauzimaju najveći deo ekstracelularnog intersticijalnog prostora. Građeni su od molekula glikozaminoglikana kovalentno povezanih sa središnjim proteinom. U odnosu na središnji protein, lokalizaciju i vrstu glikozaminoglikana proteoglikani se dele u tri glavne familije: mali leucinima-bogati proteoglikani (small leucine-rich proteoglycans-SLRPs), modularni proteoglikani i proteoglikani na površini ćelije (54).

Glikozaminoglikani su dugački, nerazgranati i nesavitljivi polisaharidi. Sastoje se od disaharidnih ponovaka u kojima je jedna komponenta uvek heksozamin (N-acetil glukozamin ili N-acetil galaktozamin), dok je druga uronska kiselina (iduronska ili glukuronska). Amino šećer u glikozaminoglikanima je najčešće sulfatisan (izuzev kod hijaluronske kiseline), a sadrže i karboksilne grupe, pa su zato izrazito negativnog naboja (polianjoni). Brojnim negativno naelektrisanim grupama glikozaminoglikani privlače katjone, pre svega natrijum. Visoka koncentracija natrijuma u osnovnoj

supstanci privlači molekule vode, koja putem hidracije ekstracelularnog matriksa doprinosi rezistenciji prema dejstvu kompresivnih sila (27).

Jedan od najznačajnijih i najzastupljenijih glikozaminoglikana u lamini propriji sluznice debelog creva je hijaluronska kiselina. Hijaluronska kiselina je polisaharid izgrađen od ponavljajućih jedinica D-glukuronske kiseline i N-acetil-glukozamina. Visoko naelektrisan, hidrofilni molekul hijaluronske kiseline je jedan od najvećih polisaharida u prirodi, ali i najjednostavniji po svojoj strukturi. Strukturno se razlikuje od ostalih glikozaminoglikana zato što ne podleže modifikacijama (na primer, nije sulfatisan) i ne grana se (linearan je). Najčešća, homeostatska forma hijaluronske kiseline je u vidu "lanaca" velike molekularne mase (oko 1000 kDa). Danas se hijaluronska kiselina ne smatra samo velikim molekulom koji "popunjava prostor" između ćelija i vlakana u vezivnom tkivu. Utvrđeno je da ima važnu ulogu u održavanju homeostaze i nastanku i progresiji brojnih patoloških stanja. Promene u sintezi ili razgradnji hijaluronske kiseline karakteristične su za mnoga patološka stanja, pre svega za nastanak tumora i metastaza. (55).

Pored brojnih i različitih bioloških efekata hijaluronske kiseline, koji su otkriveni u novije vreme i predmet su velikog interesovanja, ne može se zanemariti ni, odavno poznata, biomehanička uloga hijaluronske kiseline, u regulaciji zapremine tečnosti u tkivima (56).

Hijaluronska kiselina učestvuje u regulaciji zapremine tečnosti u homeostatskim uslovima, ali se njena uloga u nastanku edema unutar tumora veoma intenzivno proučava. Poznato je da unutar tumora, uključujući i tumor debelog creva, često postoji edem. Uloga edema unutar samog tumora nije do kraja ispitana. Edem unutar tumora može biti veoma različitog porekla (56).

Sa mehaničke tačke gledišta, sve komponente tumora interaguju jedne sa drugima, što rezultuje generisanjem mehaničkog stresa između njih, koji utiče na progresiju bolesti (56). Mehanički stres može poticati od solidnih komponenata tumora (pre svega tumorskih i stromalnih ćelija i ekstracelularnog matriksa) ili od intersticijalne tečnosti. Mehanički stres poreklom od solidnih komponenata tumora naziva se solidni stres (*solid stress*); za stres poreklom od intersticijalne tečnosti često se koristi termin pritisak intersticijalne tečnosti (*interstitial fluid pressure, IFP*) (56, 57).

Solidni stres se dalje može podeliti na 3 komponente: stres koji proizilazi iz recipročnih interakcija rastućeg tumora i tkiva domaćina, rezidualni stres i tzv. stres usled bubrenja/vezivanja tečnosti (*swelling stress*) (56, 58, 59).

Tumori bogati hijaluronskom kiselinom karakterišu se velikom gustinom negativnog naelektrisanja, zbog prisustva brojnih negativno naelektrisanih grupa na molekulima hijauronske kiseline. Negativno naelektrisanje imobilise intersticijalnu tečnost i dovodi do formiranja želatinoznih regiona unutar tumora (56, 60). Odbojne elektrostatičke sile između blisko postavljenih, brojnih, negativno naelektrisanih grupa, uzrokuju bubrenje ovih regiona. Dodatno, u tumorima bogatim hijaluronskom kiselinom, zbog velike gustine negativnog naelektrisanja, a da bi tumor postigao elektroneutralnost, veliki broj pozitivnih jona mora biti prisutan u intersticijalnom prostoru. Višak katjona u intersticijalnom prostoru dovodi do nastanka razlike u Donanovom osmotskom pritisku tečnosti između unutrašnjosti tumora i okoline tumora (56, 61, 62).

Glikoproteini ekstracelularnog matriksa uglavnom imaju adhezivnu ulogu, povezuju ćelije sa različitim komponentama matriksa. Oni omogućavaju adheziju i migraciju ćelija kroz matriks, a istovremeno i integraciju ekstracelularne mreže sa intercelularnim citoskeletnim strukturama, te na taj način mogu uticati na gensku ekspresiju i fenotipske karakteristike ćelija (63).

Periostin je glikoprotein ekstracelularnog matriksa rasprostranjen u kolagenom-bogatoj stromi (na primer, u periodontalnom ligamentu, periosteumu, fasciji skeletnih mišića i srčanim zaliscima). Deponovanje periostina povećava se sa povećanjem pritiska na tkiva (64, 65). U lamini propriji sluznice debelog creva periostin se nalazi oko kripte, neposredno uz perikriptalne miofibroblaste koji ga i sintetišu. Zajedno sa perikriptalnim miofibroblastima, periostin regulise proliferaciju epitelnih ćelija u normalnom kolonu. U lamini propriji sluznice debelog creva zahvaćenoj inflamacijom periostin pokazuje drugačiju distribuciju: difuzno je eksprimiran po celoj lamini propriji i smatra se da ima ulogu u očuvanju integriteta mukoze (66). Zastupljenost periostina značajno se menja se i u karcinomu debelog creva. U samom tumoru, periostin stimuliše proliferaciju, migraciju i rezistenciju tumorskih ćelija na terapiju (65, 67).

Vezivna vlakna daju tkivu čvrstinu, suprostavljaju se silama istezanja i pritiska, a takođe omogućavaju i elastična svojstva. Vezivna vlakna ECM možemo podeliti na

kolagena, elastična i retikularna. Klasifikacija se bazira na mikroskopskom izgledu i biohemijским karakteristikama. Kolagena i retikularna vlakna su izgrađena od proteina kolagena, dok su elastična izgrađena od proteina elastina (27).

Kolageni spadaju u najrasprostranjenije proteine u čovečijem telu i predstavljaju glavnu komponentu vezivnih tkiva. Do sada je identifikovano najmanje 30 različitih gena koji kodiraju više od 25 različitih tipova kolagena. Kolageni se grupno klasifikuju prema funkciju koju obavljaju, arhitekturi i supramolekularnoj organizaciji. Najzastupljeniji su vlaknasti kolageni (učestvuju u izgradnji kolagenih vlakana, kao što su tip I, II i III, V i IX), koji čine 80-90% kolagena kod ljudi. Ostali tipovi kolagena formiraju mrežaste strukture (tip IV, VII i X) i ankorirajuće filamente (VI i VII) (68).

Najzastupljeniji od svih kolagenih molekula je kolagen tip I, koji je u vidu snopova pravilno raspoređen oko kripte i kroz laminu propiju debelog creva.

Retikularna vlakna su veoma tanka vlakna (0.5–2 μm), koja formiraju mrežu u određenim organima, uključujući crevo. Iako u osnovi predstavljaju kolagena vlakna (kolagen tip III) zbog specifičnih načina bojenja ranije su izdvojena u posebnu grupu. Naime, ona pokazuju argirofiliju (boje srebrnim bojama) i pomoću PAS reakcije (kojom se boje ugljeni hidrati), zato što sadrže 6–12% heksoze, za razliku od molekula kolagena I koji sadrže svega oko 1% ugljenih hidrata. Vlakna se sastoje iz fibrila debljine oko 35 nm i stvaraju finu i fleksibilnu mrežu kroz koju ćelije migriraju i međusobno interaguju (27, 51).

Elastična vlakna se veoma slabo boje standardnim histološkim bojenjima, zato što sadrže veoma malo aminokiselina sa nabojem. Specijalne boje, kao što je Verhoeff-ova boja ili Weigert-ov rezorcin-fuksin se koriste u bojenju ovih vlakana za svetlosnu mikroskopiju. U lamini propiji debelog creva elastična vlakna su slabo zastupljena (27).

Komponente ekstracelularnog matriksa, ne samo da pružaju mehaničku potporu, već putem interakcija sa ćelijama mukoze debelog creva utiču na ćelijsku migraciju, rast, diferencijaciju i polarizaciju, na smrt ćelija, regrutovanje ćelija iz krvi u tkiva, lokalni imunitet i mnoge druge procese (52, 69).

Danas se naročito intezivno proučavaju mehanizmi interakcije ćelija i komponenata ECM (pre svega kolagena) u procesu ćelijske migracije.

Postoje dva glavna načina migracije ćelija kroz ECM: proteolitička i neproteolitička migracija ćelija (70).

Poroznost ekstracelularnog matriksa i sposobnost ćelija i ECM (kolagena, pre svega) da se deformišu, glavni su parametri koji utiču na tip migracije ćelija.

U slučaju proteolitičke migracije, karakteristike ECM, citokini i faktori rasta koji prate migraciju stromalnih i tumorskih ćelija, stimulišu sintezu i sekreciju enzima koji razgrađuju ECM: katepsini, serin proteaze i/ili matriks metaloproteinaze (MMP). Svi navedeni enzimi razgrađuju ECM na tri načina: difuznom proteolizom; prostorno ograničenom, kontak zavisnom proteolizom i intracelularnom degradacijom u lizozomima (70, 71, 72). Difuzna proteoliza komponenata ECM odigrava se posredstvom proteolitičkih enzima lokalizovanih pericelularno ili još dalje od površine ćelije. Proteolitički enzimi u slučaju difuzne proteolize mogu poticati od ćelija u datom tkivu (na primer, MMPs) ili iz plazme (plazminogen). Difuzna proteoliza za posledicu ima nelokalizovanu ili slabo lokalizovanu degradaciju ECM (70, 73). Kontak-zavisna proteoliza je topografski kontrolisana razgradnja komponenata ECM, koji neposredno okružuju ćeliju i dodiruju je pasivno ili se aktivno, putem receptora vezuju za površinu ćelije. U kontakt-zavisnu proteolizu uključene su matriks metaloproteinaze usidrene u ćelijsku membranu (*membrane-tethered matrix metaloproteinases*, MT-MMPs). Kontakt-zavisna proteoliza vodi lokalizovanoj razgradnji ECM u neposrednoj blizini ćelije, formiranju pora u matriksu kroz koji ćelije migriraju i promeni orijentacije komponenata ECM u cilju formiranja puteva za lakšu migraciju ćelija. Ovaj tip razgradnje komponenata ECM (pri čemu je razgradnja kolagena najintezivnije proučavana) je najznačajniji prilikom proteolitičke migracije ćelija. Intracelularna proteoliza podrazumeva razgradnju inernalizovanih komponenata ECM u lizozomima. Često prati kontak-zavisnu proteolizu: nakon razgradnje, na primer, kolagena, matriks metaloproteinazama, fragmetni kolagena se unose u ćeliju receptorima-posredovanom endocitozom (70, 74, 75).

U odsustvu proteolitičke razgradnje komponenata ECM, bilo zbog nemogućnosti sinteze i sekrecije proteaza (na primer, u slučaju T-limfocita) ili zbog prisustva endogenih ili terapijski primenjenih inhibitora proteaza, ćelije migriraju mehanizmima neproteolitičke migracije (76, 77). Zbog nemogućnosti da razgrade komponenete ECM, ćelije moraju da promene svoj oblik ili da privremeno deformišu ECM sa ciljem da

prošire prostor između njegovih komponenata (76. 78). U zavisnosti od elastičnosti komponenata ECM i veličine prostora između njih, ćelije: deformišu telo i nukleus, kako bi se prilagodile veličini pora u ECM; privremeno deformišu komponente ECM, fizičkim potiskivanjem posredstvom aktinskih i miozinskih filamenta; ili, u slučaju kada predhodna dva načina nisu moguća, prilagođavaju smer kretanja orijentaciji komponenta ECM, krećući se duž, pre svega kolagenih, vlakana (70, 71, 79).

1.4 Karcinom debelog creva

Karcinom debelog creva je treći najčešći karcinom u svetu. Od njega godišnje oboli oko 1,4 miliona ljudi (80). U Srbiji se, po učestalosti, nalazi na drugom mestu (posle karcinoma pluća kod muškaraca i karcinoma dojke kod žena) (81). Prognoza bolesti direktno zavisi od stadijuma u kojem je tumor otkriven. Zato su dobar skrining, rana dijagnoza i brza terapija neophodni.

Karcinom debelog creva je multifaktorska bolest. Nastaje kombinacijom genetskih faktora i faktora sredine, među kojima su najvažniji ishrana, pušenje, fizička aktivnost i starenje (82).

Više od 90% karcinoma debelog creva su adenokarcinomi. Adenokarcinom vodi poreklo od epitelnih ćelija debelog creva (83).

1.5 Interakcije između tumorskih ćelija i strome tumora

Uprkos ogromnim naporima uložnim u razumevanje započinjanja rasta tumora, progresije i nastanka metastaza, ovi procesi još uvek nisu do kraja rasvetljeni. Veliki korak u razumevanju navedenih procesa napravljen je kada su tumori prestali da se proučavaju isključivo sa stanovišta mutiranih ćelija. Kao što se u sluznici zdravog debelog creva osim epitelnih, nalaze i brojni drugi ćelijski tipovi, tako se i u tumoru debelog creva osim mutiranih epitelnih ćelija, nalaze i fibroblasti, miofibroblasti, ćelije mijeloidne loze i limfociti. Tumori su prepoznati kao kompleksni heterocelularni sistemi koji se razvijaju isključivo kroz složene multidirekzione interakcije između različitih ćelijskih tipova (84).

Naime, najveći broj karcinoma ograničen je na *in situ* lezije, koje ostaju nedetektovane tokom celog života individue. Još uvek nije razjašnjeno zašto samo mali procenat ovih lezija progredira u karcinome. Šta više, najveći broj mutacija koje su prisutne u

invazivnim i metastatskim karcinomima, prisutan je i u premalignim lezijama. Ovakav nalaz pokreće pitanje da li su prisutne mutacije primaran uzrok nastanka karcinoma ili samo omogućavaju njegovo dalje napredovanje. Zapravo, postavlja se pitanje da li i jedna do sada identifikovana mutacija može inicirati nastanak tumora. Ekstreman stav je da ni jedna od detektovanih mutacija, sama, nije pokretač nastanka tumora, već je to mikrosredina u kojoj se mutirana ćelija nalazi (84, 85). Promene u stromi tumora do sada su posmatrane kao sekundarne promene, indukovane promenama u epitelnim ćelijama. Novija istraživanja ukazuju da promene u stromi mogu imati primarnu ulogu ili makar, ulogu sasvim ravnopravnu promenama u epitelnim ćelijama (85).

U poslednje vreme sve češći predmet istraživanja su interakcije između tumorskih ćelija i vezivno-tkivnih elemenata koji čine stromu tumora (86). Široko definisano, stroma tumora obuhvata sve strukturne i celularne komponente tumora, osim samih tumorskih ćelija: komponente ekstracelularnog matriksa (vezivna vlakna i osnovnu supstancu), krvne i limfne sudove, nervna vlakna, fibroblaste, miofibroblaste, nervne ćelije i ćelije imunskog sistema koje infiltrišu tumor. Normalne i tumorske ćelije oslobađaju brojne solubilne faktore, koji imaju kako lokalno tako i sistemsko dejstvo. Ovi solubilni faktori obuhvataju citokine, hemokine, reaktivne kiseonične radikale, faktore rasta, enzime i druge produkte. Između ćelija, solubilnih faktora i ekstracelularnog matriksa uspostavljaju se složene i dinamične interakcije koje utiču na nastanak specifične mikrosredine tumora (69, 87). Sa jedne strane, progresija i agresivnost tumora mogu biti povećane kroz uticaj koji ostvaruju stromalne ćelije direktnim kontaktima ili preko sekretovanih molekula (88, 89). U debelom crevu, na primer, invazivni potencijal tumora može biti povećan interakcijom sa fibroblastima strome (89, 90). Sekretijom faktora rasta (TGF- β , FGF, VEGF...) mutirane epitelne ćelije mogu indukovati transdiferencijaciju normalnih fibroblasta u miofibroblaste, koji zatim proizvode faktore koji stimulišu progresiju tumora (amfiredulin, HGF, FGF, wnt molekule, periostin...) (88, 91, 92, 93).

Da bi se dobila kompletnija slika o mikrosredini u kojoj se tumor razvija, pored interakcija epitelnih ćelija sa fibroblastima i miofibroblastima, veoma su važne interakcije tumorskih ćelija sa ćelijama urođenog i stečenog imunskog sistema (84).

Neposredno ispod epitela, u lamini proprijiji sluznice debelog creva nalazi se veliki broj makrofaga. Tumor asocirani makrofazi (*tumor-associated macrophages*, TAMs) mogu

se podeliti na M1 (pro-inflamatorne makrofage) i M2 (anti-inflamatorne makrofage). Mutirane epitelne ćelije mogu proizvoditi IL-10 (94) i CCL2 (95) koji učestvuju u regrutaciji TAM i indukovanju M2 fenotipa. M1 TAM stimulišu CD8⁺ T-limfocite i sprečavaju progresiju tumora. M2 TAM, sa druge strane, stimulišu progresiju tumora sekrecijom faktora rasta i citokina koji podstiču proliferaciju tumorskih ćelija. M2 TAM stimulišu angiogenezu i sekrecijom brojnih proteaza učestvuju u remodelovanju komponenata ekstracelularnog matriksa. M2 TAM su takođe važan izvor TGF-β, i zajedno sa tumorskim ćelijama učestvuju u regrutovanju fibroblasta u tumor i njihovoj transdiferencijaciji u miofibroblaste (96).

Prisustvo velikog broja CD8⁺ citotoksičnih T-limfocita i CD45RO⁺ memorijskih T-ćelija u samom tumoru i na invazivnim marginama, jedan je od najznačajnijih markera povoljne prognoze za gotovo sve tipove tumora (50). Sa druge strane, prisustvo regulatornih T-limfocita (Treg) povezano je sa supresijom tumor-specifičnih citotoksičnih T-limfocita i bržom progresijom tumora (97). Same tumorske ćelije, sekrecijom GM-CSF, mogu stimulisati regrutaciju i diferencijaciju mijeloidnih supresorskih ćelija, koje zauzvrat inhibiraju tumor specifične CD8⁺ citotoksičnih T-limfocite (98, 99).

Uloga tumor-infiltrirajućih B-limfocita dugo je bila zanemarena. Danas se smatra da B-limfociti u samom tumoru mogu stimulisati progresiju maligne bolesti, na više načina: stimulacijom proliferacije tumorskih ćelija posredstvom IL-35; inhibicijom tumor specifičnih CD8⁺ citotoksičnih T-limfocita; preusmeravanjem Th1 imunskog odgovora usmerenog ka eliminaciji tumora u Th2 imunski odgovor koji pogoduje progresiji tumora; lokalnom ekspanzijom Treg (100, 101). Sa druge strane, nedavno je pokazano da je povećana infiltracija tumora debelog creva B-limfocitima povezana sa dužim petogodišnjim preživljavanjem i manjom učestalošću metastaza (102, 103).

U regulaciji progresije maligne bolesti i nastanku metastaza učestvuju u većoj ili manjoj meri i sve druge ćelije prisutne u stromi tumora.

Navedene interakcije su dodatno modifikovane sposobnošću ekstracelularnog matriksa da deponuje različite solubilne i nesolubilne faktore, štiteći ih na taj način od degradacije (69, 104).

1.6 Prelazna sluznica

Pored istraživanja interakcija tumorskih ćelija i stromalnih elemenata samog tumora u progresiji maligne bolesti, pokazano je da postoje promene u nezahvaćenoj sluznici u neposrednoj okolini tumora (tzv. prelaznoj sluznici). Pojam "prelazna sluznica" najčešće se odnosi na sluznicu udaljenu do 2 cm od ivice tumora (105). Poznato je da u prelaznoj sluznici postoje genetske (106), epigenetske (107, 108) i biohemijske promene (109) po kojima ova sluznica podseća na tumor.

Promene prelazne sluznice debelog creva opisane su kako na epitelnim ćelijama, tako i u lamini propriji. Opisana je povećana proliferacija epitelnih ćelija debelog creva (110), povećanje dužine i širine Liberkinovih kripti, promena u sintezi mukusa (111, 112), promena broja kapilara i malih krvnih sudova (109), kao i pojava limfnih sudova u prelaznoj sluznici debelog creva (113). Takođe, opisane su i promene u broju perikriptalnih miofibroblasta (114).

Međutim, zanemareno je proučavanje nezahvaćene sluznice na većoj udaljenosti od tumora.

1.7 Nezahvaćena sluznica na većoj udaljenosti od tumora

U literaturi izostaju jasni podaci o tome da li su opisane promene ograničene samo na prelaznu sluznicu u neposrednoj blizini tumora ili postoje u nezahvaćenoj sluznici i na većoj udaljenosti od malignog tumora. Uprkos ovome, pojedini istraživači ovu sluznicu koriste kao normalno, nepromenjeno tkivo (115).

Smatramo da je potrebno obratiti pažnju i na nezahvaćenu sluznicu na većoj udaljenosti od tumora jer se može pretpostaviti da je ona, takođe, promenjena na osnovu sledećih nalaza:

- 1) sam rastući tumor ili faktori koje tumor oslobađa mogu delovati kako lokalno, tako i na većoj udaljenosti (116);
- 2) prema "*field carcinogenesis*" konceptu, koji je u novije vreme veoma aktuelan, najpre postoji izmenjeno "polje" u sluznici debelog creva, a zatim se, na jednom ili više mesta na izmenjenoj sluznici "polja" razvija tumor (109, 111).

1.8 "Field carcinogenesis" koncept

"*Field carcinogenesis*" koncept prvi je predložio Slaughter 1953. godine za skvamocelularni karcinom usne duplje. Zapazio je da je značajan procenat karcinoma

usne duplje multifokalan, i da se u okolini karcinoma nalaze izmenjene ćelije (117). Od tada je ovaj koncept proširen na gotovo sve druge karcinome.

"*Field carcinogenesis*" koncept se naročito intezivno proučava u debelom crevu. Najpre, karcinogeni poreklom iz spoljašnje sredine (pre svega, hrane) deluju na celu sluznicu debelog creva, pa se prisustvo genetskih ili epigenetskih promena može očekivati i van samog tumora. Zatim, zapaženo je da sinhroni karcinomi debelog creva često imaju iste genetske mutacije. Takođe, kada je kod pacijenta otkriven jedan karcinom debelog creva, pacijent je u povećanom riziku od nastanka karcinoma na drugom mestu u debelom crevu (109).

U debelom crevu, prema ovom konceptu, genetski faktori i faktori sredine dovode do promene u širem "polju" u sluznici debelog creva. Ćelije "polja" zadobile su pro-tumorogene mutacije, koje same po sebi nisu dovoljne da dovedu do nastanka tumora ali povećavaju rizik. Drugim rečima, *field carcinogenesis*" predstavlja jedan od ranih koraka u razvoju tumora i označava stanje povećanog rizika od neoplastične transformacije (109, 118).

Postojanje teorije "polja" i poznavanje i detektovanje početnih promena u sluznici debelog creva, bilo bi važan korak u ranijem otkrivanju karcinoma debelog creva.

Uprkos brojnim dokazima da u debelom crevu osoba sa karcinomom mogu postojati promene i na drugim mestima u sluznici debelog creva, u literaturi se veoma često sluznica na većoj udaljenosti od 2 cm od tumora smatra normalom sluznicom, i koristi kao kontrola u istraživanjima (115).

Za proučavanje udaljene nezahvaćene sluznice u okolini tumora odabrali smo debelo crevo, pošto je ovaj organ često zahvaćen malignom bolešću, a primarna tumorska lezija i nezahvaćeni deo organa su relativno lako dostupni.

Detaljna ispitavanja svih strukturnih i celularnih komponenti naizgled zdrave sluznice udaljene 10 cm ili 20 cm od adenokarcinoma debelog creva mogu doprineti boljem razumevanju složenih odnosa između tumora i strome. Ovo istraživanje, pored naučnog, može imati i klinički značaj, pre svega u dijagnostikovanju, ali i terapiji pacijenata sa adenokarcinomom debelog creva.

2. Ciljevi istraživanja

1. Morfometrijska analiza strukturnih i celularnih elemenata sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora i poređenje sa sluznicom debelog creva uzetom sa iste lokacije kod pacijenata bez malignog tumora.
2. Detektovanje i kvantifikovanje promena epitelnih ćelija sluznice debelog creva (promene u sekreciji sulfomucina i sijalomucina, proliferaciji i fraktalna analiza hromatina u jedrima epitelnih ćelija) na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora i poređenje sa epitelnim ćelijama sluznice debelog creva uzetim sa iste lokacije kod pacijenata bez malignog tumora.
3. Detektovanje i kvantifikovanje strukturnih elemenata lamine proprije sluznice debelog creva (krvnih i limfnih sudova, kolagenih vlakana, retikularnih vlakana, periostina i hijaluronske kiseline) na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora i poređenje sa laminom proprijom sluznice debelog creva uzetom sa iste lokacije kod pacijenata bez malignog tumora.
4. Detektovanje i kvantifikovanje celularnih elemenata lamine proprije sluznice debelog creva (fibroblasta, miofibroblasta, makrofaga, T-limfocita, B-limfocita, plazma ćelija i dendritskih ćelija) na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora i poređenje sa sa laminom proprijom sluznice debelog creva uzetom sa iste lokacije kod pacijenata bez malignog tumora.

3. Materijal i metode

3.1 Uzorci sluznice debelog creva

Korišćeni su uzorci sluznice debelog creva dobijeni biopsijom u Centru za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“ u Beogradu prilikom pregleda osoba obolelih od malignog tumora ovog organa (histopatološkom analizom kod svih ispitanika potvrđeno je prisustvo adenokarcinoma debelog creva). Prilikom dijagnostičkog pregleda, uzimani se uzorci sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm kaudalno od primarne tumorske lezije. Ispitani su uzorci sluznice debelog creva 40 osoba starijih od 60 godina (demografski podaci o ispitanicima prikazani su u Tabeli 1). Kod svih ispitanika radilo se o novootkrivenom tumoru, tako da niko od ispitanika nije prethodno bio podvrgnut bilo kakvom vidu terapije maligne bolesti. Kao kontrola korišćeni su uzorci sluznice debelog creva 50 zdravih osoba, odgovarajuće starosti, dobijenih biopsijom u istoj ustanovi prilikom endoskopskog skrininga asimptomatskih osoba sa familijarnim opterećenjem za malignitet creva. Svi ispitanici bili su na standardnom režimu mešovite ishrane. Pacijenti sa divertikularnom bolesti debelog creva, inflamatornim bolestima creva ili infektivnim kolitisom nisu uključeni u studiju. Uzorci su uzimani uz saglasnost etičkog komiteta KBC „Zvezdara“ (17/05/2017).

Tabela 1. Demografske karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje

Ispitanici	Broj	Starost (u godinama)	Pol	
			Muškarci	Žene
Sa tumorom	40	72.9 ± 8.2	22	18
Zdravi	50	74.6 ± 7.3	29	21

3.2 Morfometrijska analiza sluznice debelog creva

Uzorci sluznice debelog creva fiksirani su u 10% formalinu i kalupljeni u parafinu. Iseći debljine 3–5 µm bojeni su standardno hematoksilinom i eozinom (119). Morfometrijska analiza tkiva vršena je uz pomoć svetlosnog mikroskopa Opton Photomicroscope III (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Nemačka) ili svetlosnog mikroskopa Leica DM400 B LED (Leica, Wetzlar, Germany) na uveličanju ×100 i ×250. Ručno obeleženi elementi tkiva na mikrofotografijama preparata, dobijenih digitalnom

kamerom Olympus C3030-Z (Olympus, Tokyo, Japan) ili digitalnom kamerom Leica DFC295 (Leica, Heerbrugg, Switzerland) i projektovanih na ekran monitora, mereni su primenom posebnog softvera Analysis 3.1 (Soft Imaging System GmbH, Münster, Nemačka).

Na uveličanju $\times 100$ na svakom isečku mereni su: gustina kripti (izražena kao broj kripti na $0,1 \text{ mm}^2$ površine tkiva) na poprečnim presecima sluznice, a na uzdužnim presecima visina sluznice (po 3 merenja na svakom isečku) i dubina kripti (sve dostupne kripte na isečku) (Slika 1).



Slika 1. Uzdužni presek sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora. Na uzdužnim presecima merena je visina sluznice i dubina Liberkinovih kripti. Hematoksilin eozin bojenje, $\times 100$

Na uveličanju $\times 250$ na svakom isečku su mereni: obim, prečnik i visina epitela poprečnih preseka Liberkinovih kripti (po 6 kripti na svakom isečku, Slika 2) i visina epitela sluznice (po 3 merenja na svakom isečku).



Slika 2. Poprečni presek sluznice debelog creva na udaljenosti 20 cm od tumora. Na poprečnim presecima mereni su prečnik, obim i visina epitela Liberkinovih kripti. Hematoksilin eozin bojenje, x200

Broj ćelija lamine proprije sluznice rektuma (izražen kao broj ćelija na $0,1 \text{ mm}^2$ površine lamine proprije) određivan je na poprečnim presecima sluznice na uveličanju $\times 250$ (po 3 merenja na svakom isečku).

3.3 Fraktalna i teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva

Fraktalna i teksturalna analiza rađena je na isečcima obojenim toludin plavim (120). Uzorci sluznice debelog creva slikani su na mikroskopu *Olympus CX21FS1* (*Olympus Corporation, Tokyo, Japan*) sa kamerom *Pro-MicroScan DEM 200* (*Oplenic Optronics, Hangzhou, China*) na uveličanju $\times 1000$. Na svakom isečku analizirano je 200 jedara epitelnih ćelija: po 50 jedara u površnom epitelu, vratu, telu i dnu Liberkinovih kripti.

Fraktalna analiza

Fraktalna analiza jedara epitelnih ćelija debelog creva rađena je *Standard box counting* metodom u okviru *FracLac plugin-a* (*Bethesda 2.5, Release 1e; developed by A. Karperien, Charles Sturt University, Australia*) u programu *Fiji* (121, 122).

Jedra su izdvajana sa fotomikrografija u programu *Fiji* na sledeći način: *Freehand selection tool* > *Crop* > *Clear outside* > *Save as tif*. Svaka slika izolovanog jedra je zatim prevedena u binarni format i analizirana: *Fiji* > *Plugins* > *Fractal analysis* > *FracLac_2.5 Release 1e* > *Standard box count* > *Auto Threshold to Binary*.

Fraktalnom analizom dobijamo informacije o fraktalnoj dimenziji i lakunarnosti.

Merenje fraktalne dimenzije na dvodimenzionalnim binarnim fotografijama, pruža informaciju o načinu na koji posmatrana struktura "popunjava" prostor; o kompleksnosti posmatrane strukture. Lakunarnost meri poroznost, nehomogenost, translacionu i rotacionu invarijantnost. Lakunarnost bioloških struktura korelira sa njihovom heterogenošću (123).

Teksturalna analiza

Teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva urađena je u programu *ImageJ* uz upotrebu *plugin-a Texture Analyser* (122). Pre analize, slike izolovanih jedara u tif formatu konvertovane su u 8-bitne slike. Teksturalna analiza pruža podatke o sledećim parametrima: *Angular second moment*, *correlation*, *inverse difference moment*, *entropia* i *variance*.

Drugi angularni momenat (*Angular second moment*) je indirektna mera teksturalne uniformnosti i homogenosti susednih sivih polja na 8-bitnim-grey scale slikama. Što je slika homogenija, drugi angularni momenat će biti veći. Korelacija (*correlation*) je mera postojanja i jačine linearne povezanosti između susednih sivih polja na 8-bitnim-grey scale slikama. Inverzni momenat razlike (*inverse difference moment*) takođe zavisi od homogenosti slike; pokazuje niske vrednosti kod nehomogenih i relativno visoke vrednosti kod homogenih slika. Entropija (*entropia*) je parametar koji meri neuređenost; nehomogene slike imaju manju, a homogene slike veću entropiju. Varijansa (*variance*) je mera odstupanja inteziteta sivih piksela od srednje vrednosti (124, 125).

3.4 Identifikacija sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama sluznice debelog creva

Za detektovanje promena u sekreciji mucina u peharastim ćelijama epitela debelog creva korišćeno je histoheмиjsko bojenje sa gvožđe diaminom i alcian plavim (*high iron diamin/alcian blue*) (126). Ukratko, nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidratacije kroz opadajuće koncentracije alkohola, tkivo je potapano u rastvor gvožđe diamina tokom 18h. Rastvor gvožđe diamina sadrži *N,N*-dimetil-*m*-fenilendiamin (Merck, Darmstadt, Germany), *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin (Merck, Darmstadt, Germany) i gvožđe(III)-hlorid Merck, Darmstadt, Germany). Nakon ispiranja u tekućoj vodi, tkivo je potapano u rastvor alcian plavog, tokom 30 minuta. Tkivo je ponovo ispirano tekućom vodom, dehidrirano kroz rastuće koncentracije alkohola, ksilol i pokrivano DPX-om.

Kvantifikacija sulfomucina i sijalomucina u debelom crevu vršena je na uzdužnim presecima sluznice debelog creva, tako što je određivan broj HID-pozitivnih/Alcian blue-pozitivnih ćelija duž celih Liberkinovih kriпти i izražen kao procenat HID-pozitivnih/Alcian blue-pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija u kriпти.

3.5 Detektovanje proliferacije epitelnih ćelija debelog creva

Za detektovanje proliferacije epitelnih ćelija debelog creva korišćeno je anti-Ki67 antitelo (Abcam, Velika Britanija).

Imunohistoheмиjsko bojenje anti-Ki67 antitelom rađeno je prema protokolu za dato antitelo. Ukratko: nakon deparafinisanja isečaka i ispranja PBS-om (*Phosphate buffered solution*), pH=7,4, tokom 10 minuta, vršeno je demaskiranje antigena u citratnom puferu (pH=6), kuvanjem u mikrotalasnoj tokom 20 minuta. Delovanje endogene peroksidaze blokirano je komercijalnim preparatom (*EnVison™FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, SM801, Dako*) u toku 10 minuta. Isečci su inkubirani sa primarnim antitelima u razblaženju 1:500 tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Antitela su razblažena komercijalno dostupnim diluentom (*Large Volume UltraAb Diluent, Thermo Scientific LabVision, TA-125-UD*). Nakon ispiranja u PBS puferu, isečci su inkubirani sekundarnim antitelima obeleženim *HRP-om* (*EnVison™FLEX/HRP detection reagent, SM802, Dako*) sa tokom 20 minuta. Imunohistoheмиjska reakcija razvijena primenom hromogena DAB (3,3'-diaminobenzidin, *DAB, DM827, Dako*) rastvorenog odgovarajućem suspratu

(*EnVisionTMFLEX Substrate Buffer, SM803, Dako*) u trajanju od 5 minuta. Isečci su zatim kontrastno bojeni Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom 30 sekundi.

Na isečcima obojenim anti-Ki67 antitelom, u programu *Fiji*, određivan je broj proliferišućih epitelnih ćelija duž celih Liberkinovih kripti (Ki67 indeks) i po regionima (u donjoj, srednjoj i gornjoj trećini Liberkinovih kripti) i izražen kao procenat proliferišućih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija u kripti/tom delu kripti (127, 128).

3.5 Detektovanje krvnih i limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva

Na isečcima obojenim antitelima za detekciju krvnih i limfnih sudova (anti-CD34 DAKO, Sjedinjene Američke Države, anti-CD105, ThermoScientific, Sjedinjene Američke Države i anti-podoplanin antitelo, DAKO, Sjedinjene Američke Države) u lamini propriji sluznice debelog creva određivani su distribucija i broj krvnih/limfnih sudova.

Isečci za imunohistohemijsku analizu su deparafinisani i ispirani *TBS-Tween* puferom (*Tris buffer saline*), pH=7,4 u toku 10 minuta. Potom je vršeno demaskiranje antigena kuvanjem u Tris-EDTA rastvoru tokom 30 minuta. Delovanje endogene peroksidaze blokirano je komercijalnim preparatom (*Large Volume Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific LabVision, TA-060-HP*) u toku 10 minuta. Potom je nanošen komercijalni rastvor (*UltraV Block, Thermo Scientific LabVision, TA-060-UB*) radi blokiranja nespecifičnog bojenja. Isečci su inkubirani primarnim antitelima u razblaženju 1:100 tokom 60 min. Razblaženje koncentrovanih antitela vršeno je komercijalno dostupnim diluentom (*Large Volume UltraAb Diluent, Thermo Scientific LabVision, TA-125-UD*). Imunohistohemijska reakcija razvijena je sistemom *UltraVision (Thermo Scientific LabVision, TL-060-HL)* uz primenu hromogena DAB (3,3'-diaminobenzidin) u trajanju od 10 minuta. Isečci su zatim kontrastno bojeni Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom 30 sekundi. Negativne kontrole dobijene su izostavljanjem primarnog antitela. Kao pozitivna kontrola za CD105 antitelo korišćeni su isečci adenokarcinoma debelog creva.

Broj krvnih/limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva određivan je u programu *Fiji* na uveličanju x200 na 5 vidinih polja na svakom isečku. U svakom od vidnih polja označen je region od interesa koji je obuhvatao samo laminu propriju a isključivao kriptu. Za brojanje krvnih/limfnih sudova korišćena je *Multi-point* alatka.

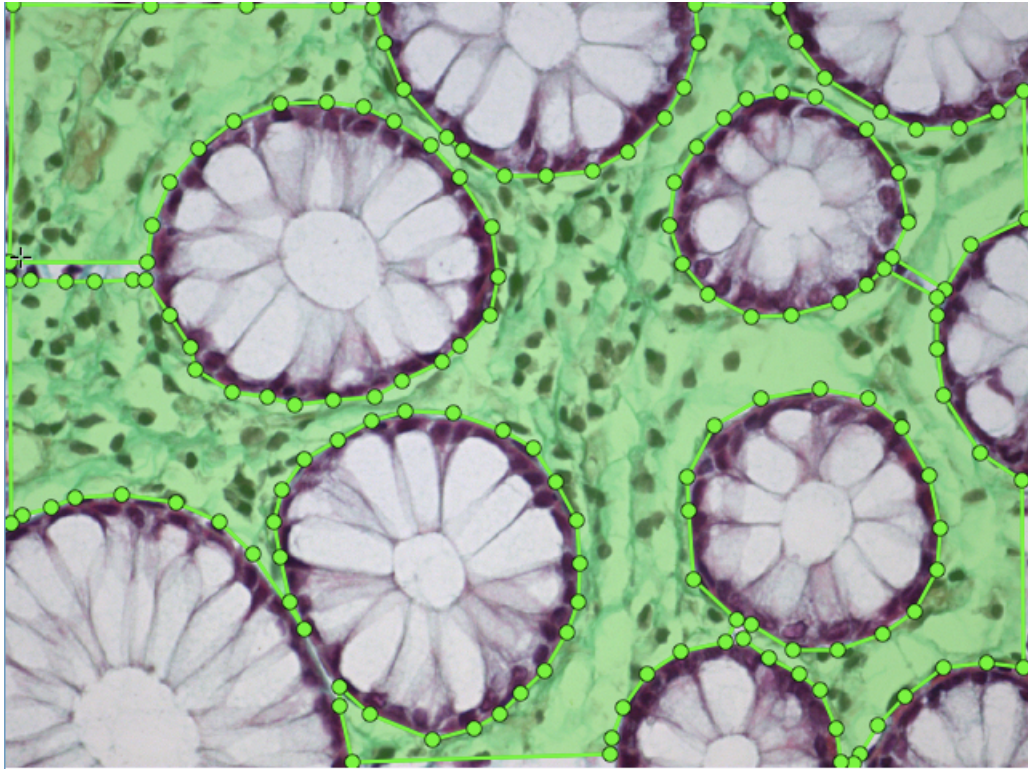
Broj krvnih/limfnih sudova izražen je na $0,1\text{mm}^2$ lamine proprije sluznice debelog creva (129).

Prilikom brojanja D2-40 pozitivnih limfnih sudova nisu obuhvaćeni limfni sudovi unutar i neposredno okolo izolovanih limfnih folikula.

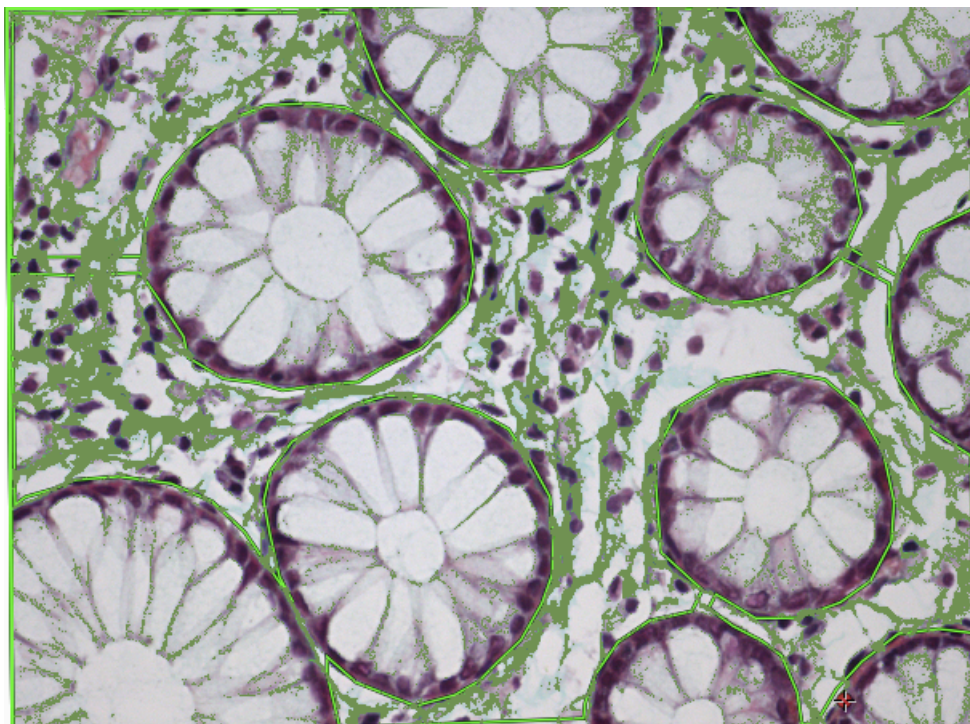
3.6 Detektovanje kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva

Za vizualizaciju kolagenih i retikularnih vlakana korišćena su histoheмиjska bojenja: *Masson trichrome* bojenje i impregnacija srebrom po Gomoriju (130).

Zastupljenost kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva merena je primenom plugin-a *Color Picker Threshold* u okviru programa *Icy* (131). Na svakom isečku merena je zastupljenost vlakana na 15 vidnih polja (5 subepitelno, 5 između kripti i 5 uz laminu muskularis mukoze), na uveličanju x400. *Color Picker Threshold plugin*-om za svaki isečak odabrano je 10 "pozitivnih" i 10 "negativnih" boja. "Pozitivne" boje predstavljale su različite nijanse zelene (kojom su na datom isečku obojena kolagena vlakna) ili nijanse sive i crne (kojom su na datom isečku obojena retikularna vlakna). "Negativne" boje predstavljale su različite nijanse crvene, braon i bela. Zastupljenost kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva izražena je u procentima i definisana kao površina pokrivena kolagenim ili retikularnim vlaknima u odnosu na površinu selektovane lamine proprije u kojoj je vršeno merenje (Slika 3 i Slika 4) (132).

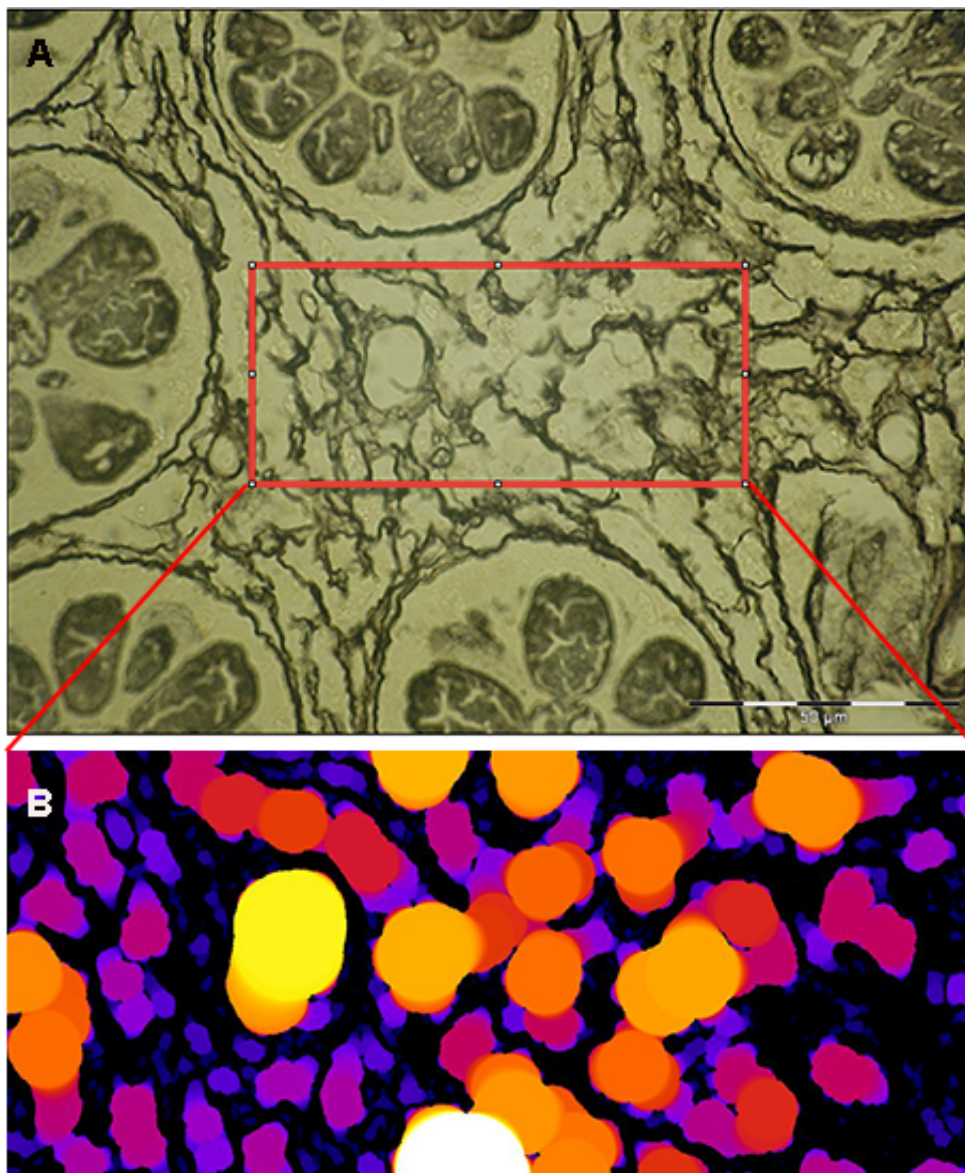


Slika 3. Poprečni presek sluznice debelog creva udaljene 20 cm od tumora; *Masson trichrome* bojenje. Region od interesa koji obuhvata samo laminu propriju sluznice debelog creva a isključuje kripte, označen u programu *Icy*. x400



Slika 4. Poprečni presek sluznice debelog creva udaljene 20 cm od tumora; *Masson trichrome* bojenje. Kolagena vlakna detektovana primenom *Color Picker Threshold plugin*-a u programu *Icy*. x400

Prostori između retikularnih vlakana mereni su primenom *plugin*-a *Bone J* u okviru programa *Fiji* (122, 133). Merenja su sprovedena na uveličanju x630, na 5 vidnih polja na svakom isečku. *Plugin Bone J* računa najveći mogući prečnik sfere koja može biti upisana u prostore između vlakana. Kako bi bile isključene kripte, merenja su sprovedena u okviru pravougaonika konstantne površine $3600 \mu\text{m}^2$ koji je upisivan u laminu propriju sluznice debelog creva (Slika 5).



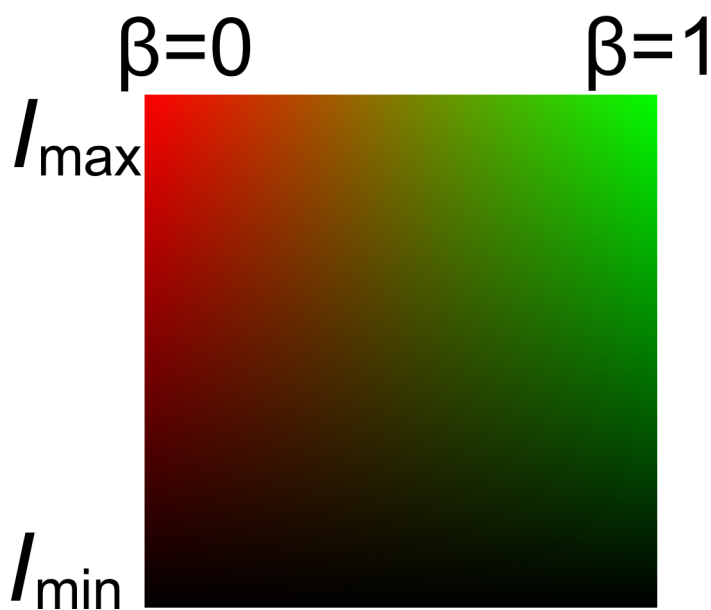
Slika 5. Retikularna vlakna na poprečnom preseku sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora; impregnacija srebrom po Gomoriju. Merenje prostora između retikularnih vlakana sprovodi se unutar pravougaonika konstantne površine koji se upisuje u laminu propriju sluznice debelog creva, kako bi se isključile kripe (A). *Plugin Bone J* računa najveći mogući prečnik sfere koja može biti upisana u prostore između vlakana. Grafički zapis *Plugin-a Bone J* (B), sfere većeg dijametra predstavljene su svetlijom bojom. x630

Za vizualizaciju kolagenih vlakana u nefiksiranom i neobojenom tkivu pacijenata korišćen je nelinearni laserski skenirajući mikroskop sa sposobnošću detekcije drugog harmonika (SHG-*Second Harmonic Generation*). Mikroskop se nalazi na Institutu za fiziku, Centar za fotoniku, Beograd (134). Femtosekundni laser

Ti:Sapphire (Coherent, Mira 900) usmeravan je na uzorak kroz 40x/1.3 NA uljani objektiv (Zeiss EC Plan-Neoflural). Ekscitacija je vršena talasnom dužinom od 840 nm. Za detekciju drugog harmonika korišćen je uskopojasni filter od 420 nm. Srednja snaga lasera bila je 30 mW; maksimalna snaga lasera bila je 2.5kW. Takođe, na istom mikroskopu, određivan je koeficijent anizotropije β koji daje informaciju o uređenosti kolagenih vlakana. Koeficijent anizotropije β određuje se prema formuli

$$\beta = (I_{\text{par}} - I_{\text{orth}}) / (I_{\text{par}} + 2I_{\text{orth}})$$

gde I_{par} i I_{orth} odgovaraju intenzitetu SHG signala detektovanog na istom mikroskopu, kada je polarizator postavljen paralelno i pod pravim uglom u odnosu na polarizaciju lasera (135). Koeficijent anizotropije β predstavljen je i kao slika—što je signal jači, slika je svetlija. Za vrednosti $\beta=0$ (neuređena struktura) slika je crvena, a za vrednost 1 (uređena struktura) slika je zelena.



Slika 6. Scale bar za vrednosti β -koeficijenta

Koeficijent anizotropije β meren je na 3 vidna polja na svakom isečku.

3.7 Detektovanje periostina u lamini propriji sluznice debelog creva

Za detektovanje periostina u lamini propriji sluznice debelog creva korišćeno je anti-periostin (Abcam, Velika Britanija) antitelo.

Ukratko: nakon deparafinisanja isečaka i ispranja PBS puferom (*Phosphate buffer*

saline), pH=7,4, tokom 10 minuta, vršeno je demaskiranje antigena citratnim puferom (pH=6), kuvanjem u mikrotalasnoj tokom 20 minuta. Delovanje endogene peroksidaze blokirano je komercijalnim preparatom (*EnVison™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, SM801, Dako*) u toku 10 minuta. Isečci su inkubirani sa primarnim antitelima u razblaženju 1:500 tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Antitela su razblažena komercijalno dostupnim diluentom (*Large Volume UltraAb Diluent, Thermo Scientific LabVision, TA-125-UD*). Nakon ispiranja u PBS puferu, isečci su inkubirani sekundarnim antitelima obeleženim HRP-om (*EnVison™ FLEX/HRP detection reagent, SM802, Dako*) sa tokom 20 minuta. Imunohistohemijska reakcija razvijena primenom hromogena DAB (3,3'-diaminobenzidin, *DAB, DM827, Dako*) rastvorenog odgovarajućem suspratu (*EnVison™ FLEX Substrate Buffer, SM803, Dako*) u trajanju od 5 minuta. Isečci su zatim kontrastno bojani Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom 30 sekundi

Merenje zastupljenosti periostina u lamini propriji sluznice debelog creva i dijametra prostora između molekula periostina primenom *plugin-a Color Picker Treshold* u okviru programa Icy i *plugin-a Bone J* u okviru programa Fiji urađeno je na predhodno opisan način (131, 133).

3.8 Detektovanje hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva

Za detektovanje hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva korišćeno je anti-HABP (*hyaluronic acid binding protein*) (DAKO, Sjedinjene Američke Države) antitelo.

Za anti-HABP antitelo primenjen je sledeći protokol: Nakon ispiranja TBS-om primenjen je 1% BSA (*bovine serum albumin*) kao proteinski blok. Vršena je inkubacija primarnim biotinizovanim antitelima tokom 60 minuta u razblaženju 1:75. Za razvijanje reakcije korišćen je VECTASTATIN ABC-AP kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i hromogen Permanent Red (Dako, Carpinteria, CA, USA) za vizualizaciju. Isečci su kontrastno bojani Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom 30 sekundi. Negativne kontrole dobijene su izostavljanjem primarnog antitela. Kao pozitivna kontrola za anti-HABP antitelo korišćeni su isečci humane nazalne mukoze.

Merenje zastupljenosti hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva i dijametra prostora između lanaca polimera hijaluronske kiseline primenom

plugin-a Color Picker Threshold u okviru programa *Icy* i *plugin-a Bone J* u okviru programa *Fiji* urađeno je na predhodno opisan način (131, 133).

U programu *Fiji*, korišćenjem istog *plug-ina Bone J* (133), na predhodno opisani način merili smo i debljinu "lanaca" polimera hijaluronske kiseline.

3.9 Detektovanje ćelija lamine proprije sluznice debelog creva

Za detaljnu analizu celularnih komponenti lamine proprije sluznice debelog creva parafinski kalupi sečeni su na isečke debljine 3-5 μm , a zatim su nakon deparafinizacije i antigenskog demaskiranja aplikovana antitela po protokolu za svako antitelo. Korišćena su sledeća antitela: za T-limfocite (anti-CD3 antitelo, DAKO, Sjedinjene Američke Države), B-limfocite (anti-CD20, DAKO, Sjedinjene Američke Države), makrofage (anti-CD68, DAKO, Sjedinjene Američke Države), plazma ćelije (anti-CD138, DAKO, Sjedinjene Američke Države), dendritske ćelije (anti-S100, Abcam, Velika Britanija), fibroblaste (anti-S100A4, DAKO, Sjedinjene Američke Države) i miofibroblaste (anti- α SMA antitelo, DAKO, Sjedinjene Američke Države).

Nakon deparafinisanja isečaka i ispranja PBS puferom (*Phosphate buffer saline*), pH=7,4, tokom 10 minuta, vršeno je demaskiranje antigena citratnim puferom (pH=6), kuvanjem u mikrotalasnoj tokom 20 minuta. Delovanje endogene peroksidaze blokirano je komercijalnim preparatom (*Large Volume Hydrogen Peroxide Block, TA – 060-HP, Thermo Scientific LabVision,*) u toku 10 minuta. Isečci su inkubirani sa primarnim antitelima u sledećim razblaženjima: anti-CD3 antitelo 1:500, anti-CD20 1:500, anti-CD68 1:500, anti-CD138 1:500, anti PC-1 1:500, anti-S100 1:500, anti-S100A4 1:500, anti- α SMA 1:500. Antitela su razblažena komercijalno dostupnim diluentom (*Large Volume UltraAb Diluent, TA-125-UD, Thermo Scientific LabVision,*). Nakon ispiranja u TBS-Tween puferu, isečci su inkubirani sa HRP-polimerom, toko 20 minuta. Imunohistohemijska reakcija razvijena je sistemom *UltraVision (TL-060-HL, Thermo Scientific LabVision,*) uz primenu hromogena DAB (3,3'-diaminobenzidin) u trajanju od 5 minuta. Isečci su zatim kontrastno bojani Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom 30 sekundi.

Za detekciju miofibroblasta primenjen je sledeći protokol: Nakon ispiranja TBS-om primenjen je 1% BSA (*bovine serum albumin*) kao proteinski blok. Vršena je

inkubacija primarnim biotiniziranim antitelima tokom 60 minuta u razblaženju 1:100. Za razvijanje reakcije korišćen je VECTASTATIN ABC-AP kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) i hromogen Permanent Red (Dako, Carpinteria, CA, USA) za vizualizaciju. Isečci su kontrastno bojeni Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom 30 sekundi. Negativne kontrole dobijene su izostavljanjem primarnog antitela.

Na isečcima obojenim antitelima za detekciju ćelija lamine proprije sluznice debelog creva određivani su distribucija i broj ćelija. Broj ćelija određivan je programu *Fiji*, na uveličanju x200 u celoj dostupnoj lamini propriji na isečku i na uveličanju x400, na 15 vidnih polja na svakom isečku (5 subepitelno, 5 između kripti i 5 uz laminu muskularis mukoze), i izražen kao broj ćelija na 0,1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva.

Određivana je zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva na uveličanjima x200 i x400 primenom softvera za analizu slike *Icy*. Na uveličanju x200 analizirana je lamina proprija sluznice debelog creva na celom preparatu. Na uveličanju x400 analizirano je po 15 vidnih polja na svakom isečku (5 subepitelno, 5 između kripti i 5 uz laminu muskularis mukoze). U svakom od vidnih polja označen je region od interesa koji je obuhvatao samo laminu propriju, a isključivao kripe. Za određivanje zastupljenosti miofibroblasta korišćen je *Color Picker Threshold plugin* u okviru programa *Icy* (131), na predhodno opisan način. Ukratko, *Color Picker Threshold plugin-om* za svaki isečak odabrali smo 10 “pozitivnih” i 10 “negativnih” boja. “Pozitivne” boje predstavljale su različite nijanse ružičaste, kojom su na datom isečku obojeni miofibroblasti, a “negativne” boje različite nijanse plave (kojom su obojena jedra) i bele. *Color Picker Threshold plugin*, zahvaljujući pravilnom odabiru boja, prepoznaje miofibroblaste i računa površinu koju oni zauzimaju u određenom delu lamine proprije. Zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva izražena je u procentima i definisana kao površina koju zauzimaju miofibroblasti u odnosu na površinu selektovane lamine proprije u kojoj je vršeno merenje.

3.10 Statistička obrada podataka

Deskripcija numeričkih obeležja urađena je klasičnim metodama opisne statistike (aritmetičkom sredinom ili medijanom, kao i odgovarajućim merama varijabiliteta

standardnom devijacijom ili interkvartalnim opsegom, od 25-75. percentila). Raspodela posmatranih varijanti analizirana je testovima slaganja po Kolmogorov-Smirnovu i Shapiro-Wilku i razmatranjem vrednosti skewness i kurtosis.

U analizi rezultata, u zavisnosti od prirode varijabli, primenjen je Studentov T-test za parametarske podatke i Mann-Whitney U test sume rangova za poređenje razlike između dve grupe neparametarskih podataka po jednom obeležju. Ako obrada podataka zahteva više od dva obeležja, korišćena je parametarska analiza varijansnog količnika (ANOVA) ili neparametarski Kruskal-Wallis test nakon kojeg sledi korišćenje Mann-Whitney U testa.

4. Rezultati

4.1 Morfometrijska analiza sluznice debelog creva

Na isečcima obojenim hematoksilinom i eozinom, sluznica debelog creva zdravih ispitanika ispoljava pravilnu organizaciju: Liberkinove kripte su dobro razvijene, prave tubularne na uzdužnim i ovalne na poprečnim preseccima; epitel se sastoji od peharastih ćelija i enterocita; vezivno tkivo lamine proprije je pravilno organizovano, sa veoma malo slobodnog prostora između komponenata ekstracelularnog matriksa; u lamini propriji se uočavaju mali krvni sudovi i kapilari (Slika 7A).

Na isečcima obojenim hematoksilinom i eozinom, primenom softvera *Analysis 3.1*, rađena je morfometrijska analiza svih elemenata sluznice debelog creva zdravih ispitanika i sluznice na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora.

Morfometrijska analiza nije pokazala postojanje statistički značajne razlike između zdravih muškaraca i žena ni u jednom posmatranom elementu sluznice debelog creva (Tabela 2).

Tabela 2. Morfometrijska analiza sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Elementi sluznice debelog creva	Zdravi muškarci	Zdrave žene
Visina sluznice (μm)	331.75 ± 63.10	308.39 ± 50.17
Visina površnog epitela (μm)	30.69 ± 8.20	30.75 ± 7.13
Dubina kripte (μm)	281.30 ± 77.02	273.50 ± 59.01
Visina epitela kripte (μm)	25.51 ± 6.70	24.54 ± 3.83
Prečnik kripte (μm)	71.87 ± 15.78	67.54 ± 9.72
Obim kripte (μm)	215.61 ± 44.12	205.10 ± 30.29
Gustina kripte (na 0.1 mm^2)	11.60 ± 3.10	13.28 ± 5.41
Broj ćelija u lamini propriji (na 0.1 mm^2)	1084.22 ± 303.92	1012.82 ± 248.97

Morfometrijska analiza nije pokazala postojanje statistički značajne razlike između sluznice različitih delova debelog creva (rektuma, sigmoideuma i ascendensa) zdravih ispitanika, ni u jednom posmatranom elementu (Tabela 3).

Tabela 3. Morfometrijska analiza različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendensa) zdravih ispitanika

Elementi sluznice debelog creva zdravih ispitanika	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Visina sluznice (μm)	318.14 \pm 60.42	334.23 \pm 58.06	310.14 \pm 54.46
Visina površnog epitela (μm)	32.8 \pm 8.12	30.66 \pm 6.12	29.65 \pm 8.33
Dubina kripti (μm)	265.44 \pm 59.75	308.86 \pm 56.14	268.97 \pm 73.44
Visina epitela kripti (μm)	25.03 \pm 4.85	25.03 \pm 6.74	25.10 \pm 4.18
Prečnik kripti (μm)	72.38 \pm 15.75	69.43 \pm 13.75	68.18 \pm 10.19
Obim kripti (μm)	215.61 \pm 35.28	222.30 \pm 51.83	202.27 \pm 32.98
Gustina kripti (na 0.1 mm ²)	13.41 \pm 4.3	13.04 \pm 3.92	9.75 \pm 4.45
Broj ćelija u lamini propriji (na 0.1 mm ²)	1086.18 \pm 313.55	942.93 \pm 166.39	1036.28 \pm 258.1

Na udaljenosti 10 cm od tumora Liberkinove kripte i epitel pokazuju naizgled urednu građu, dok vezivno tkivo lamine proprije sluznice debelog creva deluje nepravilno organizovano, a u lamini propriji se zapažaju slobodni prostori između komponenata ekstracelularnog matriksa i mali krvni sudovi i kapilari se češće uočavaju (Slika 7B). Slične promene, ali manje izražene, zapažaju se u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 20 cm od tumora.

Morfometrijskom analizom pokazano je da na udaljenosti 10 cm od tumora postoji statistički značajno smanjenje visine sluznice debelog creva ($p < 0.05$) u poređenju kako sa zdravim ispitanicima tako i sa visinom sluznice na udaljenosti 20 cm od tumora ($p < 0.05$) (Tabela 4).

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora postoji statistički značajno ($p < 0.01$) povećanje visine površnog epitela i epitela kripti u poređenju sa zdravim ispitanicima.

Takođe, na udaljenosti 10 cm od tumora postoji statistički značajno smanjenje broja ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva, kako u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0.01$) tako i u odnosu na sluznicu debelog creva na udaljenosti 20 cm od tumora ($p < 0.01$) (Tabela 4).

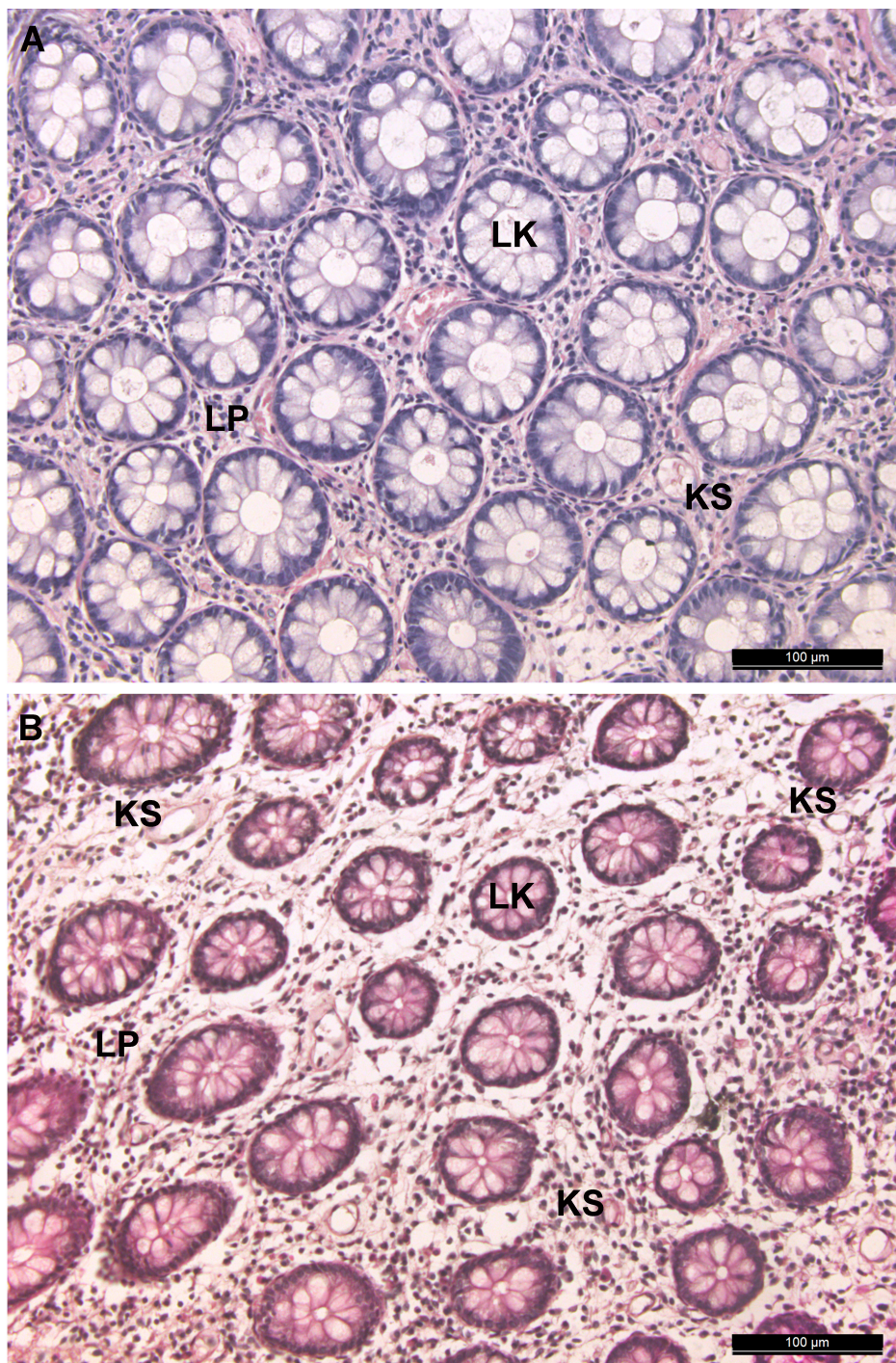
Tabela 4. Morfometrijska analiza sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Elementi sluznice debelog creva	Zdravi	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Visina sluznice (μm)	318.25 \pm 41.79	281.5 \pm 41.79 ⁺	327.13 \pm 53.93 ⁺⁺
Visina površnog epitela (μm)	30.27 \pm 7.17	37.36 \pm 6.38*	37.39 \pm 5.11**
Dubina kripti (μm)	274.56 \pm 66.16	272.68 \pm 45.28	293.86 \pm 50.27
Visina epitela kripti (μm)	25.05 \pm 5.53	28.62 \pm 4.91*	28.50 \pm 6.28**
Prečnik kripti (μm)	71.06 \pm 16.31	70.06 \pm 12.28	72.60 \pm 14.58
Obim kripti (μm)	216.34 \pm 35.37	227.26 \pm 28.62	224.92 \pm 27.27
Gustina kripti (na 0.1 mm ²)	12.18 \pm 4.31	13.68 \pm 4.42	14.02 \pm 5.54
Broj ćelija u lamini propriji (na 0.1 mm ²)	1048.83 \pm 279.16	871.15 \pm 186.21*	1032.78 \pm 176.92 [§]

⁺ Kontrole-10 cm od tumora, p<0.05; ⁺⁺ 10 cm od tumora-20 cm od tumora, p<0.05;

*Kontrole-10 cm od tumora, p<0.01; ** Kontrole-20 cm od tumora, p< 0.01; [§]

10 cm od tumora-20 cm od tumora, p<0.01



Slika 7. Poprečni presek sluznice debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). Lamina proprija sluznice debelog creva zdravih ispitanika je gusta i pravilno organizovana. Na udaljenosti 10 cm od tumora u lamini propriji sluznice debelog creva uočavaju se "prazni" prostori. U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora češće se uočavaju mali krvni sudovi i kapilari. LP - lamina proprija; LK - Liberkinova kripta; KS - krvni sud; Hematoksilin eozin, x200

4.2 Fraktalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva

Fraktalnom analizom mereni su fraktalna dimezija i lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva.

Fraktalna dimezija jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva

Ne postoji statistički značajna razlika u fraktalnoj dimenziji jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 5).

Tabela 5. Fraktalna dimenzija jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Fraktalna dimenzija jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva	1.67 ± 0.56	1.67 ± 0.64

Ne postoji statistički značajna razlika u fraktalnoj dimenziji jedara epitelnih ćelija sluznice zdravog rektuma, sigmoideuma i ascendensa (Tabela 6).

Tabela 6. Fraktalna dimenzija jedara epitelnih ćelija različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Fraktalna dimenzija jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva	1.67 ± 0.68	1.67 ± 0.62	1.67 ± 0.57

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, fraktalna dimezija jedara epitelnih ćelija je statistički značajno promenjena u odnosu na fraktalnu dimenziju jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva ispitanika bez tumora (Tabela 7).

Tabela 7. Fraktalna dimenzija jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Fraktalna dimenzija jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva	1.67 ± 0.59	$1.66 \pm 0.6^*$	$1.65 \pm 0.66^{**+}$

* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; ** Kontrole-20 cm od tumora, $p < 0.01$;

Analizirana su jedra epitelnih ćelija u 4 regiona sluznice debelog creva: jedra površnih epitelnih ćelija, jedra u vratu, telu i u dnu Liberkinovih kripti.

Razlika u fraktalnoj dimenziji jedara epitelnih ćelija udaljenih 10 cm i 20 cm od tumora i jedara epitelnih ćelija ispitanika bez tumora postoji u površnom epitelu, telu i dnu Liberkinovih kripti. Najizraženija razlika u fraktalnoj dimenziji je u predelu dna Liberkinovih kripti, gde se nalaze matične ćelije debelog creva (Tabela 8).

Tabela 8. Fraktalna dimenzija jedara epitelnih ćelija zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u različitim regionima sluznice debelog creva

Fraktalna dimenzija jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Površni epitel	1.69 ± 0.56	1.70 ± 0.63	1.68 ± 0.64 ^{+§}
Vrat Liberkinovih kripti	1.67 ± 0.63	1.67 ± 0.62	1.66 ± 0.61
Telo Liberkinovih kripti	1.66 ± 0.56	1.63 ± 0.59*	1.64 ± 0.70**
Dno Liberkinovih kripti	1.66 ± 0.59	1.64 ± 0.58*	1.63 ± 0.56**

*Kontrole - 10 cm od tumora, p<0.01; **Kontrole - 20 cm od tumora, p<0.01;

§Kontrole - 20 cm od tumora p<0.05; ⁺10 cm od tumora - 20 cm od tumora, p<0.01

Lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva

Ne postoji statistički značajna razlika u lakunarnosti jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 9).

Tabela 9. Lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva	0.43 ± 0.91	0.43 ± 0.10

Ne postoji statistički značajna razlika u lakunarnosti jedara epitelnih ćelija sluznice zdravog rektuma, sigmoideuma i ascendensa (Tabela 10).

Tabela 10. Lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice različitih delova debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva	0.43 ± 0.95	0.43 ± 0.10	0.43 ± 0.91

Na udaljenosti 10 cm od tumora, lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva je statistički značajno smanjena u odnosu na lakunarnost jedara epitelnih ćelija ispitanika bez tumora. Takođe, na udaljenosti 10 cm od tumora lakunarnost jedara epitelnih ćelija je statistički značajno smanjena u odnosu na jedra udaljena 20 cm od tumora (Tabela 11).

Tabela 11. Lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva	0.43 ± 0.95	0.41 ± 0.91*	0.43 ± 0.91 ⁺

*Kontrole - 10 cm od tumora, p<0.01; ⁺10 cm od tumora - 20 cm od tumora, p<0.01

Analizirano po regionima sluznice debelog creva, promene u lakunarnosti jedara epitelnih ćelija postoje u svim regionima (Tabela 12).

Tabela 12. Lakunarnost jedara epitelnih ćelija zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u različitim regionima sluznice debelog creva

Lakunarnost jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Površni epitel	0.42 ± 0.10	0.39 ± 0.95*	0.41 ± 0.87
Vrat Liberkinovih kripti	0.43 ± 0.96	0.41 ± 0.11 [§]	0.43 ± 0.10
Telo Liberkinovih kripti	0.42 ± 0.86	0.41 ± 0.81	0.45 ± 0.87 ^{**+}
Dno Liberkinovih kripti	0.44 ± 0.96	0.42 ± 0.79	0.46 ± 0.78 ⁺

*Kontrole- 10 cm od tumora, p<0.01; [§]Kontrole - 10 cm od tumora, p<0.05; ^{**}

Kontrole - 20 cm od tumora, p<0.01; ⁺10 cm od tumora- 20 cm od tumora, p<0.01

Teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva

Teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva sprovedena je u programu *ImageJ Plugin*.

Analizirani su angularni drugi momenat (*Angular second moment*), korelacija, inverzni moment razlike, entropija i varijansa.

Ne postoji statistički značajna razlika ni u jednom parametru teksturalne analize između jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva zdravih ispitanika muškog i ženskog pola (Tabela 13).

Tabela 13. Teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Parametri	Zdravi muškarci	Zdrave žene	p vrednost (zdravi muškarci vs. zdrave žene)
Angularni drugi momenat	0.121±0.084	0.125±0.087	p=0.318
Korelacija	0.000198±0.000079	0.000198±0.000067	p=0.993
Inverzni moment razlike	0.578±0.074	0.575±0.073	p=0.381
Entropija	4.541±0.620	4.543±0.662	p=0.912
Varijansa	5505.139±1857.836	5370.047±1669.859	p=0.121

Ne postoji statistički značajna razlika ni u jednom parametru teksturalne analize između epitelnih ćelija različitih delova sluznice debelog creva (rektuma, sigmoideuma i ascendensa) zdravih ispitanika (Tabela 14).

Tabela 14. Teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija različnih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum i ascendens) zdravih ispitanika

Parametri	Rektum	Sigmoideum	Ascendens	p vrednost (rektum vs. sigmoideum vs. ascendens)
Angularni drugi momenat	0.122±0.084	0.121±0.087	0.123±0.083	p=0.763
Korelacija	0.00020± 0.000071	0.00019± 0.000066	0.00020± 0.000086	p=0.178
Inverzni moment razlike	0.577±0.073	0.579±0.075	0.575±0.072	p=0.237
Entropija	4.588±0.612	4.544±0.661	4.607±0.618	p=0.400
Varijansa	5456.180± 1734.657	5498.596± 1912.194	5418.910± 1686.424	p=0.348

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa zdravim ispitanicima postoji promena u svim parametrima teksturalne analize jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva (Tabela 15).

Tabela 15. Teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora debelog creva

Parametri	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Angularni drugi momenat	0.122±0.085	0.136±0.103*	0.140±0.102**
Korelacija	0.000198±0.000075	0.000167±0.000055 *	0.000164±0.000376 **
Inverzni moment razlike	0.577±0.074	0.606±0.078*	0.609±0.077**
Entropija	4.579±0.638	4.427±0.705*	4.269±0.707*** ⁺
Varijansa	5454.301±1790.141	6327.521±1805.491 *	6565.321±1311.836 *** ⁺

*Kontrole- 10 cm od tumora, p<0.01; §Kontrole - 10 cm od tumora, p<0.05; **

Kontrole - 20 cm od tumora, p<0.01; ⁺10 cm od tumora- 20 cm od tumora, p<0.01

4.3 Identifikacija sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama sluznice debelog creva

Na isečcima debelog creva bojenim HID/AB uočavaju se razlike u zastupljenosti sulfomucina i sijalomucina, kako između različitih delova debelog creva, tako i između istih delova debelog creva različitih ispitanika.

Generalno, u ascendentnom kolonu najveći broj peharastih ćelija je sulfomucin-pozitivan (HID-pozitivan). Retke, sijalomucin (*alcian blue*-pozitivne ćelije) uočavaju se u površnom epitelu i u gornjim delovima Liberkinovih kripti. U sigmoidnom kolonu, takođe je najveći broj peharastih ćelija sulfomucin-pozitivan. U površnom epitelu i gornjim delovima Liberkinovih kripti, nešto češće nego u ascendentnom kolonu, ali uz velike interindividualne varijacije, uočavaju se sijalomucin-pozitivne peharaste ćelije. U rektumu, dominira sulfomucin ali se povećava broj sijalomucin pozitivnih ćelija u površnom epitelu i gornjim delovima Liberkinovih kripti (Slika 8).

Nije detektovana razlika u procentualnoj zastupljenosti sulfomucin i sijalomucin-pozitivnih ćelija između zdravih muškaraca i žena (Tabela 16).

Tabela 16. Procenat sulfomucin i sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

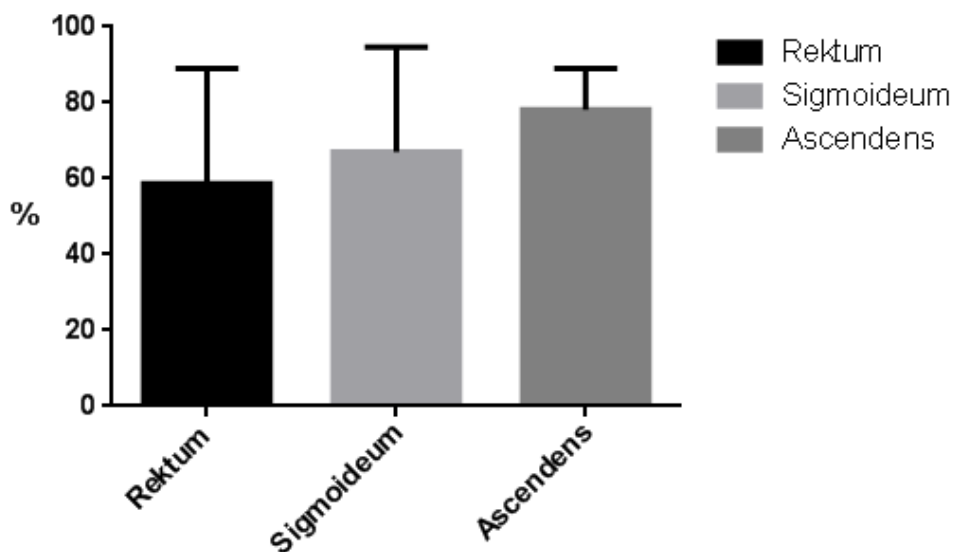
	Zdravi muškarci	Zdrave žene
% sulfomucin-pozitivnih ćelija u epitelu	70.78 ± 12.95	65.56 ± 19.21
% sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu	29.02 ± 13.46	30.44 ± 14.14

Iako postoji porast sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu sluznice debelog creva, od ascendensa ka rektumu, razlika nije bila statistički značajna (Tabela 17, Grafikon 1-2).

Tabela 17. Procenat sulfomucin i sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

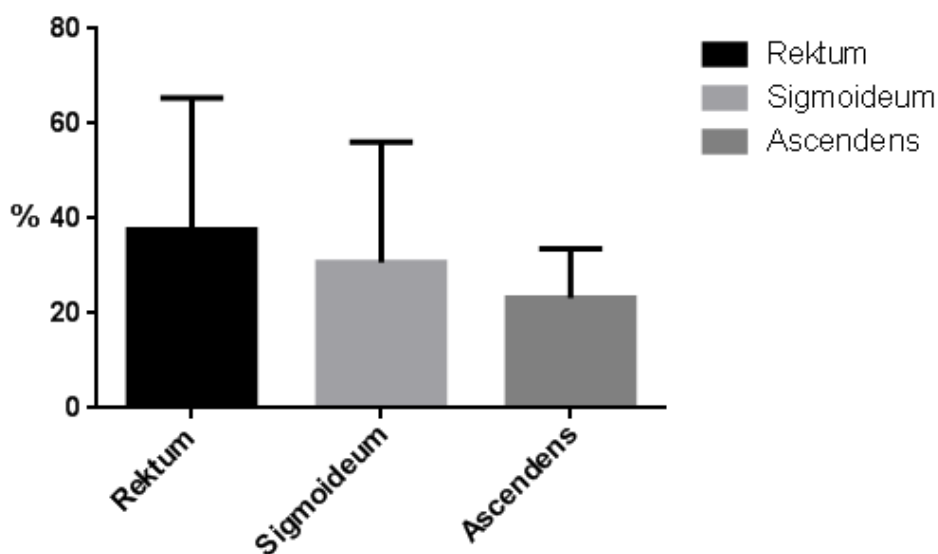
	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
% sulfomucin-pozitivnih ćelija u epitelu	58.72 ± 30.34	67.04 ± 27.59	78.13 ± 10.90
% sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu	37.64 ± 27.8	30.79 ± 25.4	23.24 ± 10.37

Procenat sulfomucin-pozitivnih ćelija u epitelu sluznice debelog creva

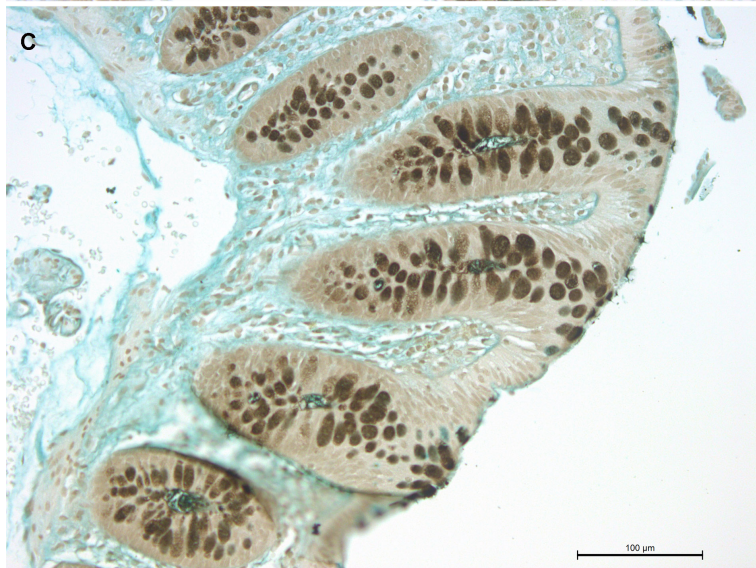
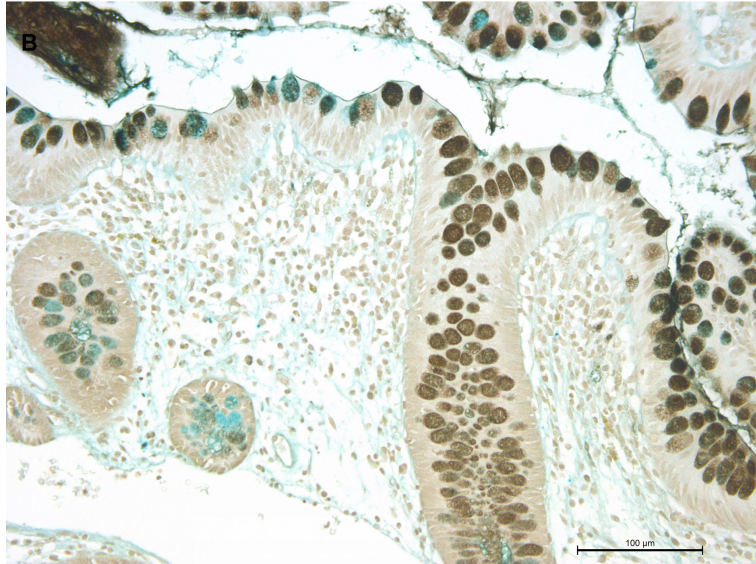
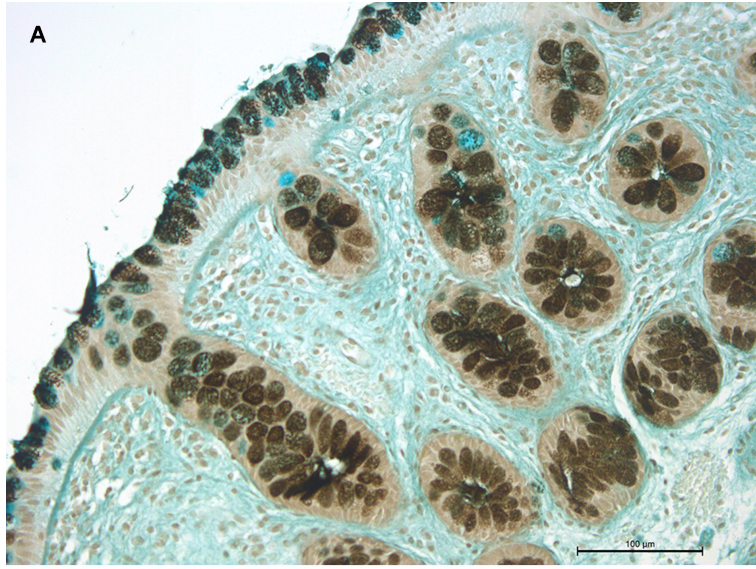


Grafikon 1. Procenat sulfomucin-pozitivnih ćelija u epitelu različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoidium, ascendens) zdravih ispitanika

Procenat sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu sluznice debelog creva



Grafikon 2. Procenat sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoidium, ascendens) zdravih ispitanika



Slika 8. Histoemijsko bojenje HID/AB. Sluznica debelog creva zdravog ispitanika: rektum (A), sigmoideum (B) i ascendens (C). U svim delovima sluznice zdravog debelog creva dominira sulfomucin (braon obojene ćelije). Od ascendensa ka rektumu uočava se porast sijalomucin-pozitivnih ćelija (plavo obojene ćelije); x200

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, uočava se veći broj sijalomucin pozitivnih ćelija, pre svega u površnom epitelu i gornjim delovima Liberkinovih kripti (Slika 9). Duž pojedinih kripti, sijalomucin dominira u odnosu na sulfomucin.

Na udaljenosti 10 cm od tumora, postoji statistički značajno smanjenje procenta sulfomucin pozitivnih ćelija duž Liberkinovih kripti, u poređenju sa zdravom sluznicom (Tabela 18, Grafikon 3).

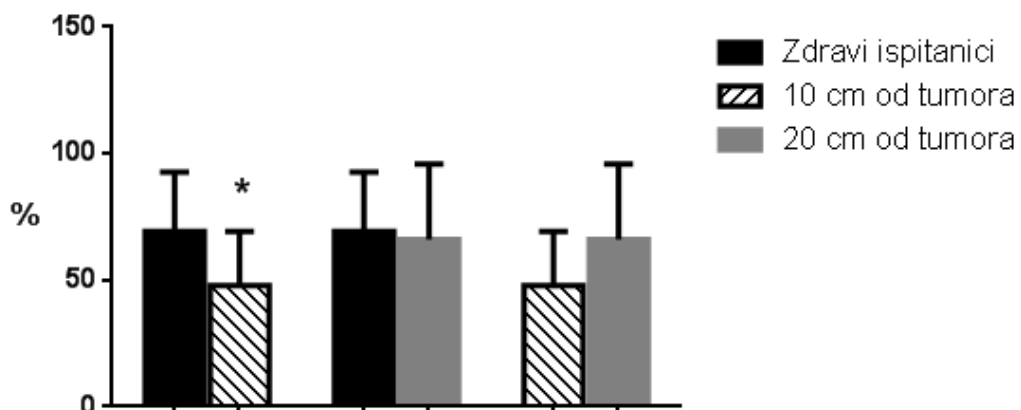
Na udaljenosti 10 cm od tumora, postoji statistički značajno povećanje procenta sijalomucin-pozitivnih ćelija duž Liberkinovih kripti, u poređenju sa zdravom sluznicom (Tabela 18, Grafikon 4). Povećanje procenta sijalomucin-pozitivnih ćelija postoji i na udaljenosti 20 cm od tumora, ali bez statistički značajne razlike.

Tabela 18. Procentat sulfomucin i sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
% sulfomucin-pozitivnih ćelija u epitelu	69.24 ± 23.43	47.93 ± 21.27*	66.05 ± 29.93
% sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu	28.84 ± 21.18	41.86 ± 23.49*	33.95 ± 29.93

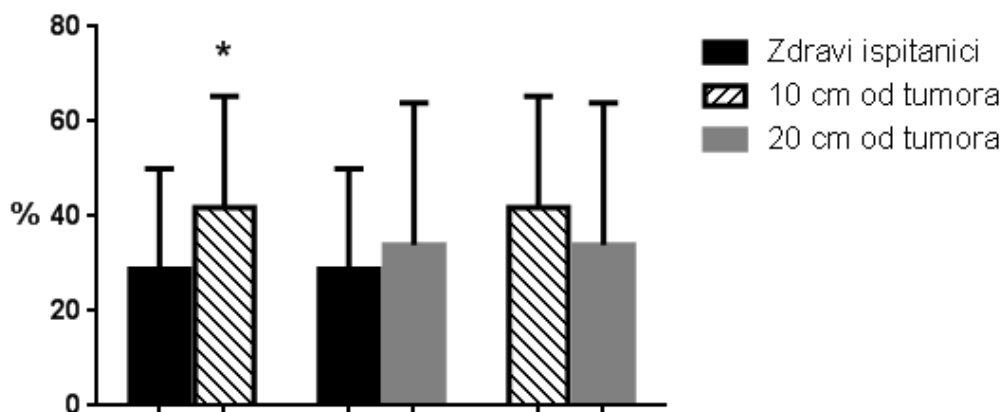
Kontrole- 10 cm od tumora, p<0.01;

Procenat sulfomucin-pozitivnih ćelija u epitelu sluznice debelog creva

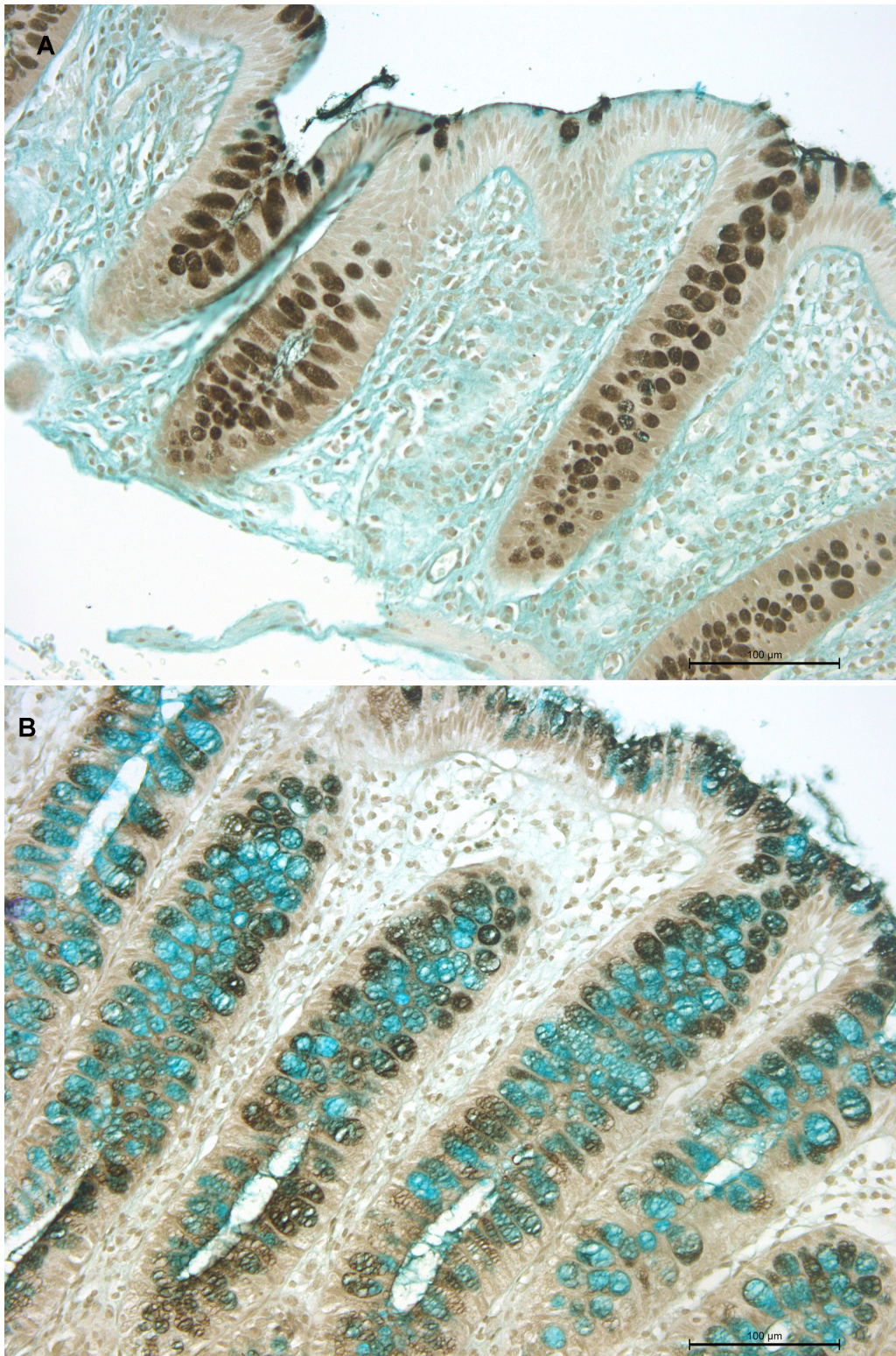


Grafikon 3. Procenat sulfomucin-pozitivnih ćelija u epitelu sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Procenat sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu sluznice debelog creva



Grafikon 4. Procenat sijalomucin-pozitivnih ćelija u epitelu sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora



Slika 9. Histochemijsko bojenje HID/AB. U sluznici sigmoidnog kolona zdravog ispitanika dominira sulfomucin (A). U sluznici sigmoidnog kolona, udaljenoj 10 cm od tumora (B) predominantno je zastupljen sijalomucin (plavo), pre svega u višim delovima Liberkinovih kripti; x200

4.4 Detektovanje proliferacije epitelnih ćelija sluznice debelog creva

Za detektovanje proliferacije epitelnih ćelija sluznice debelog creva korišćeno je anti-Ki67 antitelo.

U programu *Fiji*, na uveličanju x200, na svakoj kriпти koja je celom dužinom prisutna na uzdužnim presećima sluznice debelog creva, određivan je broj proliferišućih epitelnih ćelija duž celih Liberkinovih kriпти (Ki67 indeks) i po regionima (u donjoj, srednjoj i gornjoj trećini Liberkinovih kriпти) i izražen kao procenat proliferišućih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija u kriпти/tom delu kripte.

Ki67 je nuklearni faktor, eksprimiran u ćelijama koje proliferišu. Najveći broj proliferišućih ćelija u debelom crevu nalazi se u samom dnu Liberkinovih kriпти (Slika 10A).

Najpre je meren ukupan broj Ki67-pozitivnih ćelija duž celih Liberkinovih kriпти i određivan tzv. Ki67 indeks. Ki67 indeks predstavlja procenat Ki67-pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija duž cele Liberkinove kripte (127).

Nema razlike u Ki67 indeksu u epitelu sluznice debelog creva između zdravih muškaraca i žena (Tabela 19).

Tabela 19. Ki67 indeks u epitelu sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

	Muškarci	Žene
Procenat Ki67 pozitivnih ćelija duž cele Liberkinove kripte (%)	39.76 ± 11.56	36.95 ± 12.10

Nema razlike u Ki67 indeksu između različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika (Tabela 20).

Tabela 20. Ki67 indeks u epitelu različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Procenat Ki67 pozitivnih ćelija duž cele Liberkinove kripte (%)	37.38 ± 13.05	40.28 ± 6.74	37.92 ± 13.67

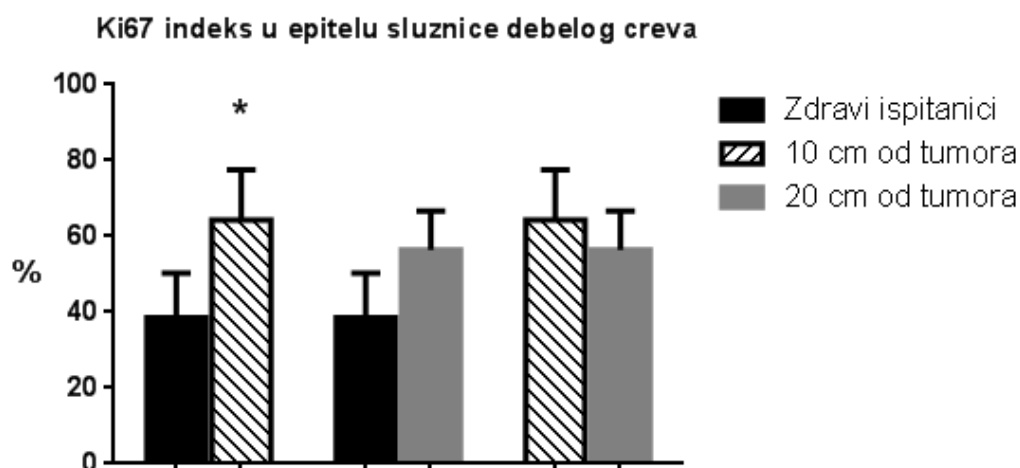
Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora uočava se veći broj Ki67-pozitivnih ćelija, pre svega u višim delovima Liberkinovih kripte (Slika 10B).

Ki67 indeks je statistički značajno veći na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima. Nema razlike u Ki67 indeksu između sluznice udaljene 10 cm i 20 cm od tumora (Tabela 21, Grafikon 5).

Tabela 21. Ki67 indeks u epitelu sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Procenat Ki67 pozitivnih ćelija duž cele Liberkinove kripte (%)	38.57 ± 11.70	64.26 ± 13.29*	56.44 ± 10.26**

*Kontrole - 10 cm od tumora, $p < 0.01$; **Kontrole - 20 cm od tumora, $p < 0.01$;



Grafikon 5. Ki67 indeks u epitelu sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora; * $p < 0.01$

Zatim je analiziran procenat Ki67-pozitivnih ćelija u 3 regiona Liberkinovih kripti (u donjoj, srednjoj i gornjoj trećini).

Nema razlike u procentu Ki67-pozitivnih ćelija u različitim delovima Liberkinovih kripti zdravih muškaraca i žena (Tabela 22).

Tabela 22. Procenat Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u različitim delovima Liberkinovih kripti sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Procenat Ki67 pozitivnih ćelija (%)	Muškarci	Žene
Donja trećina Liberkinovih kripti	74.92 ± 14.56	75.21 ± 11.04
Srednja trećina Liberkinovih kripti	47.42 ± 24.47	52.75 ± 18.36
Gornja trećina Liberkinovih kripti	8.82 ± 6.96	10.65 ± 8.30

Nema razlike u procentu Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u različitim delovima Liberkinovih kriпти rektuma, sigmoideuma i ascendensa zdravih ispitanika (Tabela 23).

Tabela 23. Procenat Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u različitim delovima Liberkinovih kriпти različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

Procenat Ki67 pozitivnih ćelija (%)	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Donja trećina Liberkinovih kriпти	74.34 ± 14.35	76.87 ± 9.31	77.13 ± 12.57
Srednja trećina Liberkinovih kriпти	45.16 ± 23.46	48.09 ± 23.84	48.33 ± 14.04
Gornja trećina Liberkinovih kriпти	9.74 ± 7.11	9.67 ± 5.99	8.52 ± 6.47

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovan je statistički značajno veći broj Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u srednjim delovima Liberkinovih kriпти, u poređenju sa ispitanicima bez tumora. Takođe, na udaljenosti 10 cm od tumora, detektovan je statistički značajno veći broj Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u gornjim delovima Liberkinovih kriпти, kako u odnosu na udaljenost 20 cm od tumora, tako i u odnosu na ispitanike bez tumora (Tabela 24, Grafikon 6-8).

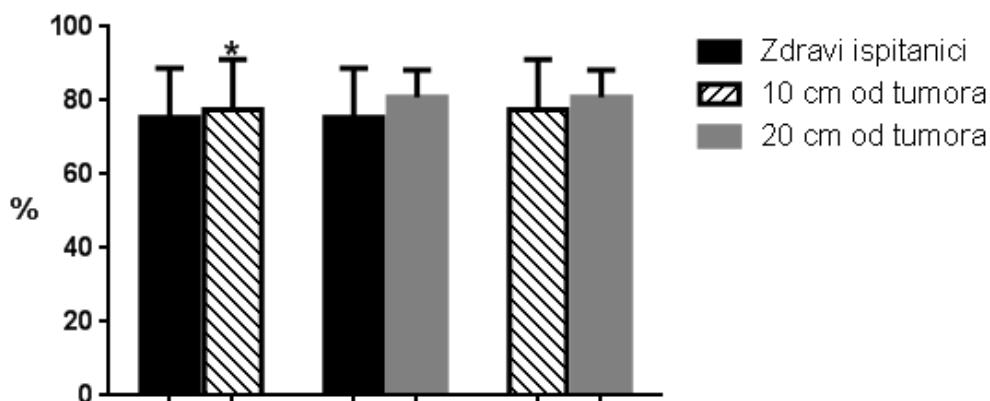
Tabela 24. Procenat Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u različitim delovima Liberkinovih kriпти sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Procenat Ki67 pozitivnih ćelija (%)	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Donja trećina Liberkinovih kriпти	75.36 ± 13.43	77.51 ± 13.72	80.99 ± 7.30
Srednja trećina Liberkinovih kriпти	48.10 ± 23.00	57.60 ± 16.89**	60.99 ± 15.74 [§]
Gornja trećina Liberkinovih kriпти	9.76 ± 8.61	18.71 ± 11.93*	12.38 ± 11.30 ⁺

*Kontrole - 10 cm od tumora, $p < 0.01$; **Kontrole - 10 cm od tumora, $p < 0.05$;

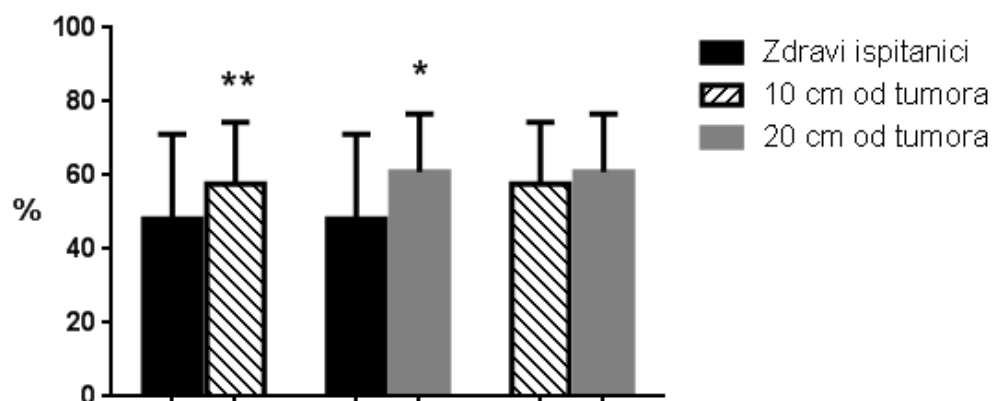
[§]Kontrole- 20 cm od tumora, $p < 0.01$; ⁺10 cm od tumora - 20 cm od tumora, $p < 0.05$

Procenat Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u donjoj trećini Liberkinovih kriпти



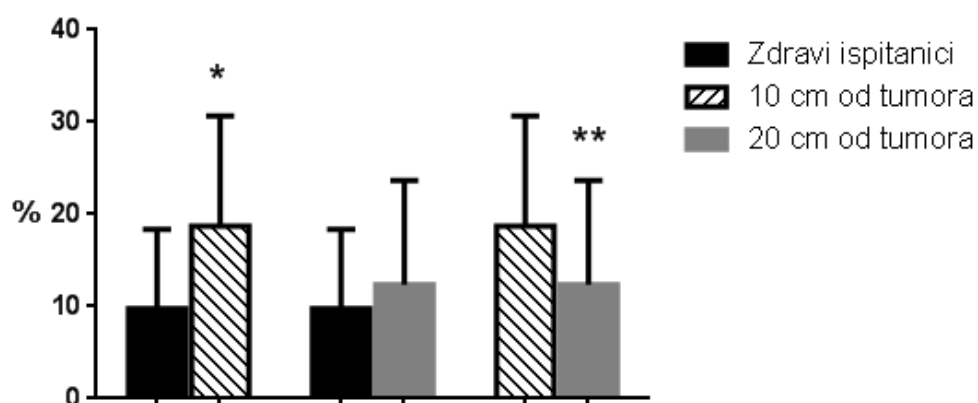
Grafikon 6. Procenat Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u donjoj trećini Liberkinovih kriпти sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Procenat Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u srednjoj trecini Liberkinovih kripti

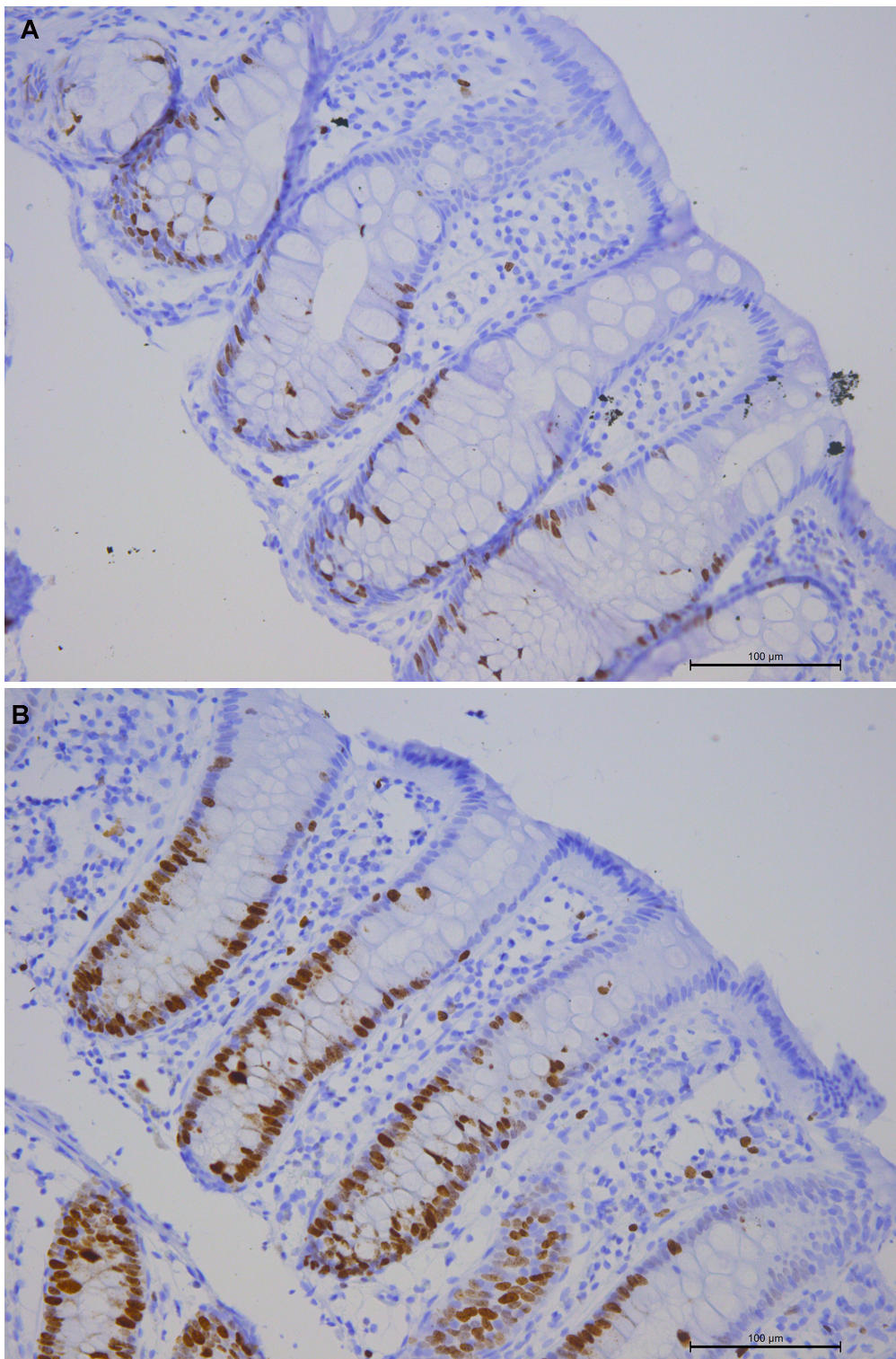


Grafikon 7. Procenat Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u srednjoj trećini Liberkinovih kripti sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora; * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$

Procenat Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u gornjoj trecini Liberkinovih kripti



Grafikon 8. Procenat Ki67-pozitivnih epitelnih ćelija u gornjoj trećini Liberkinovih kripti sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora; * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$



Slika 10. Imunohistohemijsko bojenje antitelima na Ki67. Lamina proprija sluznice debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). Na udaljenosti 10 cm od tumora uočava se veći broj Ki67-pozitivnih ćelija duž Liberkinovih kripti. Osim u samom dnu, u zoni matičnih ćelija, Ki67-pozitivne ćelije se uočavaju i u višim delovima Liberkinovih kripti. x200

4.5 Detektovanje krvnih i limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva

Za detektovanje svih krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva korišćeno je anti-CD34 antitelo (DAKO, Sjedinjene Američke Države).

U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika uočavaju se brojni CD34-pozitivni krvni sudovi (Slika 11A).

Ne postoji statistički značajna razlika u broju CD34-pozitivnih krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 25).

Tabela 25. Broj CD34-pozitivnih krvnih sudova na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Broj CD34-pozitivnih krvnih sudova	37.33 ± 9.56	35.29 ± 6.52

Ne postoji statistički značajna razlika u broju CD34-pozitivnih krvnih sudova u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektuma, sigmoideuma i ascendensa) zdravih ispitanika (Tabela 26).

Tabela 26. Broj CD34-pozitivnih krvnih sudova na 0.1 mm² lamine proprije različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Broj CD34-pozitivnih krvnih sudova	38.27 ± 7.06	35.85 ± 7.11	36.72 ± 7.04

U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm (Slika 11B) i 20 cm od tumora, uočavaju se brojni CD34-pozitivni mali krvni sudovi i kapilari.

Broj CD34-pozitivnih krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm (65.15 ± 18.94 , $p < 0.01$) i 20 cm od tumora (45.77 ± 16.48 , $p < 0.01$) je statistički značajno veći u poređenju sa zdravim ispitanicima (36.57 ± 7.59) (Slika B). Takođe, broj CD34-pozitivnih krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora je statistički značajno veći u odnosu na laminu propriju na udaljenosti 20 cm od tumora ($p < 0.01$) (Tabela 27, Grafikon 9).

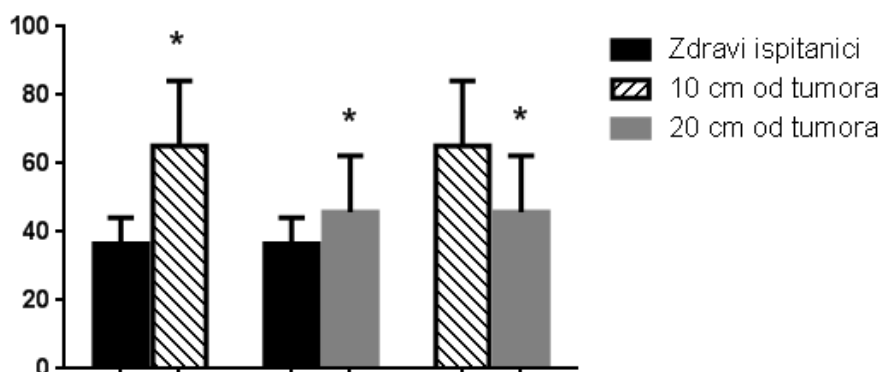
Tabela 27. Broj CD34-pozitivnih krvnih sudova na 0.1 mm^2 lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Broj CD34-pozitivnih krvnih sudova	36.57 ± 7.59	$65.15 \pm 18.94^*$	$45.77 \pm 16.48^{**+}$

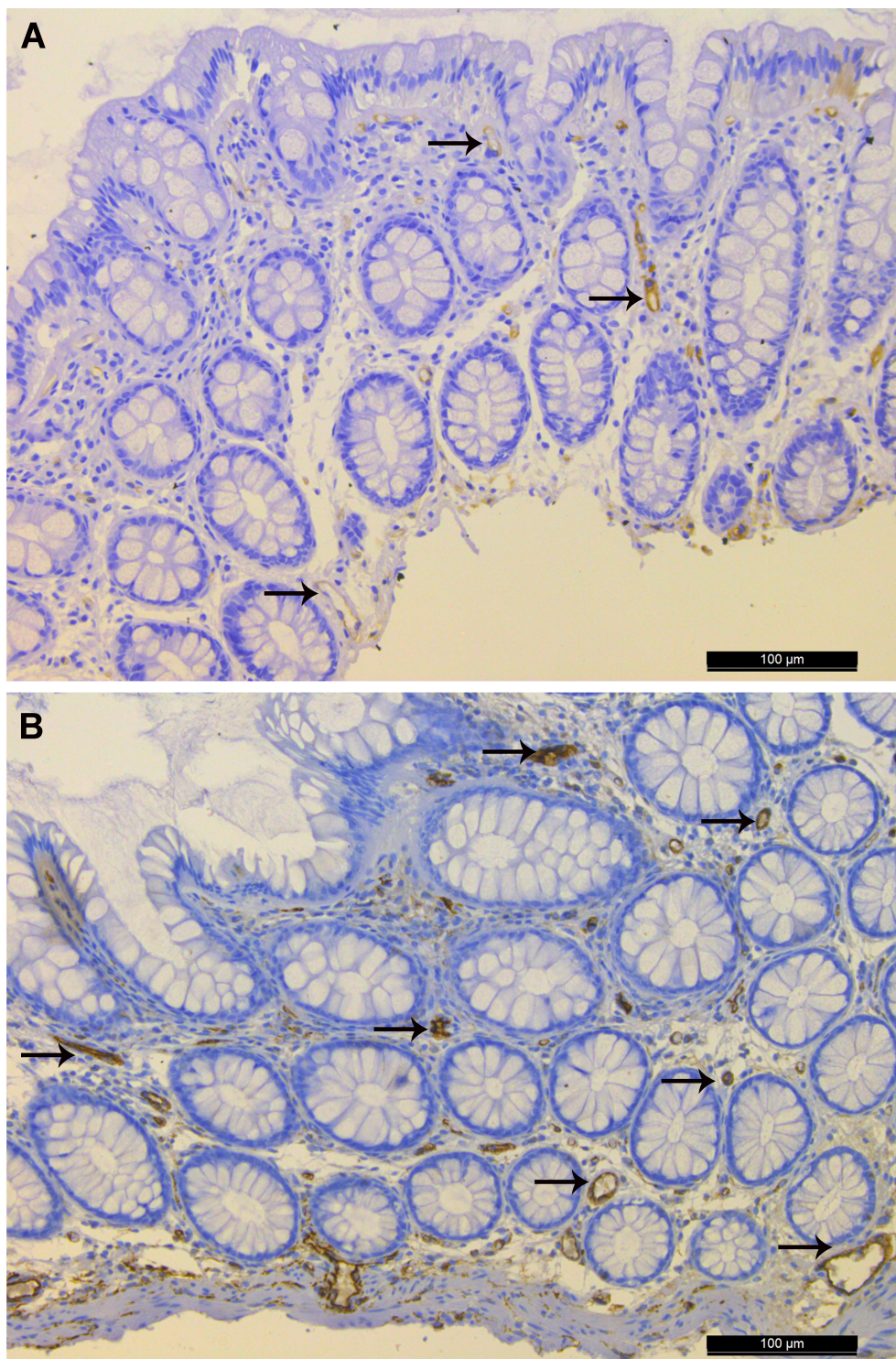
* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; ** Kontrole-20 cm od tumora, $p < 0.01$;

+ 10 cm od tumora-20 cm od tumora, $p < 0.01$

Broj CD34-pozitivnih krvnih sudova na 0.1 mm^2 lamine proprije sluznice debelog creva



Grafikon 9. Broj CD34-pozitivnih krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora; * $p < 0.01$



Slika 11. Imunohistohemijsko bojenje antitelima na CD34. Lamina proprija sluznice debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). Na udaljenosti 10 cm od tumora uočava se veći broj krvnih sudova. Strelicama je obeležen deo krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva. x200

Za detektovanje novih krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva korišćeno je anti-CD105 antitelo (ThermoScientific, Sjedinjene Američke Države).

U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika krvni sudovi su minimalno pozitivni ili sasvim negativni na CD105. Retki CD105-pozitivni krvni sudovi najčešće se uočavaju neposredno ispod bazalne membrane ili u predelu dna Liberkinov kripti, uz laminu muskularis mukoze (Slika 12A).

Ne postoji statistički značajna razlika u broju CD105-pozitivnih krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 28).

Tabela 28. Broj CD105-pozitivnih krvnih sudova na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Broj CD105-pozitivnih krvnih sudova	5.31 ± 2.49	6.07 ± 2.43

Ne postoji statistički značajna razlika u broju CD105-pozitivnih krvnih sudova u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektuma, sigmoideuma i ascendensa) zdravih ispitanika (Tabela 29).

Tabela 29. Broj CD105-pozitivnih krvnih sudova na 0.1 mm² lamine proprije različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Broj CD105-pozitivnih krvnih sudova	6.18 ± 2.95	4.87 ± 1.07	5.82 ± 2.36

U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, CD105-pozitivni krvni sudovi se jasno uočavaju, pre svega subepitelno ili neposredno iznad lamine muskularis mukoze (Slika 12B).

Broj CD105-pozitivnih krvnih sudova je statistički značajno povećan u lamini propriji sluznice debelog creva udaljenoj 10 cm (14.93 ± 5.65 , $p < 0.01$) i 20 cm (9.53 ± 4.97 , $p < 0.01$) od tumora, u poređenju sa laminom proprijom zdravih ispitanika (5.8 ± 2.52). Takođe, broj CD105-pozitivnih krvnih sudova je statistički značajno povećan u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom na udaljenosti 20 cm od tumora ($p < 0.01$) (Tabela 30, Grafikon 10).

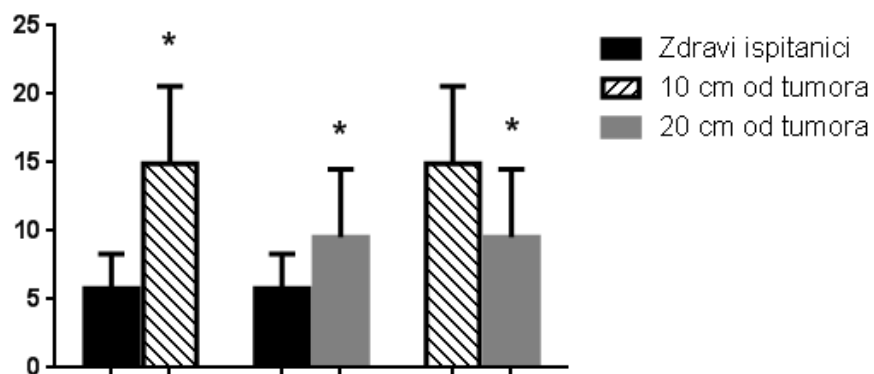
Tabela 30. Broj CD105-pozitivnih krvnih sudova na 0.1 mm^2 lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Broj CD105-pozitivnih krvnih sudova	5.80 ± 2.52	$14.93 \pm 5.65^*$	$9.53 \pm 4.97^{**+}$

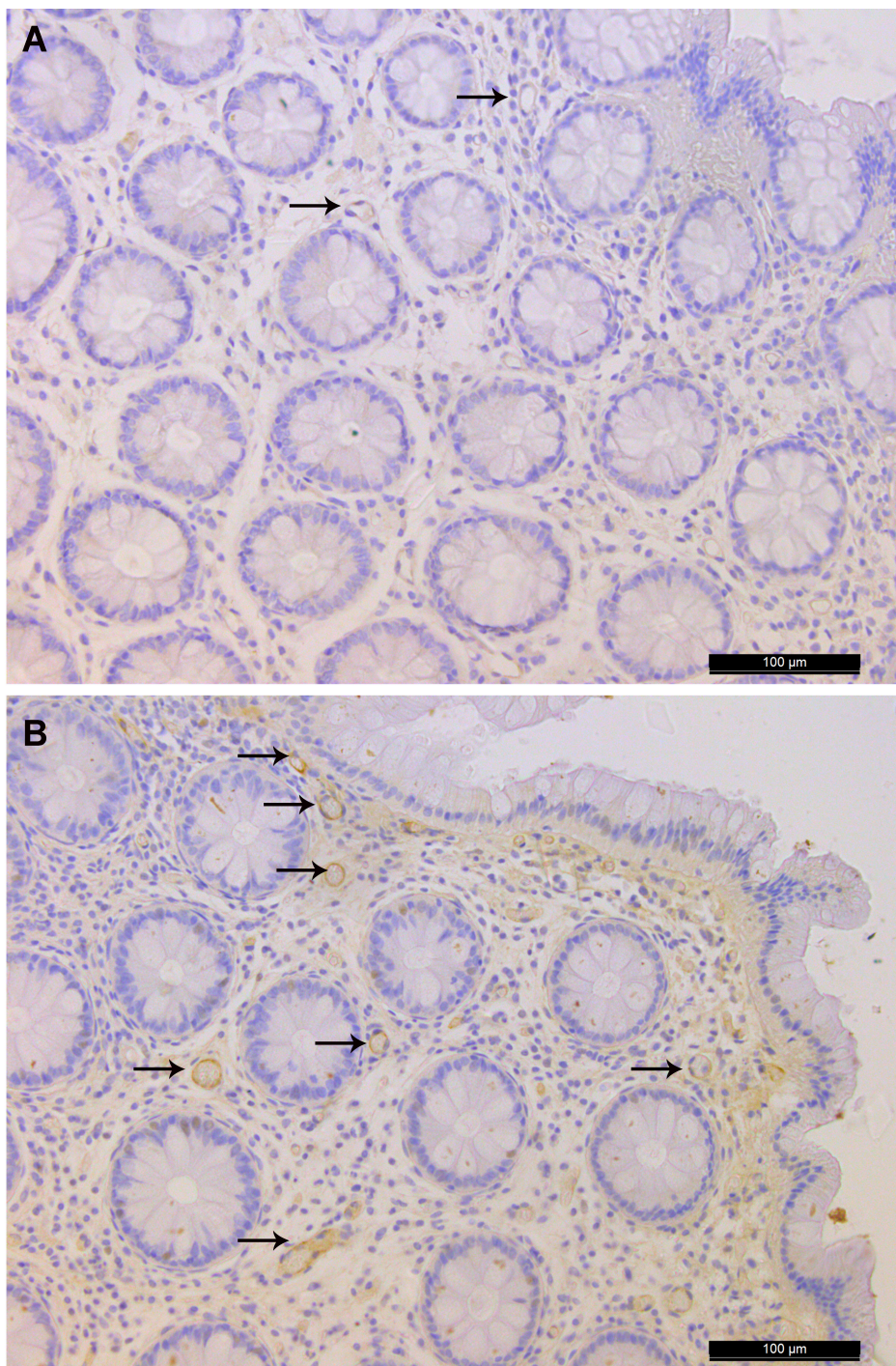
* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; ** Kontrole-20 cm od tumora, $p < 0.01$;

+ 10 cm od tumora-20 cm od tumora, $p < 0.01$

Broj CD105-pozitivnih krvnih sudova na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva



Grafikon 10. Broj CD105-pozitivnih krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora; *p<0.01

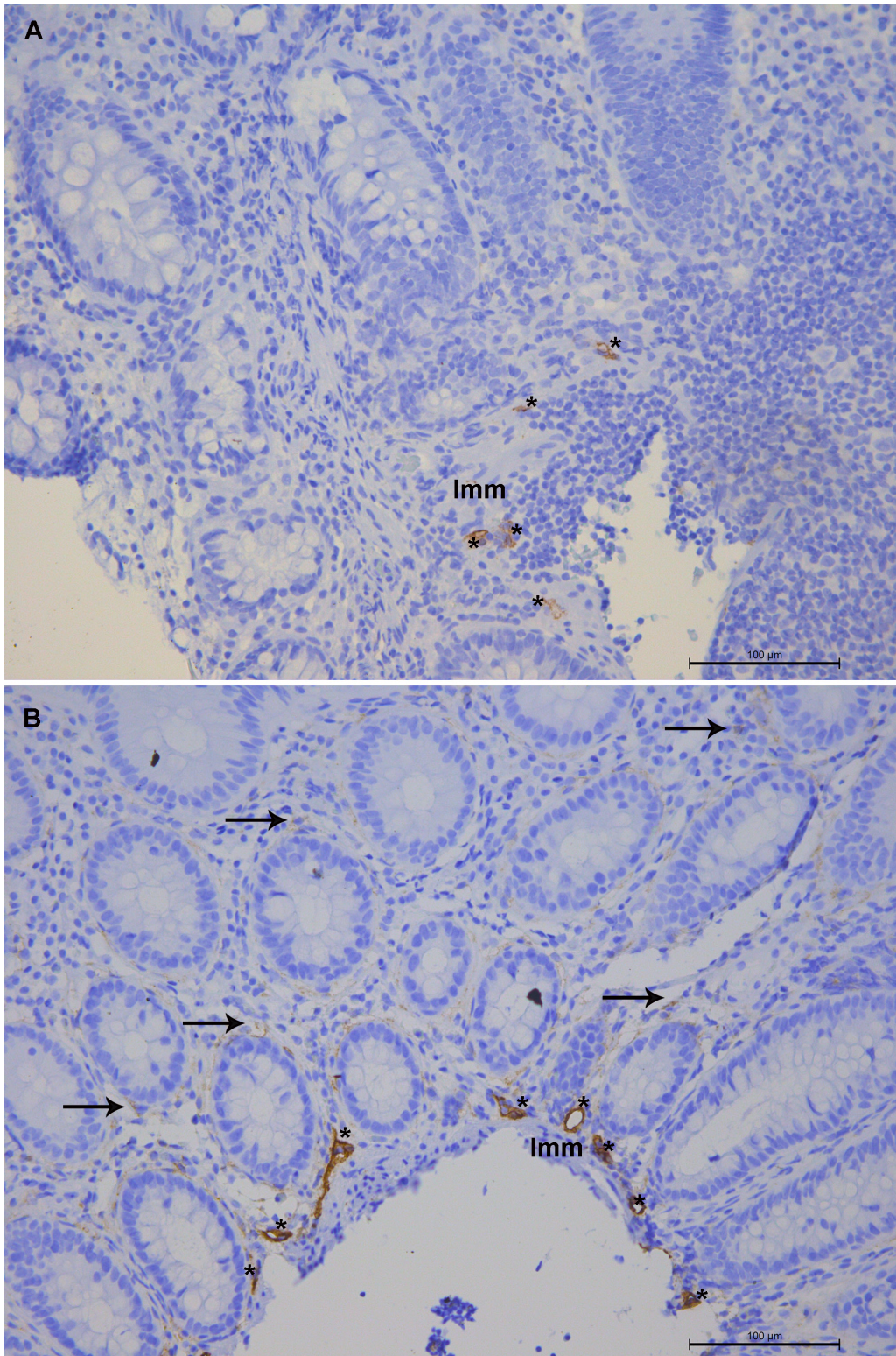


Slika 12. Imunohistohemijsko bojenje antitelima na CD105. Lamina proprija sluznice debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika uočavaju se retki, slabo CD105-pozitivni krvni sudovi. Na udaljenosti 10 cm od tumora uočava se veći broj CD105-pozitivnih krvnih sudova. Strelicama je obeležen deo krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva. x200

Za detekciju limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva korišćeno je anti-podoplanin antitelo (klon D2-40, DAKO, Sjedinjene Američke Države).

U lamini propriji sluznice debelog creva ni jednog zdravog ispitanika ne uočavaju se limfni sudovi. Kod zdravih ispitanika, limfni sudovi se jasno uočavaju u submukozi, neposredno uz laminu muskularis mukoze, u samoj lamini muskularis mukoze ili retko, u lamini propriji neposredno uz laminu muskularis mukoze. Sa druge strane, u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, uočavaju se prošireni limfni sudovi, pre svega neposredno iznad lamine muskularis mukoze. Takođe, uočavaju se D2-40 pozitivne ćelije i u višim delovima lamine proprije sluznice debelog creva (Slika 13).

Zbog odsustva limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika i veoma malog broja u lamini propriji na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, nije rađena kvantifikacija u programu Fiji.



Slika 13. Imunohistohemijsko bojenje antitelima na podoplanin (D2-40 klon). Lamina propria sluznice debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). Limfni sudovi (obeleženi *) se uočavaju u lamini muscularis mukoze (Imm) i

neposredno iznad nje, kako kod zdravih ispitanika tako i na udaljenosti 10 cm od tumora. Na udaljenosti 10 cm od tumora, limfni sudovi su prisutni u većem broju iznad lamine muscularis mukoze; u lamini propriji sluznice debelog creva se uočavaju podoplanin pozitivne ćelije (strelica). x200

4.6 Zastupljenost i organizacija kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva

Za vizualizaciju kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva korišćeno je *Masson trichrome* bojenje.

U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika kolagena vlakna su debela, organizovana u vidu pravilnih snopova oko kripti i kroz laminu propriju. Prostori između kolagenih vlakana su mali (Slika 14A).

Zastupljenost kolagenih vlakana (%) u lamini propriji sluznice debelog creva merena je primenom softvera *Icy* (131).

Nema razlike u procentualnoj zastupljenosti kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 31).

Tabela 31. Procentualna zastupljenost kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Zastupljenost kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	47.2 ± 8.49	48.1 ± 9.81

Nema razlike u zastupljenosti kolagenih vlakana u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih osoba (Tabela 32).

Tabela 32. Procentualna zastupljenost kolagenih vlakana u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Zastupljenost kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	50.87 ± 9.02	46.79 ± 8.02	47.69 ± 8.09

U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora kolagena vlakna su dezorganizovana i istanjena. Zapažaju se veliki "prazni" prostori između kolagenih vlakana u lamini proriji. Na udaljenosti 20 cm od tumora, kolagena vlakna su izmenjena na isti način, ali u manjoj meri (Slika 14B-C).

Morfometrijskom analizom pokazano je da je zastupljenost kolagenih vlakana statistički značajno smanjena na udaljenosti 10 cm (26.43 ± 6.22 , $p < 0.01$) i 20 cm (35.15 ± 8.34 , $p < 0.01$) od tumora, u poređenju sa laminim proprijom zdravih ispitanika (48.05 ± 8.92) (Tabela 33). Takođe, zastupljenost kolagenih vlakana je statistički značajno smanjena 10 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva na udaljenosti 20 cm od tumora ($p < 0.01$) (Tabela 33, Grafikon 11).

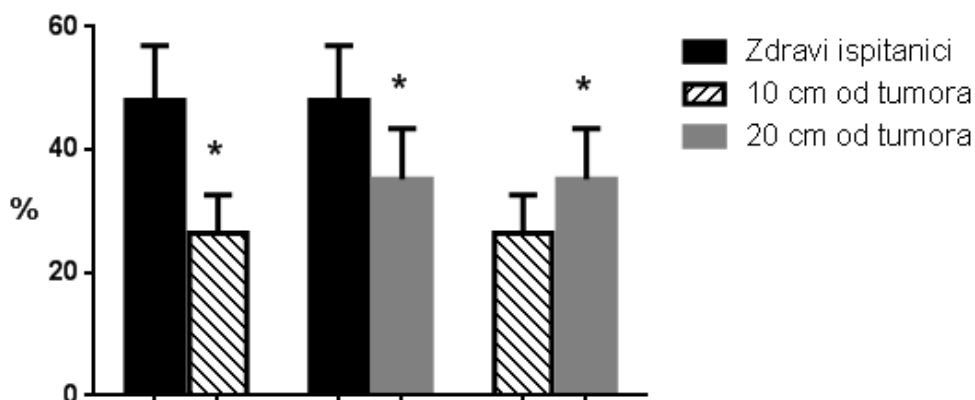
Tabela 33. Procentualna zastupljenost kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Zastupljenost kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	48.05 ± 8.92	26.43 ± 6.22*	35.15 ± 8.34**+

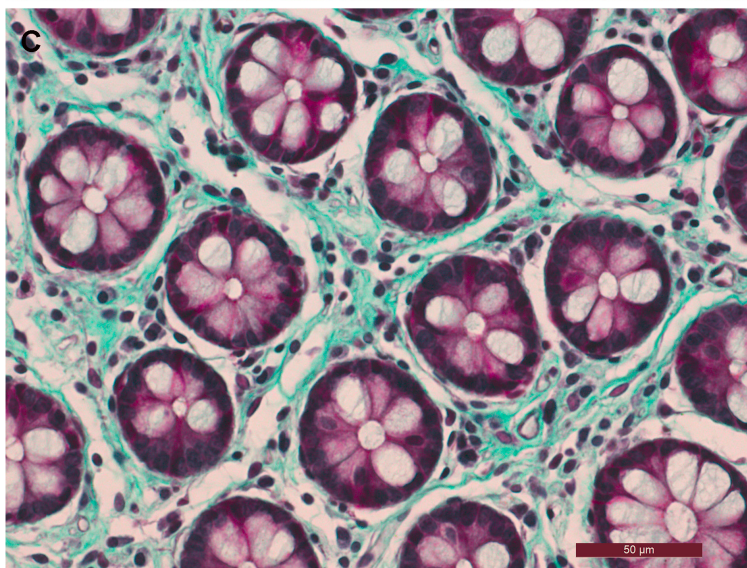
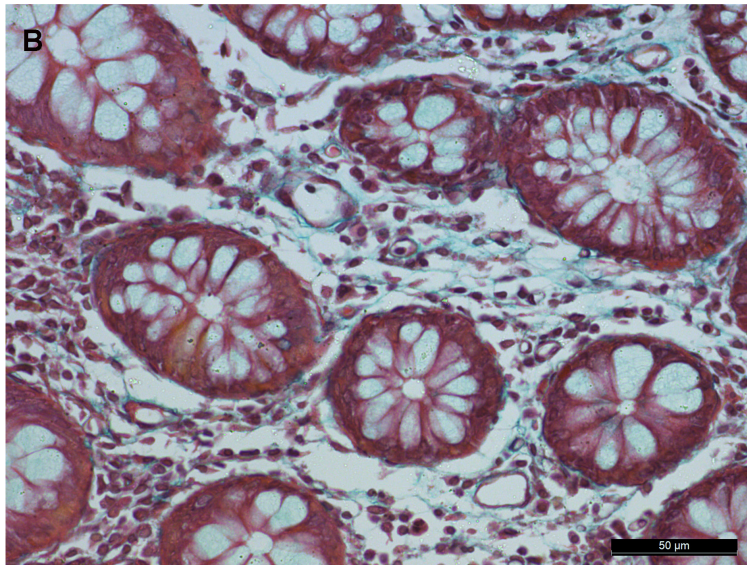
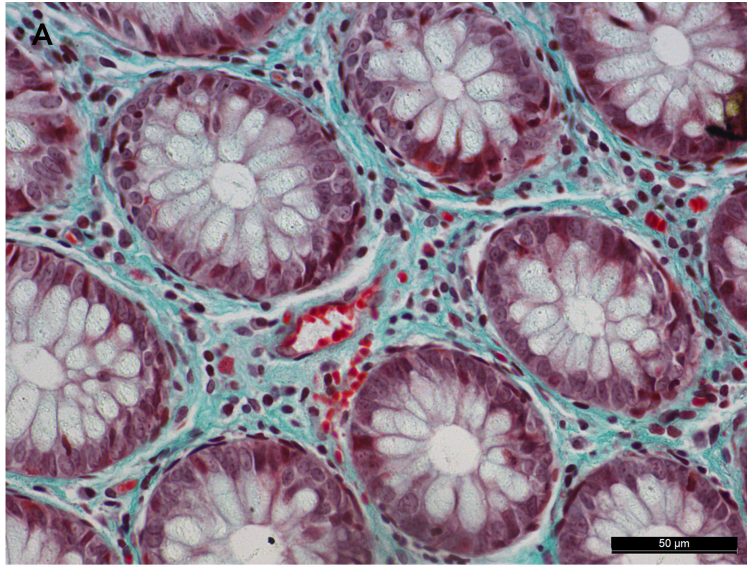
* Kontrole-10 cm od tumora, p<0.01; ** Kontrole-20 cm od tumora, p<0.01;

+ 10 cm od tumora-20 cm od tumora, p<0.01

Zastupljenost kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva



Grafikon 11. Procentualna zastupljenost kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora; *p<0.01

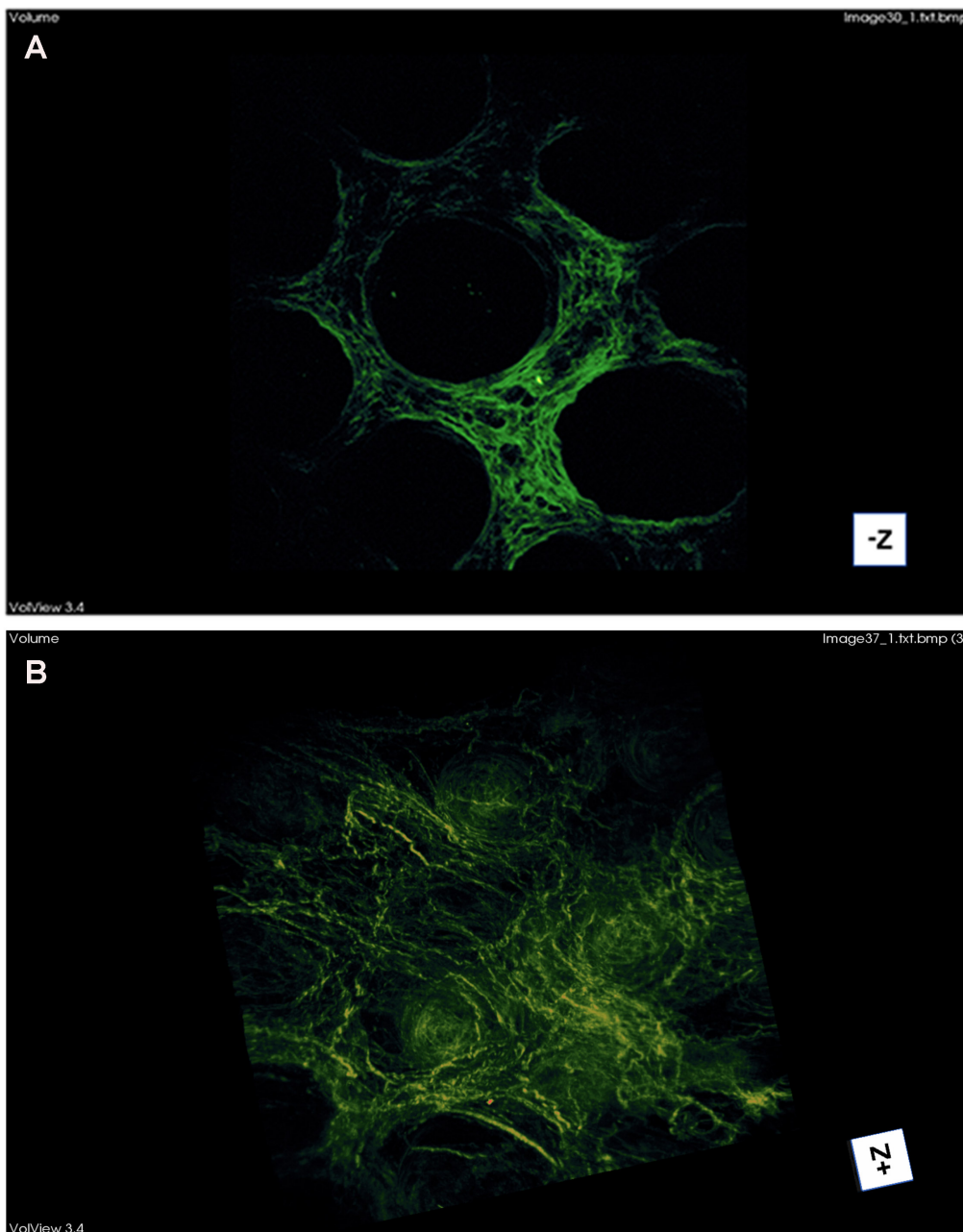


Slika 14. *Masson trichrome* bojenje kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika (A), na udaljenosti 10 cm od tumora (B) i 20 cm od tumora (C). U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika kolagena vlakna su pravilno organizovana, debela, sa malo prostora između njih. Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, kolagena vlakna su tanka, nepravilno raspoređena. Između kolagenih vlakana u lamini propriji pojavljuju se "prazni" prostori. x400

4.7 Primena nelinearnog laserskog skenirajućeg mikroskopa sa sposobnošću detekcije drugog harmonika za vizualizaciju kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva

Kako bismo isključili mogućnost da su promene u organizaciji i zastupljenosti kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva posledica fiksacije tkiva ili samog *Masson trichrome* bojenja, koristili smo nelinearni laserski skenirajući mikroskop (NLS) sa sposobnošću detekcije drugog harmonika (SHG) za prikazivanje kolagenih vlakana u nefiksiranom i neobojenom tkivu. Zbog svoje specifične, necentrosimetrične građe, kolagen je najjači do sada poznati izvor drugog harmonika u tkivu.

Mikrofotografije dobijene NLS mikroskopom u potpunosti odgovaraju rezultatima opisanim na *Masson trichrome* bojenju (Slika 15). Kolagena vlakna u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika su debela, pravilno organizovana u vidu gustih snopova oko kripte i kroz laminu propriju. Na udaljenosti 10 cm od tumora kolagena vlakna su istanjena, gubi se njihov pravilan raspored. Između vlakana se zapažaju "prazni" prostori (Slika 15).



Slika 15. Kolagena vlakna u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora, posmatrana NLS mikroskopom sa sposobnošću SHG detekcije (B). U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika kolagena vlakna su pravilno organizovana, sa minimalnim prostorima između vlakana (A). Na udaljenosti 10 cm od tumora kolagena vlakna su istanjena i dezorganizovana. U lamini propriji sluznice debelog creva uočavaju se "prazni" prostori (B).

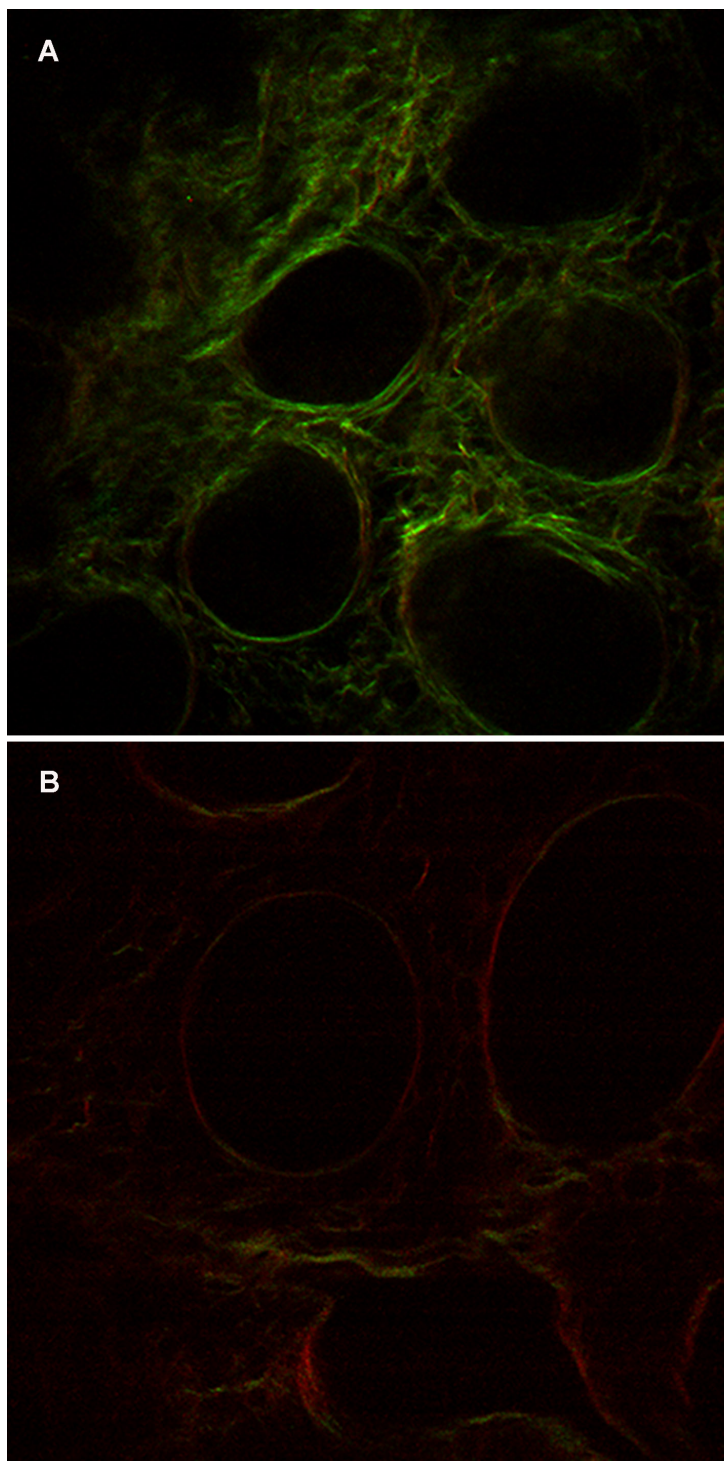
Takođe, na istom mikroskopu, određivan je koeficijent anizotropije β koji daje informaciju o uređenosti kolagenih vlakana.

Srednja vrednost koeficijenta anizotropije β za uzorke debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora je statistički značajno manja, u poređenju sa uzorcima debelog creva zdravih ispitanika (Tabela 34). Smanjenje koeficijenta anizotropije β u udaljenoj lamini propriji sluznice debelog creva pacijenata sa tumorom, govori o većoj neuređenosti kolagenih vlakana (Slika 16).

Tabela 34. Vrednosti koeficijenta anizotropije β u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora debelog creva

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Koeficijent anizotropije β	0.49 ± 0.06	$0.29 \pm 0.08^*$	$0.27 \pm 0.07^+$

* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; ⁺ 10 cm od tumora-20 cm od tumora, $p < 0.01$



Slika 16. Vrednosti koeficijenta anizotropije β prikazane kao slika u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 20 cm od tumora (B). Boja na slici zavisi od intenziteta signala i vrednosti koeficijenta anizotropije β . Što je jači signal, slika je svetlija. Za vrednosti koeficijenta anizotropije $\beta=0$ (neuređen kolagen) slika je crvena, za vrednosti $\beta=1$ (uređen kolagen) je zelena. U lamini propriji

sluznice debelog creva na udaljenosti 20 cm od tumora, kolagena vlakna pokazuju znatno veću neuređenost u poređenju sa kolagenim vlaknima u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika.

4.8 Zastupljenost i organizacija retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva

Za vizualizaciju retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva korišćena je impregnacija srebrom po Gomoriju (Slika 17).

U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika retikularna vlakna su pravilno organizovana u vidu guste mreže oko kriпти i kroz laminu propriju. Prostori između retikularnih vlakana su mali. Bazalna lamina Liberkinovih kriпти okružena je sa tri do četiri sloja retikularnih vlakana (Slika 17A).

Zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva merena je primenom softvera *Icy* (131).

Nema razlike u zastupljenosti retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 35).

Tabela 35. Procentualna zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	42.14 ± 8.04	42.83 ± 10.00

Nema razlike u zastupljenosti retikularnih vlakana u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih osoba (Tabela 36).

Tabela 36. Procentualna zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	43.48 ± 6.86	41.795 ± 7.16	42.11 ± 10.35

U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora bazalna lamina Liberkinovih kripti okružena je sa samo jednim slojem retikularnih vlakana. Retikularna vlakna koja se prostiru između kripti, kroz laminu propriju sluznice debelog creva, su istanjena, a prostori između retikularnih vlakana su povećani (Slika 17B).

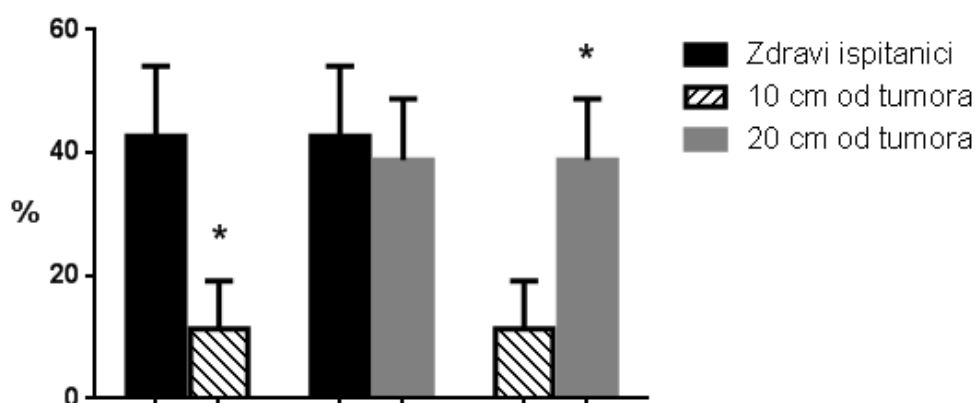
Zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora (27.99 ± 7.86) je statistički značajno manja u odnosu na zdrave ispitanike (42.72 ± 11.33 , $p < 0.01$). Takođe, zastupljenost retikularnih vlakana na udaljenosti 10 cm od tumora (27.99 ± 7.86) je statistički značajno manja u odnosu na zastupljenost retikularnih vlakana na udaljenosti 20 cm od tumora (38.76 ± 10.01 , $p < 0.01$). Na udaljenosti 20 cm od tumora nema statistički značajne razlike u odnosu na zdrave ispitanike (Tabela 37, Grafikon 12).

Tabela 37. Procentualna zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	42.72 ± 11.33	11.33 ± 7.86*	38.76 ± 10.01 ⁺

* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; ⁺ 10 cm od tumora-20 cm od tumora, $p < 0.01$

Zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva



Grafikon 12. Procentualna zastupljenost retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora; * $p < 0.01$

U programu *Fiji* merena je veličina prostora između retikularnih vlakana (Slika 17 C-F).

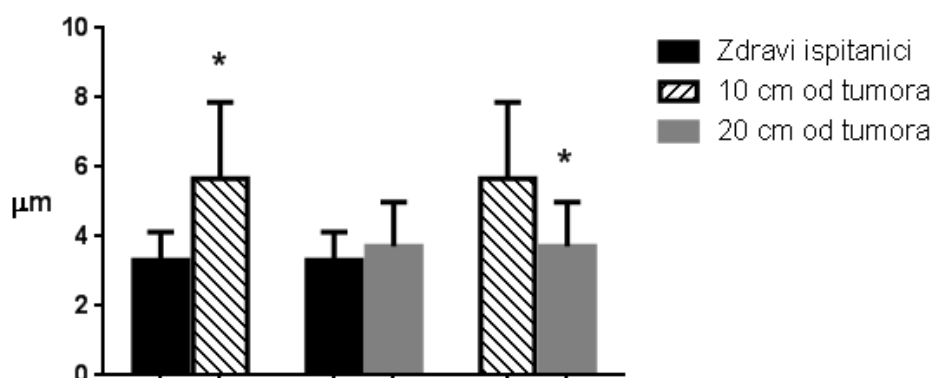
Morfometrijska analiza pokazala je da je dijametar prostora između retikularnih vlakana statistički značajno povećan na udaljenosti 10 cm od tumora ($5.66 \pm 2.21 \mu\text{m}$), u poređenju kako sa zdravim ispitanicima ($3.32 \pm 0.81 \mu\text{m}$, $p < 0.01$) tako i sa sluznicom na udaljenosti 20 cm od tumora ($3.72 \pm 1.27 \mu\text{m}$). Nema statistički značajne razlike u veličini prostora između retikularnih vlakna na udaljenosti 20 cm od tumora i zdravih ispitanika (Tabela 38, Grafikon 13).

Tabela 38. Dijametar prostora između retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora

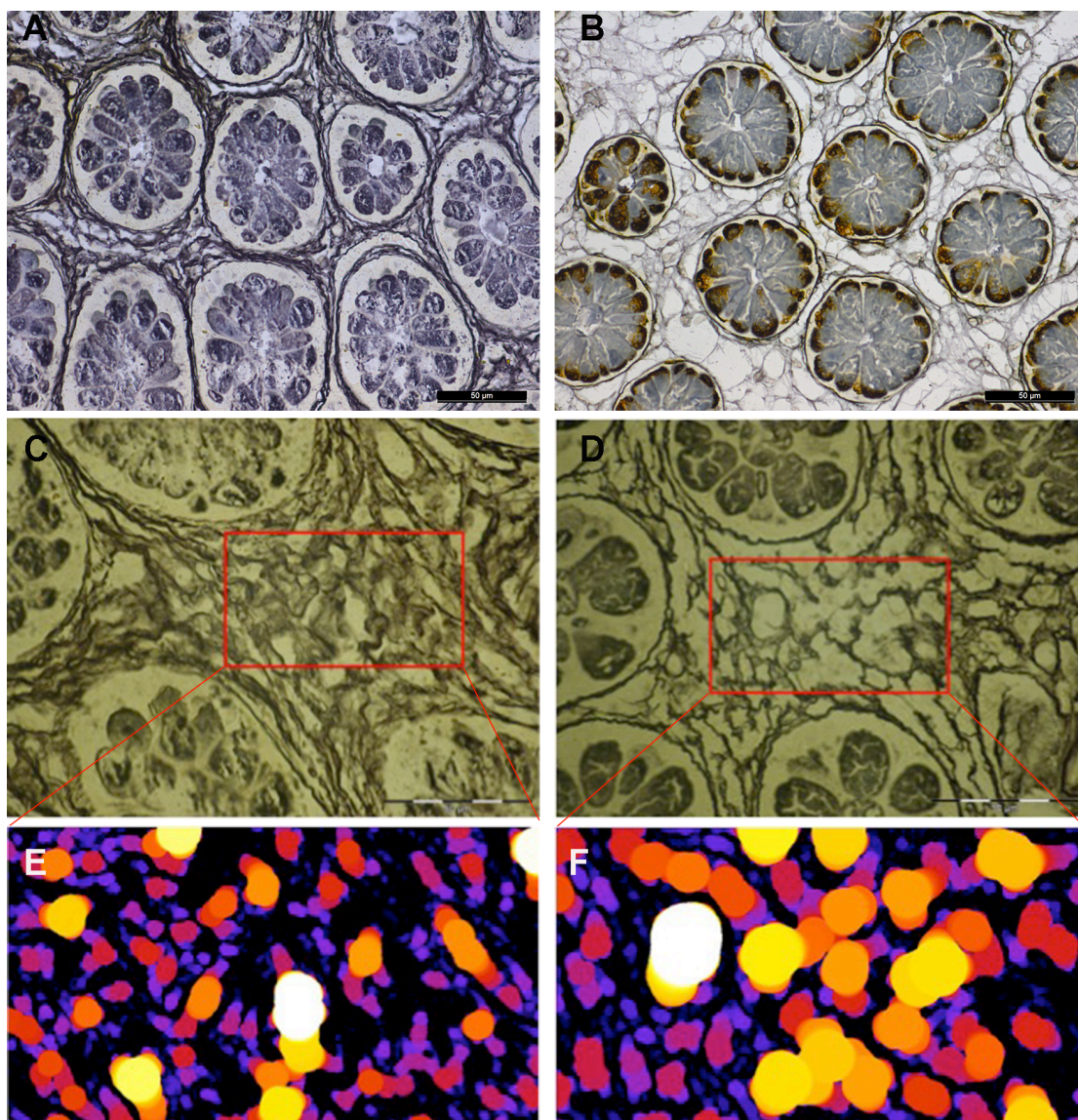
	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Dijametar prostora između retikularnih vlakana (μm)	3.32 ± 0.81	$5.66 \pm 2.21^*$	$3.72 \pm 1.27^+$

* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; + 10 cm od tumora-20 cm od tumora, $p < 0.01$

Dijametar postora između retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva



Grafikon 13. Dijametar prostora između retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora; * $p < 0.01$

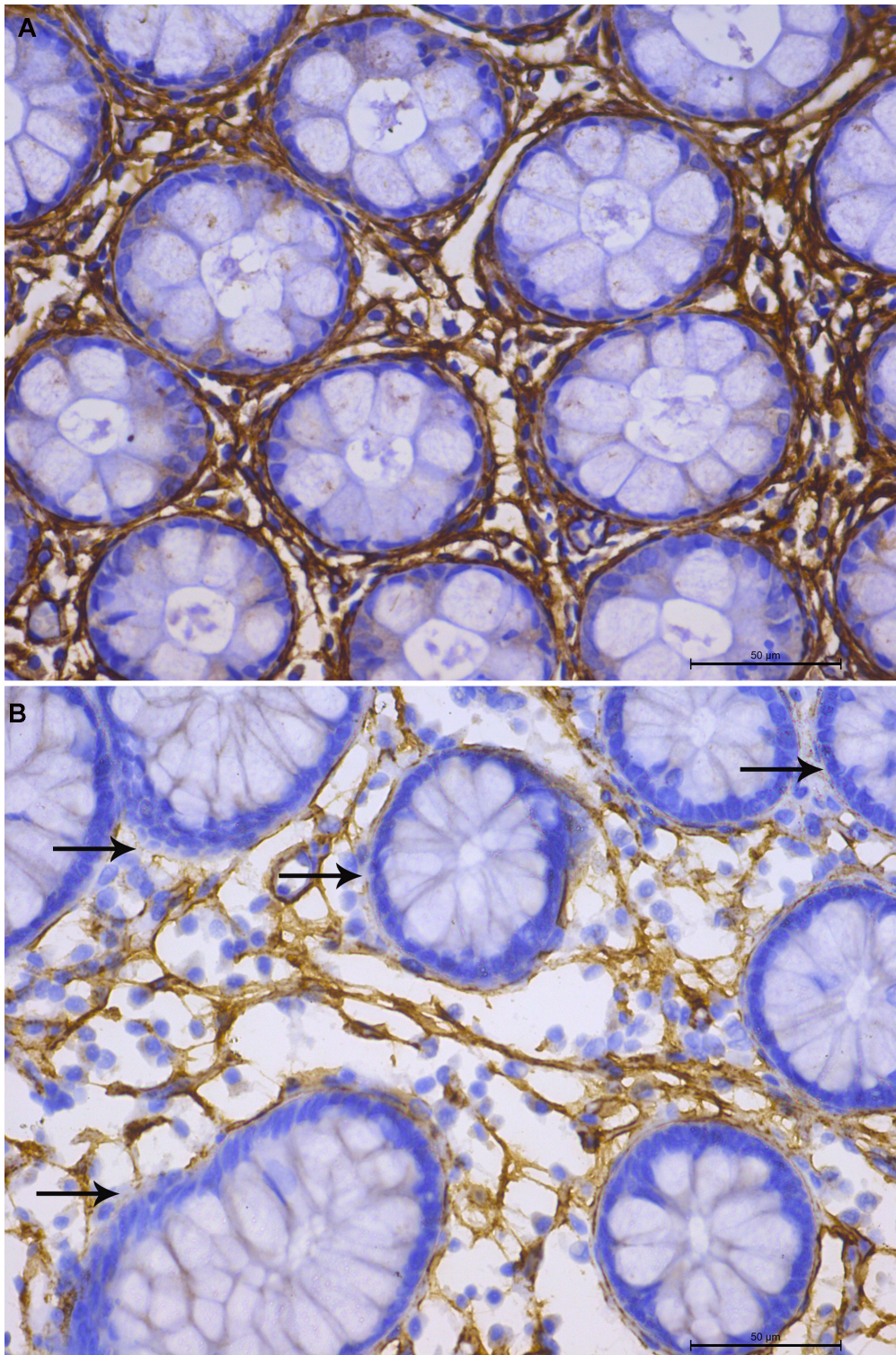


Slika 17. Retikularna vlakna u lamini proprijii sluznice debelog creva zdravih ispitanika (A, C) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B, D); impregnacija srebrom po Gomoriju. U lamini proprijii sluznice debelog creva zdravih ispitanika retikularna vlakna su debela, pravilno raspoređena u vidu guste mreže (A, x400); Na udaljenosti 10 cm od tumora retikularna vlakna su tanka; u lamini proprijii između retikularnih vlakana uočavaju se veliki "prazni" prostori (B, x400); Merenje dijametara prostora između retikularnih vlakana u lamini proprijii sluznice debelog creva zdravih ispitanika (C, x630) i na udaljenosti 10 cm od tumora (D, x630). Merenje se sprovodi u okviru pravouganih konstantne površine koji se upisuju u laminu proprijii. Grafički *output* u programu *Fiji*, plug-in *Bone J* zdravi ispitanici (E) i 10 cm od tumora (F). Svetlije prebojene sfere imaju veći dijametar.

4.9 Zastupljenost i organizacija periostina u lamini propriji sluznice debelog creva

U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika periostin je zastupljen u vidu mreže između kripti i neposredno oko kripti, gradeći jasno uočljiv perikriptalni omotač. Mreža koju gradi periostin u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika je gusta; uočavaju se mali prostori između molekula periostina (Slika 18A).

U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, i dalje se zapaža periostin u vidu mreže između kripti. Perikriptalni omotač od periostina je istanjen i mestimično nedostaje. Između molekula periostina u lamini propriji sluznice debelog creva zapažaju se veliki prostori (Slika 18B).



Slika 18. Imunohistohemijsko bojenje antitelima na periostin. U lamini propriji sluznice debelog creva periostin je zastupljen u vidu mreže između kripti i neposredno oko kripti, gradeći jasno uočljiv perikriptalni omotač kod zdravih (A). Na udaljenosti 10 cm od tumora (B), perikriptalni omotač koji gradi periostin je istanjen ili u potpunosti nedostaje (strelice); x400

Zastupljenost periostina u lamini propriji sluznice debelog creva merena je primenom softvera Icy (131).

Nema razlike u zastupljenosti periostina u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 39).

Tabela 39. Procentualna zastupljenost periostina u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Zastupljenost periostina u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	45.71 ± 4.47	43.88 ± 12.28

Nema razlike u zastupljenosti periostina u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih osoba (Tabela 40).

Tabela 40. Procentualna zastupljenost periostina u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Zastupljenost periostina u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	48.92 ± 5.60	48.49 ± 11.06	43.36 ± 5.70

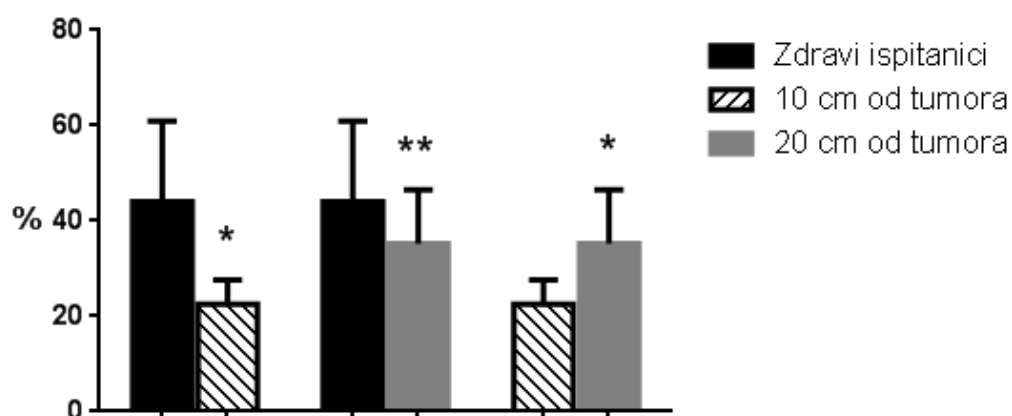
Zastupljenost periostina u lamini propriji sluznice debelog creva je statistički značajno smanjena na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora (22.54 ± 5.09 , $p < 0.01$; 35.22 ± 11.34 , $p < 0.05$) u poređenju sa zdravim ispitanicima (44.00 ± 16.89) Takođe, zastupljenost periostina na udaljenosti 10 cm od tumora (22.54 ± 5.09) je statistički značajno manja u odnosu na zastupljenost periostina 20 cm od tumora (35.22 ± 11.34 , $p < 0.01$) (Tabela 40, Grafikon 14).

Tabela 41. Procentualna zastupljenost periostina u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Zastupljenost periostina u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	44.00 ± 16.89	22.54 ± 5.09*	35.22 ± 11.34** ⁺

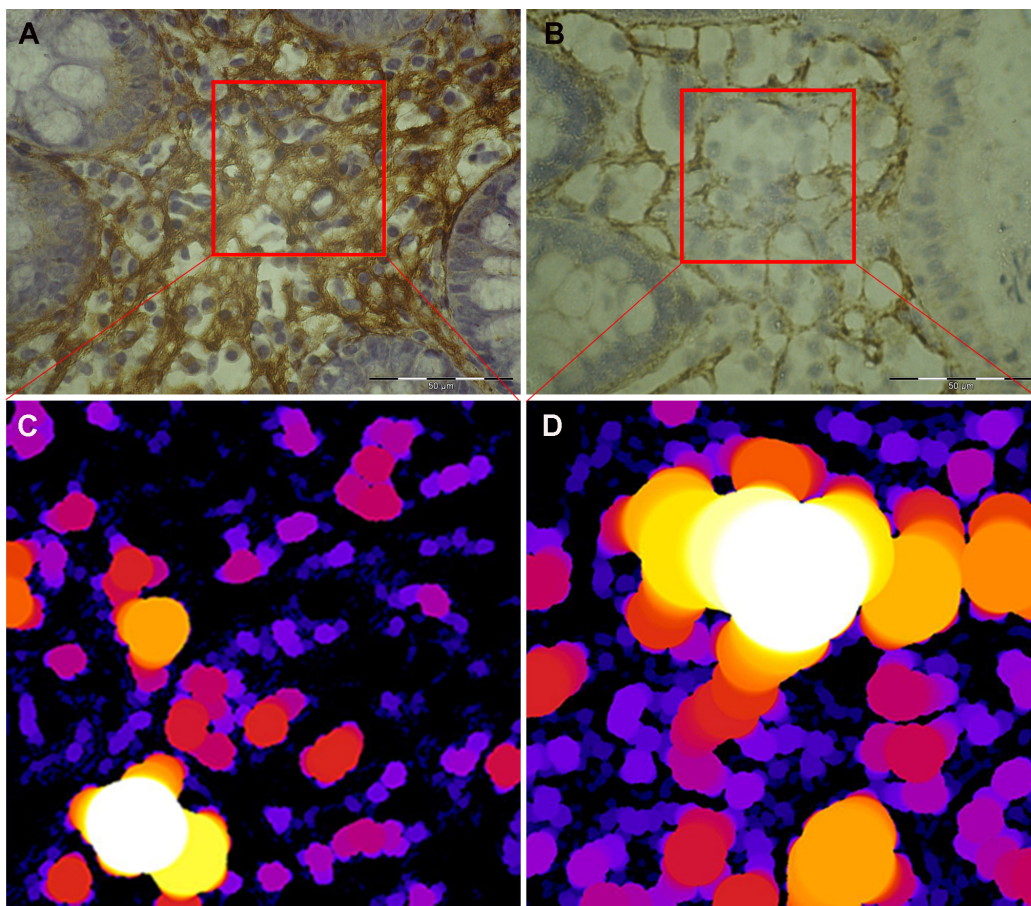
* Kontrole-10 cm od tumora, p<0.01; ** Kontrole-20 cm od tumora, p<0.05; ⁺10 cm -20 cm od tumora, p<0.01

Zastupljenost periostina u lamini propriji sluznice debelog creva



Grafikon 14. Procentualna zastupljenost periostina u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora; * p<0.01; ** p<0.05

U programu *Fiji* meren je dijametar prostora između molekula periostina u lamini propriji sluznice debelog creva (Slika 19).



Slika 19. Merenje dijametra prostora između molekula periostina u programu *Fiji*, *plugin Bone J*. Kod zdravih ispitanika prostori u lamini propriji sluznice debelog creva između molekula periostina su mali (A). Na udaljenosti 10 cm od tumora zapažaju se veliki prostori u lamini propriji sluznice debelog creva (B); Grafički zapis iz *Bone J-a* prilikom merenja dijametra prostora između molekula periostina kod zdravih ispitanika (C) i na udaljenosti 10 cm od tumora (D). Većim prostorima program dodeljuje svetliju boju. x630

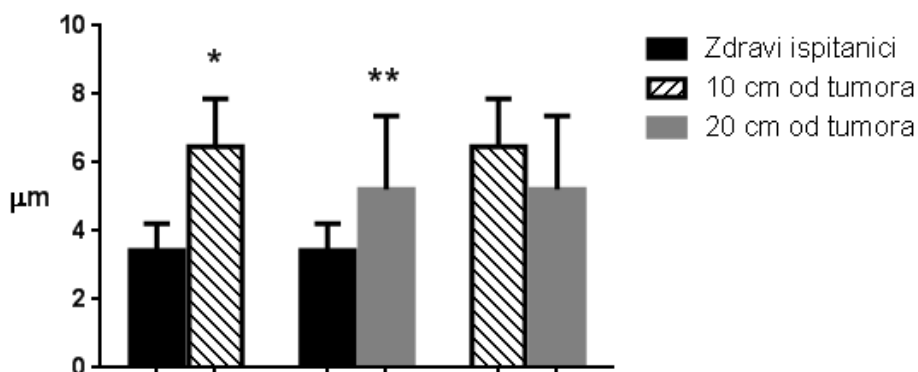
Dijametar prostora između molekula periostina je statistički značajno povećan na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora (6.46 ± 1.41 , $p < 0.01$; 5.21 ± 2.15 , $p < 0.05$) u poređenju sa zdravim ispitanicima (3.43 ± 0.79) (Tabela 42, Grafikon 15).

Tabela 42. Dijametar prostora između molekula periostina u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Dijametar prostora između molekula periostina u lamini propriji sluznice debelog creva (μm)	3.43 ± 0.79	$6.46 \pm 1.41^*$	$5.21 \pm 2.15^+$

* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; +Kontrole-20 cm od tumora, $p < 0.05$

Dijametar prostora između molekula periostina u lamini propriji sluznice debelog creva



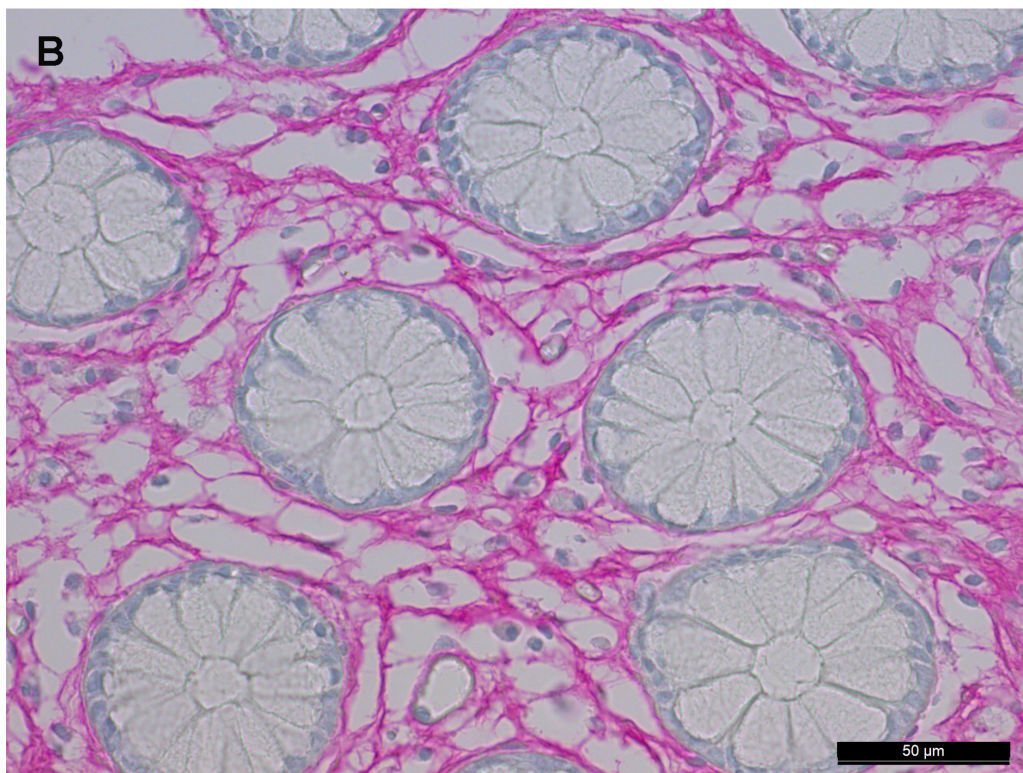
Grafikon 15. Dijametar prostora između molekula periostina u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora; * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$

4.10 Zastupljenost i organizacija hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva

Za detektovanje hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva korišćeno je anti-HABP (*hyaluronic acid binding protein*) antitelo.

U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika hijaluronska kiselina je organizovana u vidu pravilinih, konfluentnih "lanaca" sa vrlo malo prostora između njih (Slika 20A). U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od

tumora "lanci" hijaluronske kiseline se doimaju tanjim, a prostori između njih su veći (Slika 20B).



Slika 20. Imunohistohemijsko bojenje antitelima na HABP. Poprečni presek sluznice debelog creva zdravih (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika hijaluronska kiselina je organizovana u vidu lanaca, sa minimalnim prostorima između njih (A). Na udaljenosti 10 cm od tumora, između istanjenih lanaca hijaluronske kiseline uočavaju se krupni prostori u lamini propriji sluznice debelog creva (B); x400

U programu *Icy* (131) merili smo procentualnu zastupljenost hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva, primenom *plug*-ina *Color Picker Treshold*.

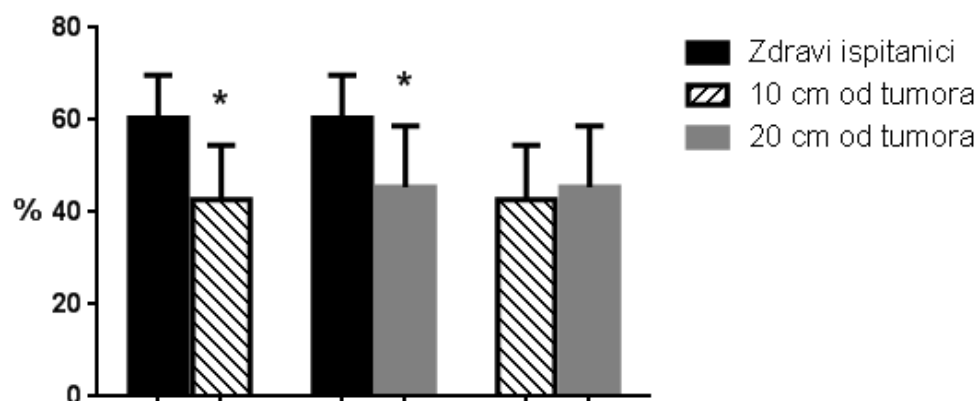
Morfometrijska analiza je pokazala da je na udaljenosti 10 cm i 20 cm od primarne tumorske lezije statistički značajno manja procentualna zastupljenost hijaluronske kiseline (42.71 ± 11.81 i 45.42 ± 13.35 , $P < 0.01$) u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika (60.41 ± 9.31) (Tabela 43, Grafikon 16).

Tabela 43. Procentualna zastupljenosti hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Zastupljenost hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	60.41 ± 9.31	$42.71 \pm 11.81^*$	$45.42 \pm 13.35^{**}$

* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; **Kontrole-20 cm od tumora, $p < 0.01$.

Zastupljenost hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva



Grafikon 16. Procentualna zastupljenost hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora; * $p < 0.01$

Dijametar prostora između lanaca hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva meren je primenom *plug*-ina *Bone J* u programu *Fiji* (Slika 21) (133).

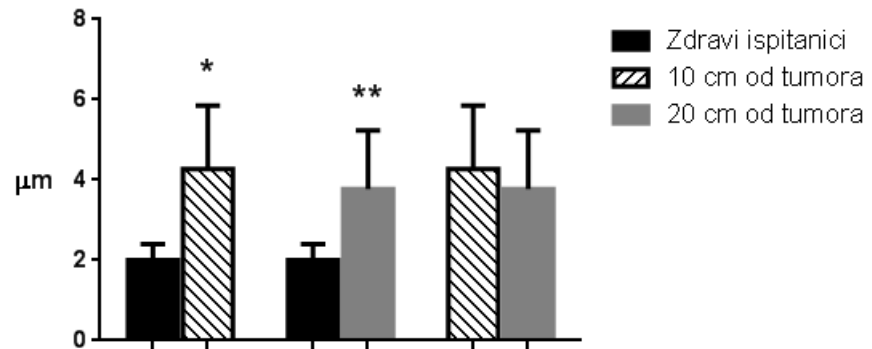
Dijametar prostora između "lanaca" polimera hijaluronske kiseline je statistički značajno povećan u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora ($4.27 \pm 1.58 \mu\text{m}$, $p < 0.01$ i $3.78 \pm 1.45 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) u poređenju sa zdravim ispitanicima ($2.00 \pm 0.40 \mu\text{m}$) (Tabela 44, Grafikon 17).

Tabela 44. Dijametar prostora između "lanaca" hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

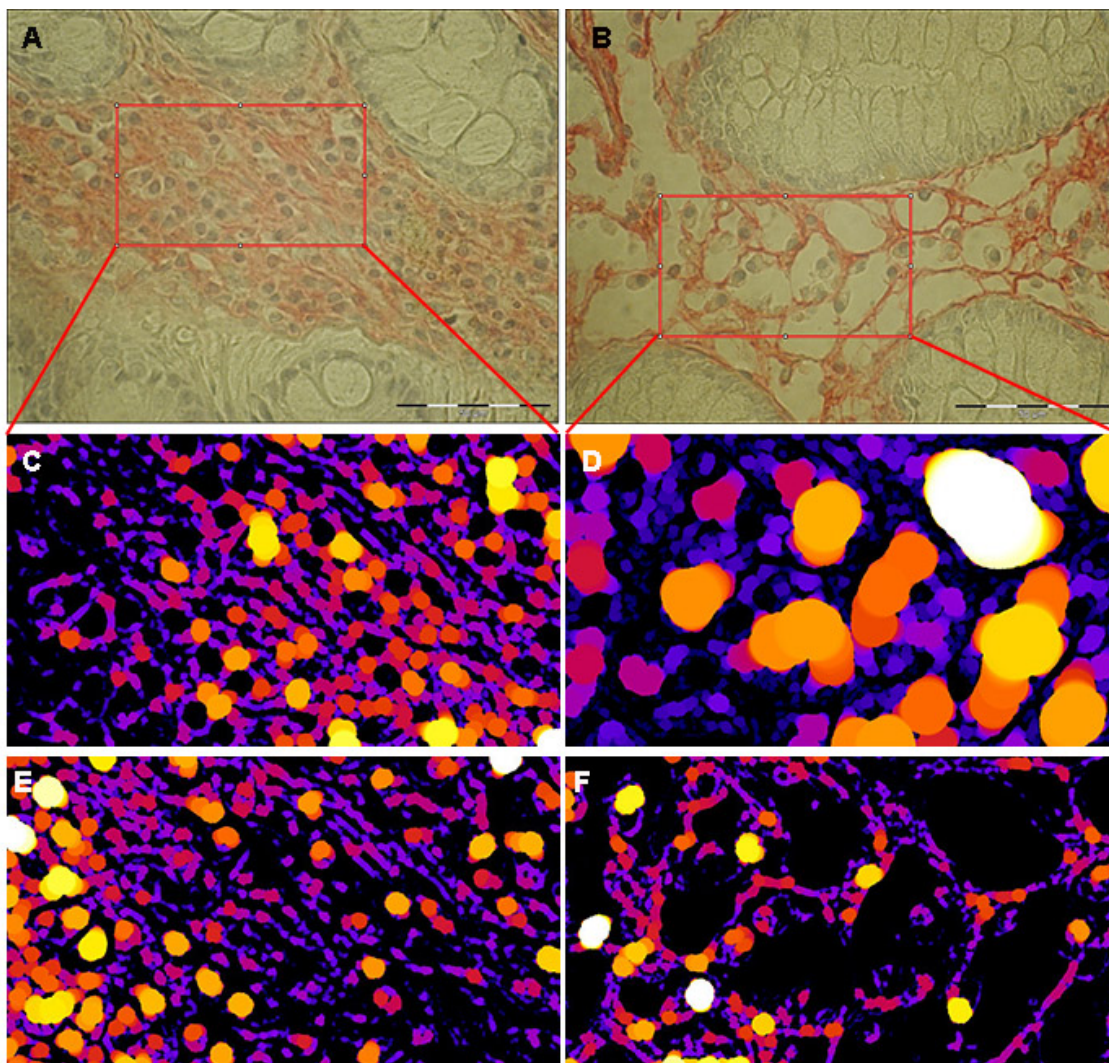
	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Dijametar prostora između "lanaca" hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva (μm)	2.00 ± 0.40	$4.27 \pm 1.58^*$	$3.78 \pm 1.45^+$

* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; +Kontrole-20 cm od tumora, $p < 0.05$

Dijametar prostora između "lanaca" hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva



Grafikon 17. Dijametar prostora između "lanaca" hijaluronske kiseline u lamini propriji debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora; * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$



Slika 21. Merenje dijametra prostora između "lanaca" molekula hijaluronske kiseline i debljine "lanaca" u programu *Fiji*, *plug-in Bone J*. Kod zdravih ispitanika "lanci" hijaluronske kiseline su debeli i gusto raspoređeni kroz laminu propriju sluznice debelog creva; prostori između "lanaca" su mali (A). Na udaljenosti 10 cm od tumora "lanci" hijaluronske kiseline su istanjeni; između njih se pojavljuju veliki prostori u lamini propriji sluznice debelog creva (B); Grafički zapis iz *Bone J-a* prilikom merenja dijametra prostora između "lanaca" hijaluronske kiseline kod zdravih ispitanika (C) i na udaljenosti 10 cm od tumora (D). Većim prostorima program dodeljuje svetliju boju. Grafički zapis iz *Bone J-a* prilikom merenja debljine "lanaca" hijaluronske kiseline kod zdravih ispitanika (E) i na udaljenosti 10 cm od tumora (F). Debljim "lancima" program dodeljuje svetliju boju. x630

U programu *Fiji*, korišćenjem istog *plug*-ina *Bone J*, merena je i debljina "lanaca" hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva (Slika 21) (133).

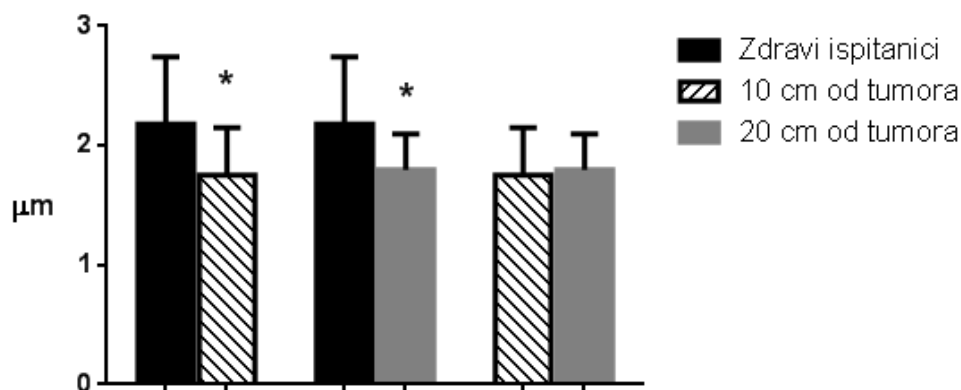
Debljina "lanaca" polimera hijaluronske kiseline je statistički značajno smanjena u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora ($1.75 \pm 0.4 \mu\text{m}$ i $1.83 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) u odnosu na zdrave ispitanike ($2.18 \pm 0.56 \mu\text{m}$) (Tabela 45, Grafikon 18).

Tabela 45. Debljina "lanaca" hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Debljina "lanaca" hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva (μm)	2.18 ± 0.56	$1.75 \pm 0.4^*$	$1.8 \pm 0.3^+$

* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.05$; ⁺Kontrole-20 cm od tumora, $p < 0.05$.

Debljina "lanaca" hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva



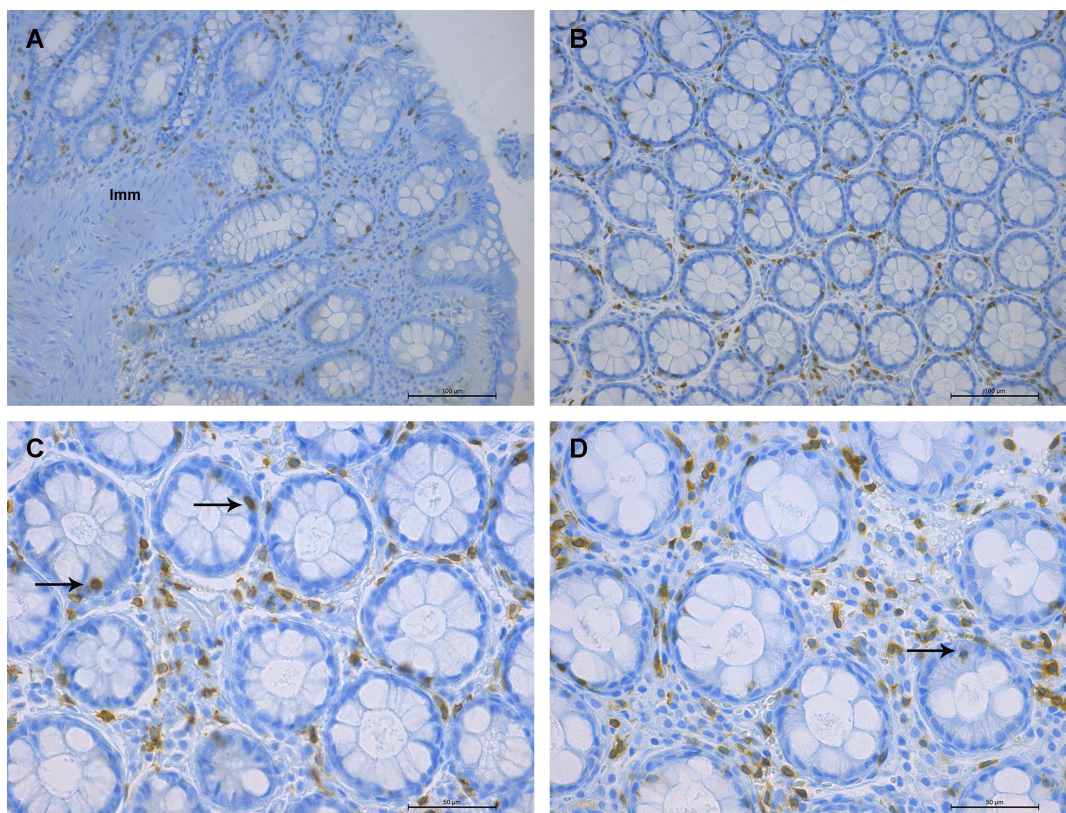
Grafikon 18. Debljina "lanaca" hijaluronske kiseline u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od malignog tumora; * $p < 0.05$

4.11 Detektovanje ćelija lamine proprije sluznice debelog creva

Detektovanje T-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva

Za identifikaciju T-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva koristili smo anti-CD3 antitelo.

U sluznici debelog creva brojni T-limfociti se zapažaju u lamini propriji i epitelu (Slika 22). T-limfociti su prisutni u svim delovima sluznice debelog creva, sa nešto većom gustinom subepitelno i neposredno iznad lamine muskularis mukoze. Broj T-limfocita u sluznici debelog creva varira i kod zdravih i kod ispitanika sa tumorom.



Slika 22. Imunohistohemijsko bojenje na CD3; sluznica debelog creva zdravih ispitanika (A, C) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B, D). Uočavaju se brojni T-limfociti u epitelu i lamini propriji sluznice debelog creva. Imm-lamina muscularis mucosae; strelice pokazuju intraepitelne T-limfocite. A, B x200; C, D x400

Na uveličanju x200 u programu *Fiji* meren je broj T-limfocita u celoj lamini propriji

sluznice debelog creva na isečku.

Nije izmerena razlika u broju T-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 46).

Tabela 46. Broj T-limfocita limfocita na 0.1 mm^2 lamine proprije sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Broj T-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva	125.24 ± 33.99	129.34 ± 39.61

Nije izmerena razlika u broju T-limfocita u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih osoba (Tabela 47).

Tabela 47. Broj T-limfocita na 0.1 mm^2 lamine proprije različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

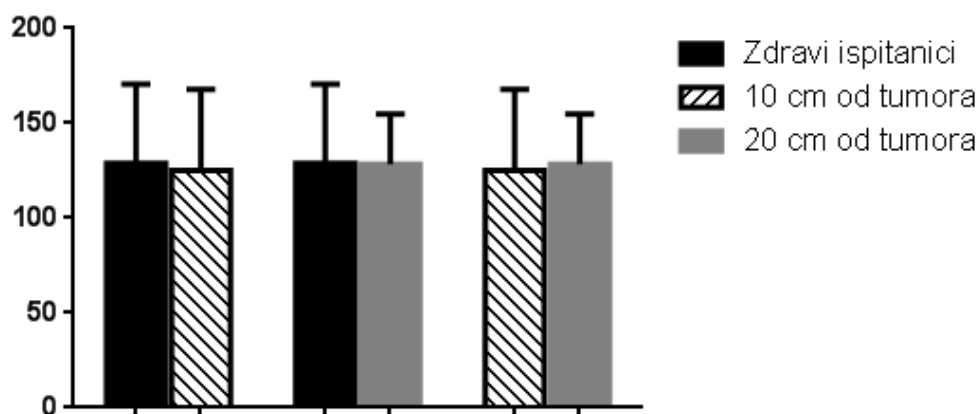
Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Broj T-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva	122.62 ± 41.63	130.98 ± 37.44	125.68 ± 50.30

Nije izmerena razlika u broju T-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabela 48, Grafikon 19).

Tabela 48. Broj T-limfocita na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Broj T-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva	128.69 ± 41.81	125.05 ± 42.94	128.20 ± 26.76

Broj T-limfocita na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva



Grafikon 19. Broj T-limfocita na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Analiziran je broj T-limfocita po regionima lamine proprije sluznice debelog creva (subepitelno, u predelu tela kriпти i uz laminu muskularis mukoze). Broj T-limfocita u razlicitim regionima lamine proprije sluznice debelog creva analiziran je na uveličanju x400 puta, i zapaža se da je nešto veći od broja koji se dobija merenjam na uveličanju x200 puta. Razlog je što se prilikom odabira polja za merenje na uveličanju x400, ipak češće odaberu polja u kojima se nalaze ćelije, dok na uveličanju x200 puta obuhvatamo i laminu propriju bez ili sa malo ćelija. Isti odnos je dobijen prilikom merenja svih tipova ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva.

Nema razlike u broju T-limfocita na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora i između zdravih ispitanika u razlicitim regionima lamine proprije debelog creva (Tabela 49).

Tabela 49. Broj T-limfocita na 0.1 mm² lamine proprije različitih regiona sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Broj T-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Subepitelno	164.05 ± 122.86	161.14 ± 60.75	159.27 ± 91.58
Između kripti	126.10 ± 64.44	127.07 ± 58.18	135.11 ± 82.28
Uz laminu muskularis mukoze	138.93 ± 51.01	132.36 ± 90.15	132.68 ± 90.55

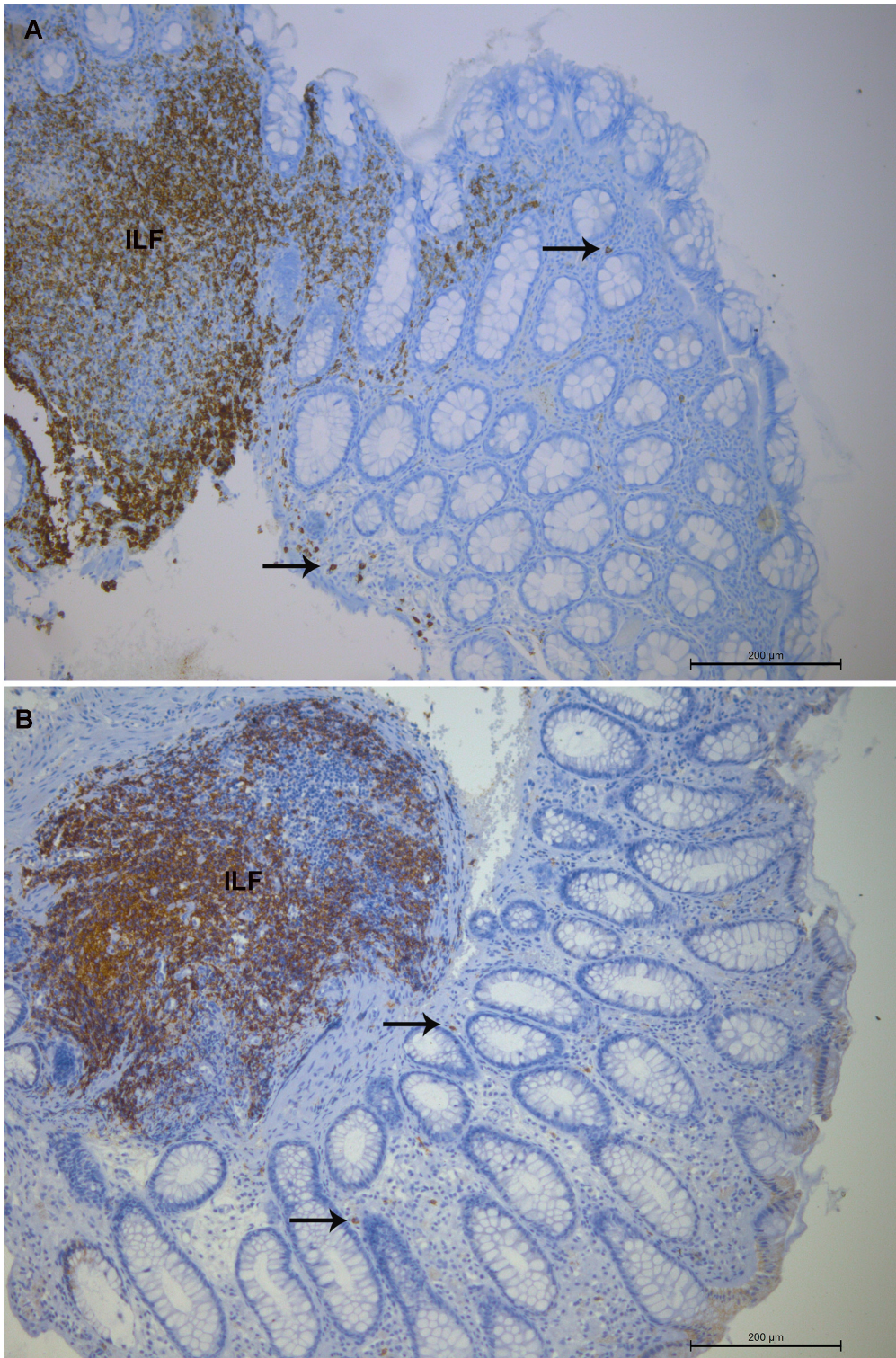
Detektovanje B-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva

Za identifikaciju B-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva koristili smo anti-CD20 antitelo.

U lamini propriji sluznice debelog creva B-limfociti su veoma retki, osim u izolovanim limfnim folikulima.

Zapažaju se pojedinačni B-limfociti u lamini propriji sluznice debelog creva, kako zdravih ispitanika, tako i ispitanika sa adenokarcinomom (Slika 23).

Zbog malog broja B-limfocita u lamini propriji sluznice debelog creva, nisu kvantifikovani.

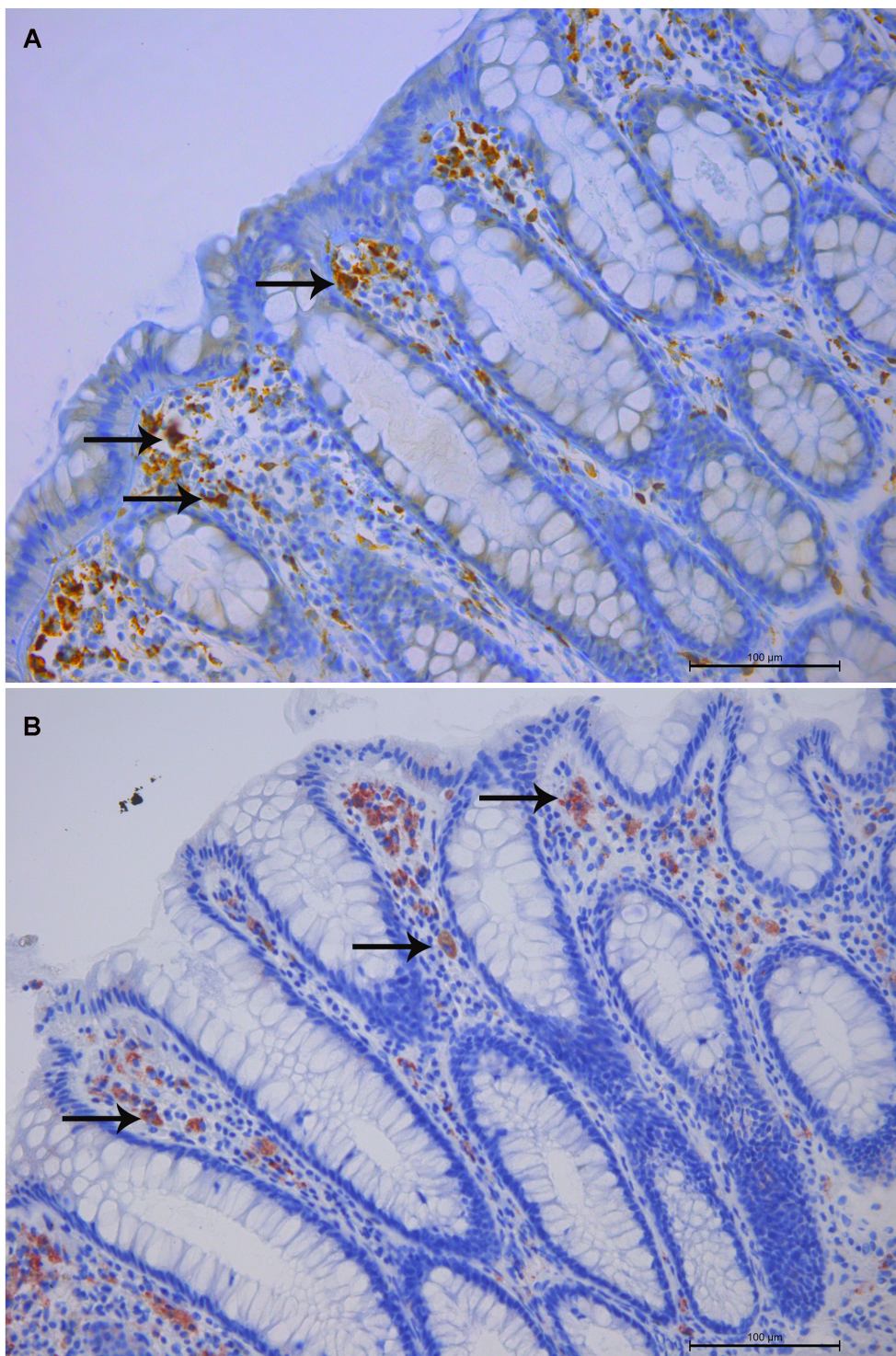


Slika 23. Imunohistohemijsko bojenje antitelom na CD20. Sluznica debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). Zapažaju se retki B-limfociti u lamini proprijii van izolovanih limfnih folikula (strelica). ILF- izolovani limfni folikul; x100

Detektovanje makrofaga u lamini propriji sluznice debelog creva

Za identifikaciju makrofaga u lamini propriji sluznice debelog creva koristili smo anti-CD68 antitelo.

U sluznici debelog creva nalazi se veliki broj makrofaga: uočavaju se kao krupne ćelije sa produžecima. U debelom crevu kako zdravih, tako i ispitanika sa tumorom, makrofazi su najbrojniji subepitelno (Slika 24).



Slika 24. Imunohistohemijsko bojenje antitelom na CD68. Sluznica debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). Makrofazi se nalaze u svim delovima sluznice debelog creva, ali su najgušće raspoređeni subepitelno. Nema razlike u broju i distribuciji makrofaga (strelice) u lamini proprijii sluznice debelog creva zdravih ispitanika i ispitanika sa tumorom; x200

Na uveličanju x200 u programu *Fiji* meren je broj makrofaga u celoj lamini propriji sluznice debelog creva na isečku.

Nije izmerena razlika u broju makrofaga u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 50).

Tabela 50. Broj makrofaga na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Broj makrofaga u lamini propriji sluznice debelog creva	114.20 ± 35.28	123.42 ± 31.95

Nije izmerena razlika u broju makrofaga u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih osoba (Tabela 51).

Tabela 51. Broj makrofaga na 0.1 mm² lamine proprije različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

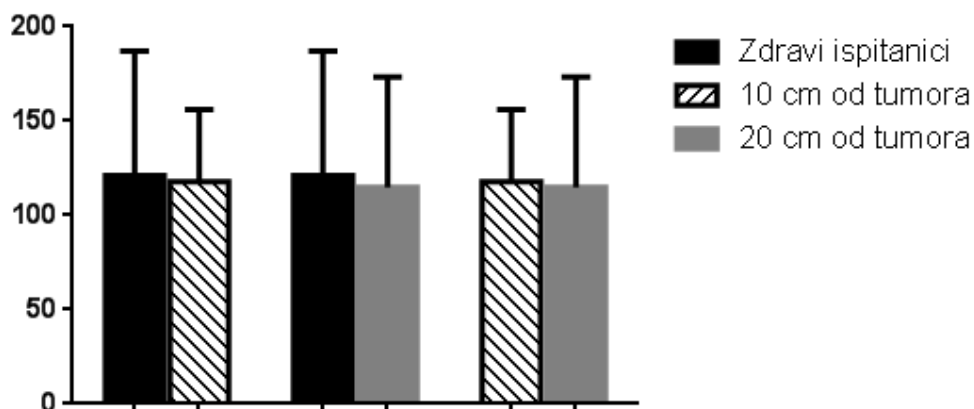
Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Broj makrofaga u lamini propriji sluznice debelog creva	135.95 ± 58.77	114.62 ± 43.18	114.20 ± 35.28

Nije izmerena razlika u broju makrofaga u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabela 52, Grafikon 20).

Tabela 52. Broj makrofaga na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Broj makrofaga u lamini propriji sluznice debelog creva	121.10 ± 65.94	117.98 ± 38.12	114.72 ± 58.58

Broj makrofaga na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva



Grafikon 20. Broj makrofaga na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Analiziran je broj makrofaga po regionima lamine proprije sluznice debelog creva (subepitelno, u predelu tela kripti i uz laminu muskularis mukoze) na uveličanju x400.

Najveći broj makrofaga nalazi se subepitelno.

Nije izmerena razlika u broju makrofaga po regionima lamine proprije sluznice debelog creva između zdravih ispitanika i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od adenokarcinoma debelog creva (Tabela 53).

Tabela 53. Broj makrofaga na 0.1 mm² lamine proprije različitih regiona sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Broj makrofaga u lamini proprije sluznice debelog creva	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Subepitelno	233.48 ± 105.41	249.94 ± 77.95	225.89 ± 102.39
Između kriпти	85.45 ± 41.15	97.94 ± 36.59	107.06 ± 65.96
Uz laminu muskularis mukoze	129.14 ± 70.72	148.17 ± 90.59	137.51 ± 82.91

Detektovanje plazma ćelija u lamini proprije sluznice debelog creva

Za identifikaciju plazma ćelija u lamini proprije sluznice debelog creva koristili smo anti-CD138 antitelo.

U lamini proprije sluznice debelog creva kako zdravih ispitanika tako i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, uočavaju se brojne CD138-pozitivne ćelije (Slika 25).

CD138-pozitivne ćelije su krupne, najčešće sa ekscentrično lokalizovanim, svetlim jedrom.

CD138-pozitivne ćelija, kako kod zdravih ispitanika, tako i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, nalaze se u svim delovima lamine proprije sluznice debelog creva. Neposredno ispod površnog epitela, plazma ćelije gotovo u potpunosti nedostaju. Naročito je veliki broj plazma ćelija u središnjim delovima lamine proprije sluznice debelog creva, između tela Liberkinovih kriпти (Slika 25).

Na uveličanju x200 u programu *Fiji* meren je broj plazma ćelija u celoj lamini proprije sluznice debelog creva na isečku.

Nije izmerena razlika u broju plazma ćelija u lamini proprije sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 54).

Tabela 54. Broj plazma ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Broj plazma ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	202.15 ± 56. 83	205. 72 ± 59. 17

Nije izmerena razlika u broju plazma ćelija u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih osoba (Tabela 55).

Tabela 55. Broj plazma ćelija na 0.1 mm² lamine proprije različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

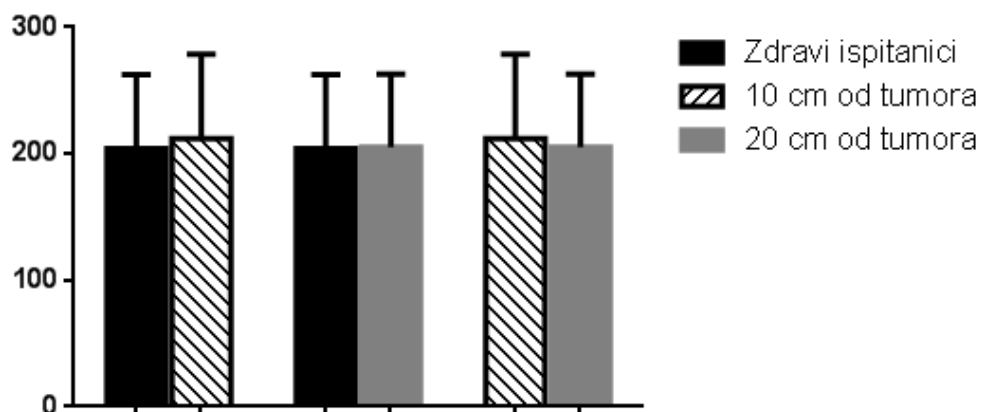
Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Broj plazma ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	205.788 ± 52.13	204.11 ± 54.39	204.88 ± 55.21

Nije izmerena razlika u broju plazma ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabela 56, Grafikon 21).

Tabela 56. Broj plazma ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Broj plazma ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	204.21 ± 58.33	212.21 ± 66.46	205.12 ± 57.81

Broj plazma celija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva



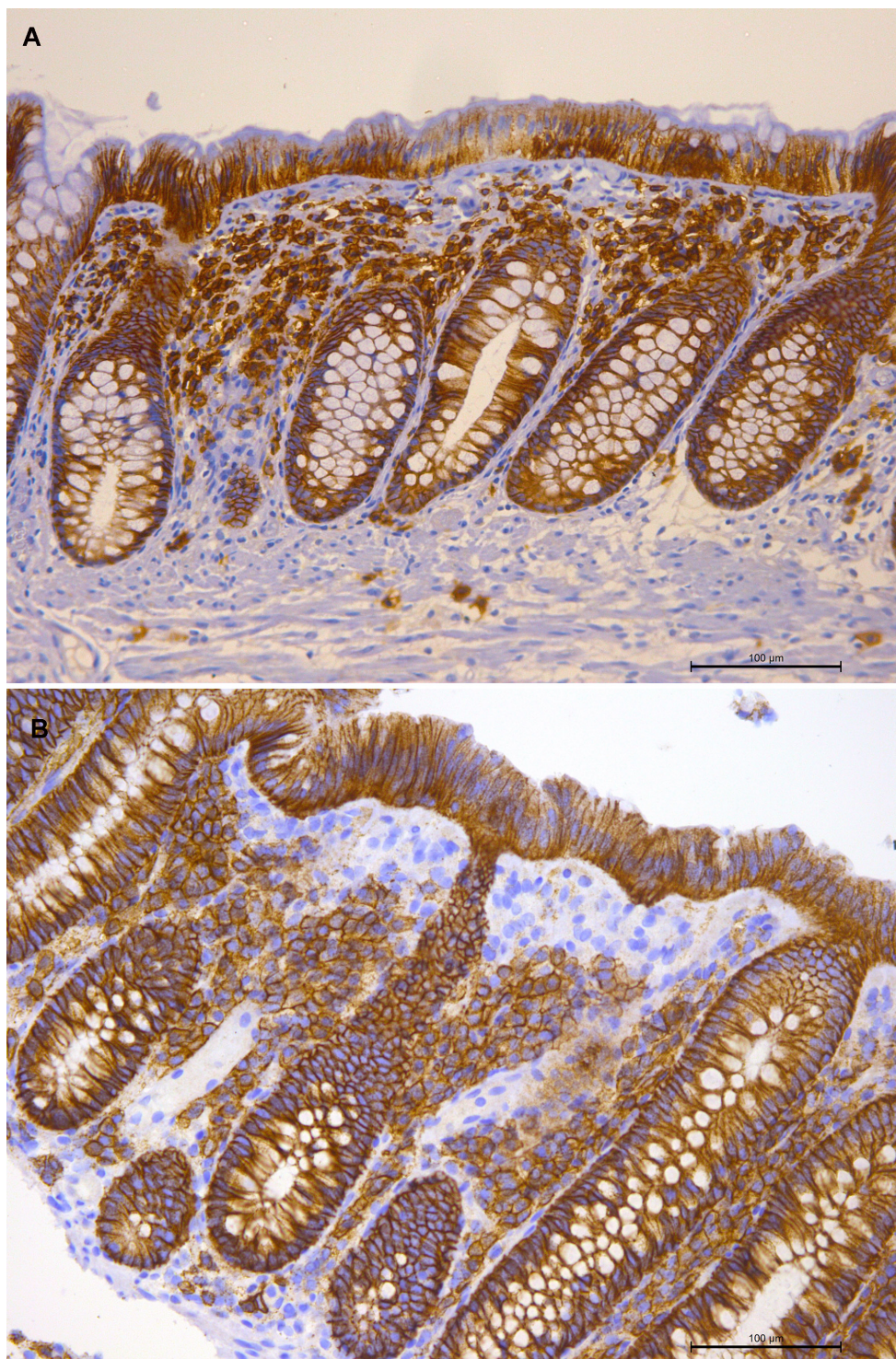
Grafikon 21. Broj plazma ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Analiziran je broj plazma ćelija po regionima lamine proprije sluznice debelog creva (subepitelno, u predelu tela kripti i uz laminu muskularis mukoze) na uveličanju x400.

Nije izmerena razlika u broju plazma ćelija po regionima lamine proprije sluznice debelog creva između zdravih ispitanika i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od adenokarcinoma debelog creva (Tabela 57).

Tabela 57. Broj plazma ćelija na 0.1 mm² lamine proprije različitih regiona sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Broj plazma ćelija na 0.1 mm ² lamine proprije sluznice debelog creva	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Subepitelno	284.05 ± 80.96	279.64 ± 74.00	266.28 ± 70.06
Između kripti	283.22 ± 56.99	257.23 ± 74.56	252.95 ± 93.24
Uz laminu muskularis mukoze	156.22 ± 42.53	170.89 ± 67.74	193.82 ± 74.98

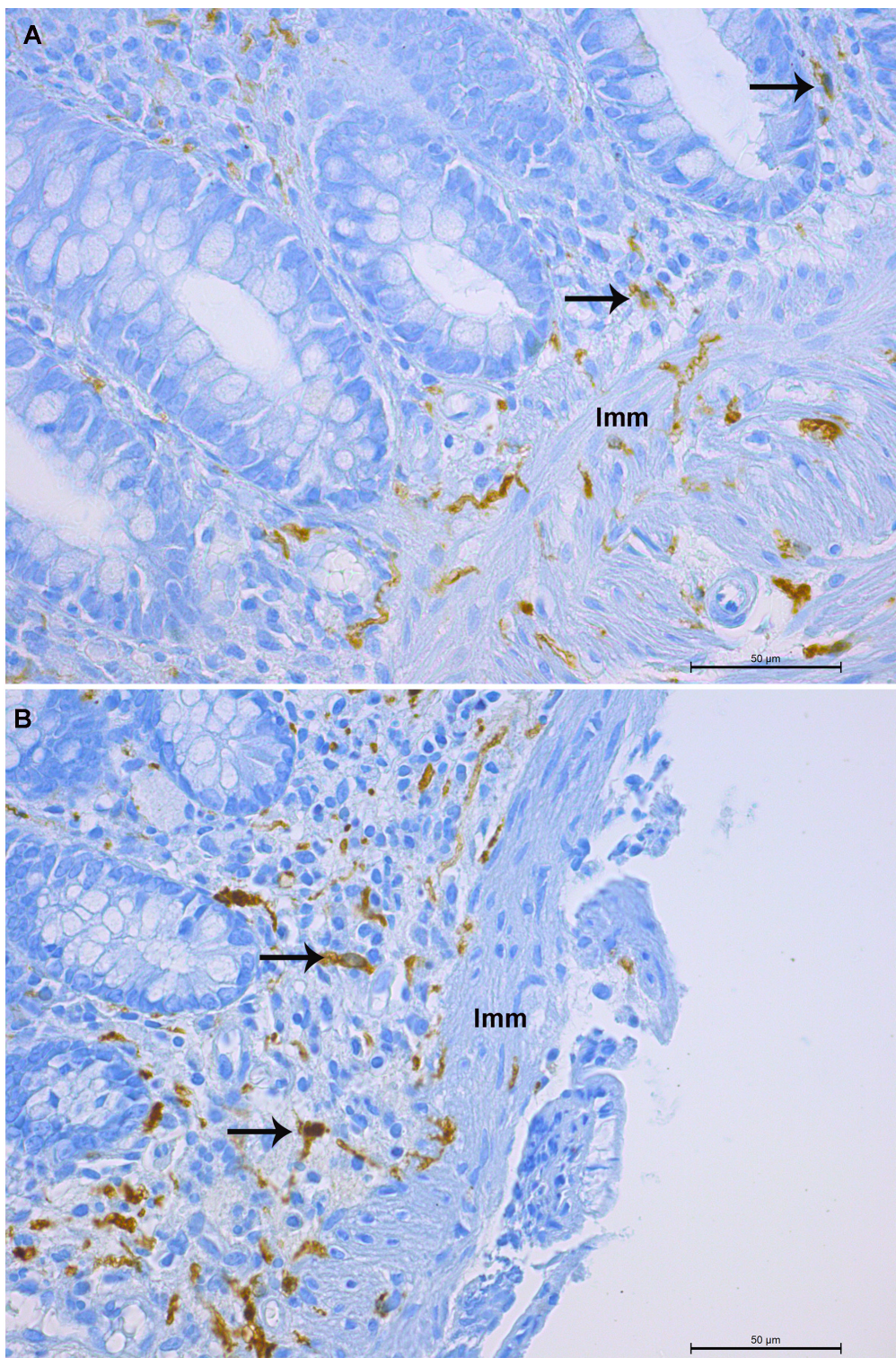


Slika 25. Imunohistohemijsko bojenje antitelom na CD138. Sluznica debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). Uočavaju se brojne, krupne plazma ćelije, dominantno u višim delovima lamine propije; Nema razlike u broju i distribuciji plazma ćelija u lamini propiji sluznice debelog creva zdravih ispitanika i ispitanika sa tumorom; x200

Detektovanje dendritskih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva

Za identifikaciju dendritskih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva koristili smo anti-S100 antitelo.

U lamini propriji sluznice debelog creva kako zdravih ispitanika tako i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, uočavaju se brojne, krupne S100-pozitivne ćelije (Slika 26).



Slika 26. Imunohistohemijsko bojenje antitelom na S100. Sluznica debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 10 cm od tumora (B). Strelicama su pokazane pojedine krupne S100-pozitivne dendritske ćelije. Imm-lamina muscularis mucosae; x200

Na uveličanju x200 u programu *Fiji* meren je broj dendritskih ćelija u celoj lamini propriji sluznice debelog creva na isečku.

Nije izmerena razlika u broju dendritskih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 58).

Tabela 58. Broj dendritskih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Broj dendritskih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	47.12 ± 25. 53	44. 96 ± 27. 10

Nije izmerena razlika u broju dendritskih ćelija u lamini propriji različitih delova debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih osoba (Tabela 59).

Tabela 59. Broj dendritskih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

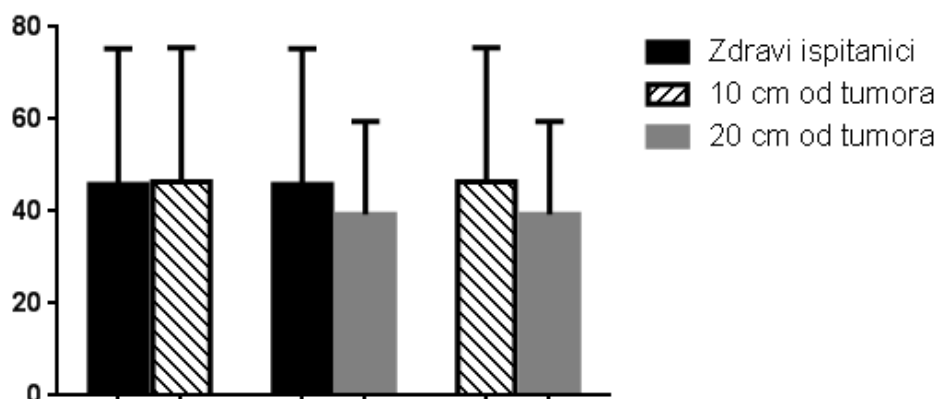
Zdravi ispitanici	Rektum	Sigmoideum	Ascendens
Broj dendritskih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	49.18 ± 27. 44	45.67 ± 24.75	44.80 ± 25.69

Nije izmerena razlika u broju dendritskih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabela 60, Grafikon 22).

Tabela 60. Broj dendritskih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Broj dendritskih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	45.86 ± 29.45	46.40 ± 29.11	39.32 ± 20.16

Broj dendritskih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva



Grafikon 22. Broj dendritskih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Analiziran je broj dendritskih ćelija po regionima lamine proprije sluznice debelog creva (subepitelno, u predelu tela kripte i uz laminu muskularis mukoze) na uveličanju x400.

Nije izmerena razlika u broju dendritskih ćelija po regionima lamine proprije sluznice debelog creva između zdravih ispitanika i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od adenokarcinoma debelog creva (Tabela 61).

Tabela 61. Broj dendritskih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije različitih regiona sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

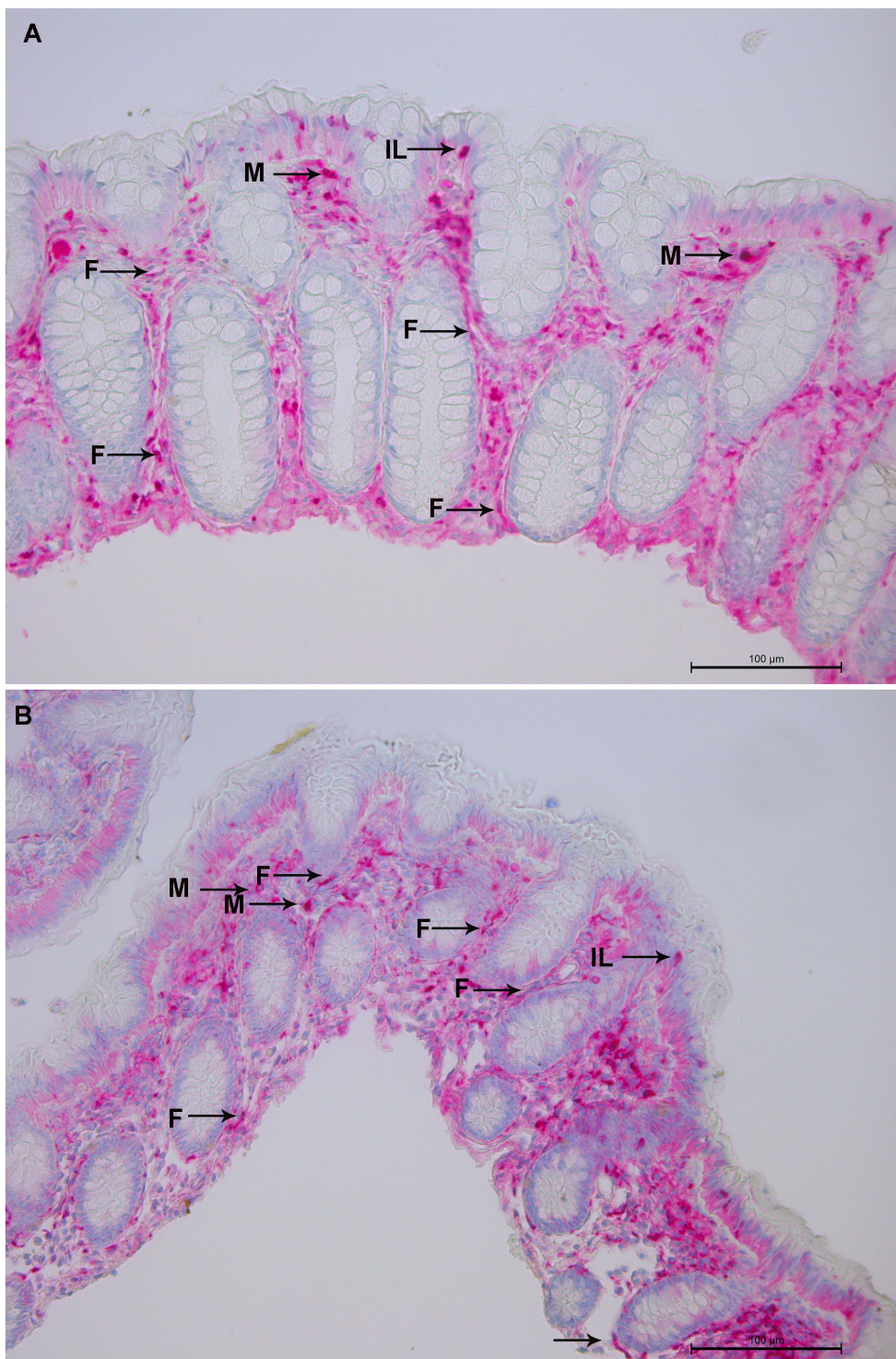
Broj dendritskih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Subepitelno	48.74 ± 30.98	47.52 ± 20.80	41.97 ± 20.51
Između kripti	70.83 ± 36.27	79.59 ± 23.13	77.34 ± 49.70
Uz laminu muskularis mukoze	68.51 ± 34.38	72.22 ± 30.79	65.09 ± 32.87

Detektovanje S100A4-pozitivnih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva

Za identifikaciju aktiviranih fibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva koristili smo anti-S100A4 antitelo.

S100A4 je kalcijum vezujući protein čija se ekspresija povezuje sa nastankom metastaza u različitim tumorima. S100A4 je lokalizovan u nukleusu, citoplazmi i ekstracelularnom matriksu i ima brojne biološke funkcije: reguliše angiogenezu, pokretljivost i invazivnost ćelija. Ranije se smatralo da je ekspresija S100A4 ograničena na fibroblaste, ali se danas zna je eksprimiran i u monocitima i makrofazima, limfocitima i endotelnim ćelijama (136, 137).

U lamini propriji sluznice debelog creva kako zdravih ispitanika tako i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, uočavaju se brojne, krupne S100A4-pozitivne ćelije (Slika 27). Neke od S100A4-pozitivnih ćelija po morfologiji jasno odgovaraju fibroblastima: vretenaste, krupne ćelije, svetlog izduženog jedra. Veliki broj S100A4-pozitivnih ćelija odgovara makrofazima: uočavaju se kao krupne, okrugle ćelije, najgušće raspoređene u subepitelnom regionu. Unutar epitela uočavaju se okrugle snažno S100A4-pozitivne ćelije koje po morfologiji i lokalizaciji odgovaraju intraepitelnim limfocitima (Slika 27).



Slika 27. Imunohistohemijsko bojenje antitelom na S100A4. Sluznica debelog creva zdravih ispitanika (A) i na udaljenosti 20 cm od tumora (B). Uočavaju se brojne S100A4-pozitivne ćelije, naročito gusto raspoređene subepitelno. Strelice pokazuju pojedine S100A4-pozitivne ćelije (F-fibroblasti, M-makrogazi, IL-intraepitelni limfociti); x200

Na uveličanju x200 u programu *Fiji* meren je broj S100A4-pozitivnih ćelija u celoj lamini propriji sluznice debelog creva na isečku.

Nije izmerena razlika u broju S100A4-pozitivnih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 62).

Tabela 62. Broj S100A4-pozitivnih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci	Žene
Broj S100A4-pozitivnih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	92.22 ± 26.37	89.91 ± 27.41

Nije izmerena razlika u broju S100A4-pozitivnih ćelija u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika (Tabela 63).

Tabela 63. Broj S100A4-pozitivnih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

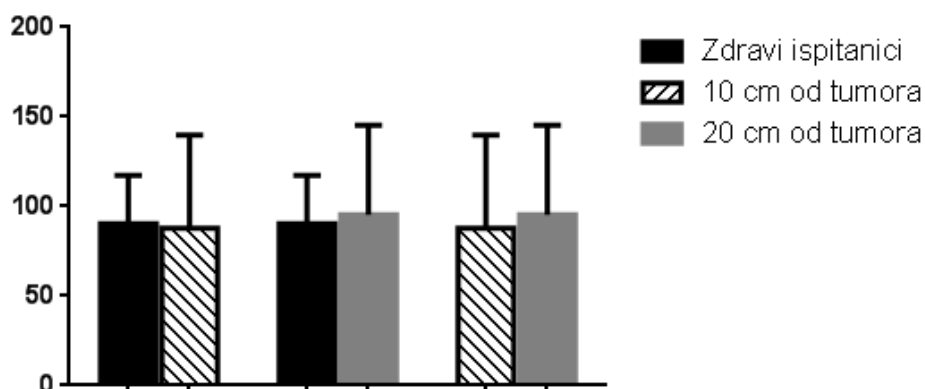
Zdravi ispitanici	Rektum	sigmoideum	Ascendens
Broj S100A4-pozitivnih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	91.14 ± 26.73	90.31 ± 27.64	89.76 ± 26.93

Nije izmerena razlika u broju S100A4-pozitivnih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabela 64, Grafikon 23).

Tabela 64. Broj S100A4-pozitivnih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Broj S100A4-pozitivnih ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva	90.32 ± 26.89	87.78 ± 51.97	95.24 ± 50.17

Broj S100A4-pozitivnih celija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva



Grafikon 23. Broj S100A4-pozitivnih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Analiziran je broj S100A4-pozitivnih ćelija po regionima lamine proprije sluznice debelog creva (subepitelno, u predelu tela kripte i uz laminu muskularis mukoze) na uveličanju x400.

Nije izmerena razlika u broju S100A4-pozitivnih ćelija po regionima lamine proprije sluznice debelog creva između zdravih ispitanika i ispitanika sa adenokarcinomom debelog creva (Tabela 65).

Tabela 65. Broj S100A4-pozitivnih ćelija na 0.1 mm² lamine proprije različitih regiona sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Broj S100A4-pozitivnih ćelija na 0.1 mm ² lamine proprije sluznice debelog creva	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Subepitelno	149.16 ± 42.50	147.02 ± 49.92	159.62 ± 45.23
Između kripti	136.32 ± 36.27	125.21 ± 44.05	125.19 ± 68.43
Uz laminu muskularis mukoze	80.21 ± 34.38	75.85 ± 38.28	73.50 ± 44.23

Detektovanje miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva

Za identifikaciju miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva koristili smo antitelo na glatko-mišićni alfa-aktin (α SMA). U lamini propriji sluznice debelog creva α SMA ekspimiraju i perivaskularni periciti ali su miofibroblasti daleko brojniji i lako se identifikuju na osnovu specifične morfologije i pozicije.

Miofibroblasti debelog creva su vretenaste ćelije, nalik glatkim mišićnim ćelijama, predominantno lokalizovane oko kripti i ispod površnog epitela. Iako su najrasprostranjeniji perikriptalno, formiraju sincicijum kroz celu laminu propriju. U predelu baza kripti miofibroblasti su ovalnog ili čunastog oblika, dok u gornjim delovima kripti mestimično poprimaju stelatnu morfologiju. U direktnom su kontaktu sa mišićnim ćelijama lamine muskularis mukoze i pericitima.

U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika miofibroblasti obrazuju kontinuirani perikriptalni omotač (Slika 28A).

Nema razlike u procentualnoj zastupljenosti miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena (Tabela 66).

Tabela 66. Procentualna zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih muškaraca i žena

Zdravi ispitanici	Muškarci (medijana i interkvartalni opseg od 25-75. percentila)	Žene (medijana i interkvartalni opseg od 25-75. percentila)
Zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	8.49 (6.61-10.61)	9.78 (7.87-11.4)

Nema razlike u procentualnoj zastupljenosti miofibroblasta u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih osoba (Tabela 67).

Tabela 67. Procentualna zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji različitih delova sluznice debelog creva (rektum, sigmoideum, ascendens) zdravih ispitanika

Zdravi ispitanici	Rektum (medijana i interkvartalni opseg od 25-75. percentila)	Sigmoideum (medijana i interkvartalni opseg od 25-75. percentila)	Ascendens (medijana i interkvartalni opseg od 25-75. percentila)
Zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva (%)	7.82 (5.88-10.27)	9.09 (7.75-11.12)	9.14 (5.72-12.06)

U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, miofibroblasti se i dalje jasno uočavaju, međutim, perikriptalni omotač koji obrazuju je diskontinuiran (Slika 28B).

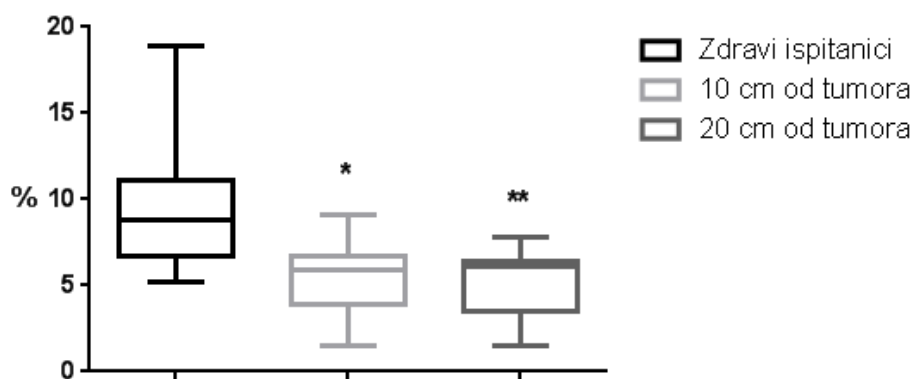
Morfometrijske analize potvrđuju naša zapažanja. Postoji smanjena procentualna zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika ($p < 0.01$) (Tabela 68, Grafikon 24).

Tabela 68. Procentualna zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

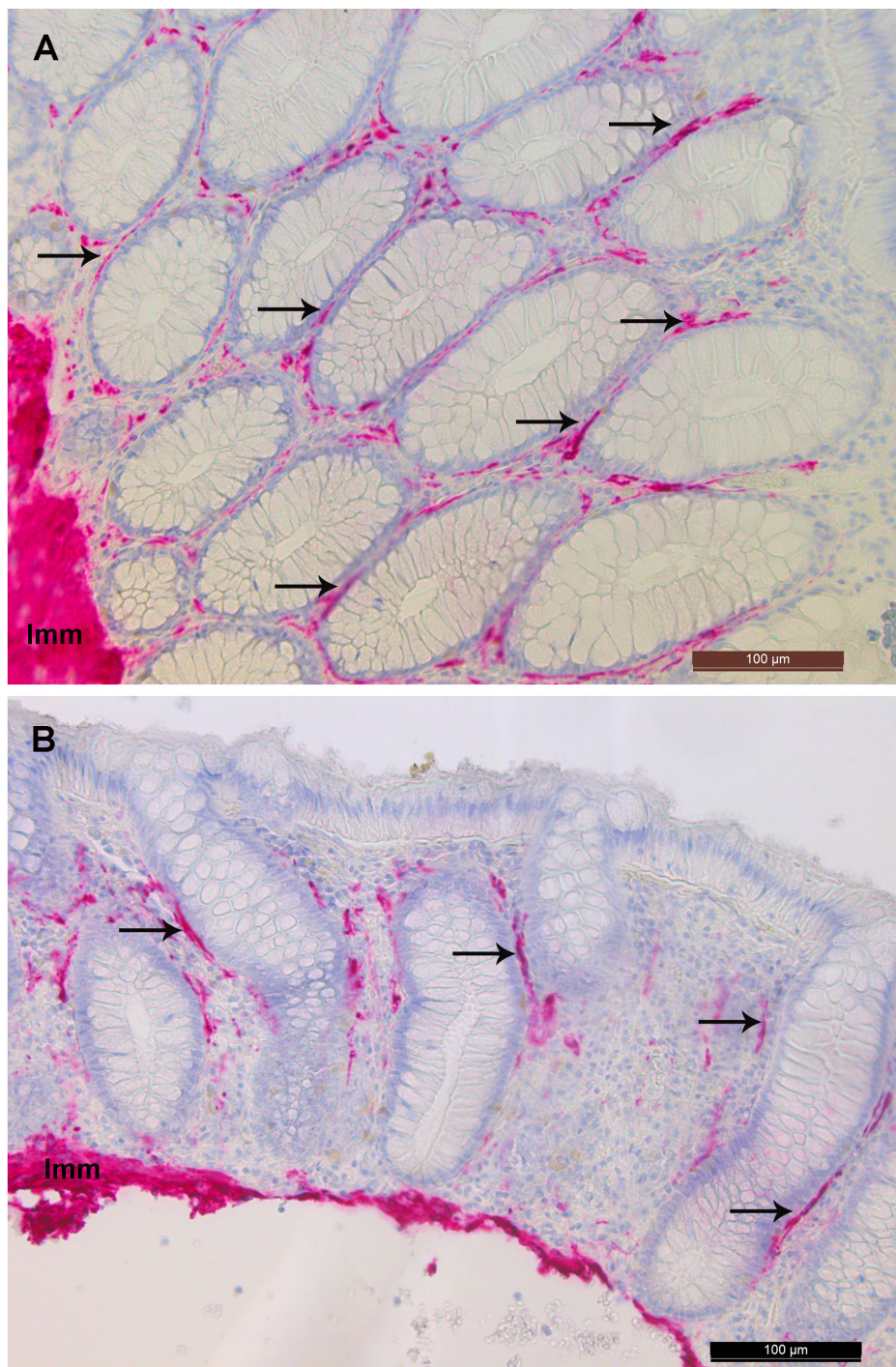
	Zdravi ispitanici (medijana i interkvartalni opseg od 25-75. percentila)	10 cm od tumora (medijana i interkvartalni opseg od 25-75. percentila)	20 cm od tumora (medijana i interkvartalni opseg od 25-75. percentila)
Zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji debelog creva (%)	8.78 (6.72-11.07)	5.86 (3.9-9.1)*	6.06 (3.53-7.76)**

* Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; ** Kontrole-20 cm od tumora, $p < 0.01$;

Procentualna zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva



Grafikon 24. Procentualna zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora; * Kontrole-10 cm od tumora, $p < 0.01$; ** Kontrole-20 cm od tumora, $p < 0.01$



Slika 28. Imunohistohemijsko bojenje antitelima na α SMA. U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika miofibroblasti su raspoređeni u vidu kontinuiranog perikriptalnog omotača (A). U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm od tumora perikriptalni omotač koji grade miofibroblasti postaje diskontinuiran (B). Strelicama su obeleženi perikriptalni miofibroblasti; Imm-lamina muscularis mucosae; x200

Merili smo zastupljenost miofibroblasta u određenim regionima lamine proprije sluznice debelog creva: Uz laminu muskularis mukoze postoji statistički značajno manja zastupljenost miofibroblasta 10 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom zdravih ispitanika ($p < 0.01$). Takođe, zastupljenost miofibroblasta je statistički značajno manja na udaljenosti 10 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva na udaljenosti 20 cm od tumora ($p < 0.05$). U lamini propriji između kriпти postoji statistički značajno smanjenje zastupljenosti miofibroblasta 10 cm od tumora u poređenju sa zdravim ispitanicima ($p < 0.01$) i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika ($p < 0.05$). U subepitelnom regionu lamine proprije nema statistički značajne razlike u zastupljenosti miofibroblasta 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabela 69).

Tabela 69. Procentualna zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji različitih regiona sluznice debelog creva zdravih ispitanika, kao i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora

Zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji debelog creva (%)	Zdravi ispitanici	10 cm od tumora	20 cm od tumora
Subepitelno	9.4 (6.53-11.34)	7.82 (4.5-10.94)	5.56 (3.28-11.14)
Između kriпти	12.41(8.45-16.78)	8.63 (5.27-11.56)*	8.74 (6.16-12.99)**
Uz laminu muskularis mukoze	13.15 (11.12-16.6)	5.87 (3.77-8.71)*	7.54 (5.89-19.03) ⁺

*Zdravi ispitanici-10 cm od tumora, $p < 0.01$; **Zdravi ispitanici-20 cm od tumora, $p < 0.05$; ⁺10 cm od tumora-20 cm od tumora, $p < 0.05$

5. Diskusija

Naš rad je prvi koji je pokazao postojanje strukturnih i celularnih promena sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa sluznicom uzetom sa iste lokacije, ispitanika bez tumora.

Pokazali smo da u sluznici debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora postoje promene i u epitelu i u lamini proprprijji.

U epitelu sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovali smo 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. Izmereno povećanje visine peharastih ćelija sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, takođe do sada nije bilo opisano, ali je registrovano u prelaznoj sluznici debelog creva (138). Pojam "prelazna sluznica" najčešće se odnosi na sluznicu udaljenu do 2 cm od ivice tumora (105). Prelazna sluznica je bila predmet brojnih istraživanja i poznato je da u njoj postoje genetske (106), epigenetske (107, 108) i biohemijske promene (109) po kojima ova sluznica podseća na tumor.

Nakon morfometrijske analize, rađena je fraktalna i teksturalna analiza jedara epitelnih ćelija sluznice debelog creva, kao potencijalna metoda kvantifikacije kompleksnosti (139, 140). Merena su dva parametra fraktalne analize (fraktalna dimenzija i lakunarnost) i pet parametara teksturalne analize (drugi angularni momenat, korelacija, inverzni momenat razlike, entropija i varijansa).

Naši rezultati pokazuju da postoji promena oba merena parametra fraktalne analize jedara epitelnih ćelija debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa jedrima epitelnih ćelija ispitanika bez tumora.

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora detektovano je statistički značajno smanjenje fraktalne dimenzije jedara epitelnih ćelija u poređenju sa jedrima zdravih ispitanika. Takođe, detektovano je statistički značajno smanjenje lakunarnosti jedara udaljenih 10

cm od tumora, u poređenju sa jedrima udaljenim 20 cm od tumora i jedrima zdravih ispitanika. Promene u oba parametra govore u prilog promeni u rasporedu u odnosu euhromatina i hetrohromatina u jedrima epitelnih ćelija. Predpostavlja se da kod osoba sa tumorom dolazi do promene u ekspresiji gena i u udaljenim epitelnim ćelijama (141). Promena ekspresije gena praćena je promenom u strukturi hromatina u jedrima epitelnih ćelija. Promene su naročito izražene u predelu dna Liberkinovih kripti, gde se nalaze matične ćelije debelog creva.

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovana je promena u svim merenim parametrima teksturalne analize jedara epitelnih ćelija u poređenju sa jedrima ispitanika bez tumora.

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovano je statistički značajno povećanje angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike i varijanse. Takođe, na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovano je statistički značajno smanjenje vrednosti korelacije i entropije, u poređenju sa zdravim ispitanicima.

Iako su detektovane promene u merenim parametrima fraktalne i teksturalne analize jedara epitelnih ćelija 10 cm i 20 cm od tumora, smer promena varira, i govori u prilog većoj homogenosti jedara na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa kontrolama. Ni jedan parametar, sam, nije dovoljan za pouzdanu diskriminaciju između jedra epitelnih ćelija pacijenta sa i bez tumora. Predpostavljamo da bi kombinacija merenih parametara mogla imati veću diskriminativnu vrednost.

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora detektovana je promena u sintezi sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama epitela debelog creva: povećan broj sijalomucin-pozitivnih ćelija u površnom epitelu i gornjim delovima Liberkinovih kripti i smanjen broj sulfomucin-pozitivnih ćelija.

Poznato da je da se opisane promene uočavaju u karcinomu debelog creva i prelaznoj sluznici (112).

Prelazna sluznica (udaljena do 2 cm od tumora) nije zahvaćena tumorom, i zato je nama naročito zanimljiva. Već je pomenuto da u njoj postoje različite promene, po kojima ova sluznica podseća na tumor. Dobro je poznato da ćelije tokom maligne transformacije ponovo počinju da sintetišu fetalne antigene, proteine i glikoproteine koji nisu prisutni u adultnim tkivima. Smatra se da do toga dolazi usled gubitka funkcije tumor

supresorskih gena i regresije ćelija u slabije diferencirane ćelije, nalik embrionalnim (112, 142).

Ranije opisana promena u odnosu sulfomucina i sijalomucina u prelaznoj sluznici, i ista promena koju smo mi prvi put opisali 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 (112, 143). Dakle, navedena promena može predstavljati dediferencijaciju peharastih ćelija u nezrele peharaste ćelije, što je jedna od karakteristika ranih stadijuma karcinogeneze.

Grupa autora je navedene promene u sintezi mucina u crevima opisala i u ulceroznom kolitisu i Kronovoj bolesti, i zato smatra da ne predstavljaju predispoziciju za nastanak tumora, već regenerativne promene sluznice (144). Promene su bile izraženije u ulceroznom kolitisu. Sa druge strane, kod ovih pacijenata postoji povećan rizik za nastanak karcinoma debelog creva (145). Takođe, čak i da promene u prelaznoj sluznici odražavaju regenerativne promene, malo je verovatno da bi to moglo da se odnosi na sluznicu na većoj udaljenosti od tumora.

Nedavno je pokazano da sadržaj sulfomucina i sijalomucina u crevima utiče na kompoziciju mikrobiote u crevima. Na primer, redukcija sulfomucina je povezana sa smanjenim sadržajem određenih sojeva sulfat-redukujućih bakterija (146, 147). Danas se velika pažnja poklanja proučavanju veze između mikrobiote i karcinoma debelog creva. Smatra se da kompozicija mikrobiote u crevima igra značajan ulogu u inicijaciji i progresiji kolorektalnog karcinoma (148, 149). Dakle, ne smemo isključiti potencijalnu ulogu mikrobiote u crevima, u promeni odnosa sulfomucina i sijalomucina.

Pokazano je da tumorske ćelije mogu biti obložene sijaličnom kiselinom; omotač od sijalične kiseline "sakriva" tumorske antigene i štiti tumorske ćelije od ćelija imunskog sistema (150, 151).

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovan je statistički značajno veći ukupan broj Ki67-pozitivnih ćelija, u poređenju sa zdravim ispitanicima. Posmatrano po regionima, pokazano je da postoji statistički značajno veći broj Ki67-pozitivnih ćelija u srednjoj i gornjoj trećini Liberkinovih kriпти. Dakle, povećan je broj ćelija koje proliferišu i narušena je fina kompartmentalizacija Liberkinovih kriпти.

Osim u samom karcinomu debelog creva, povećan broj Ki67-pozitivnih ćelija detektovan je i u prelaznoj sluznici (152, 153). Smatra se da je jedan od uzroka povećane proliferacije epitelnih ćelija u prelaznoj sluznici parakrini efekat tumorskih ćelija koje sekretuju EGF (*epidermal growth factor*), EGF-R i TGF- α (154, 155, 156). Pokazana je veza između sekrecije TGF- α od strane tumorskih ćelija i Ki67-indeksa unutar tumora i u prelaznoj sluznici (152). Tumorske ćelije i tumor-asocirani makrofazi stvaraju povećane količine IL-15 (152). IL-15 je faktor rasta intestinalnih epitelnih ćelija (157). Produkcija IL-15 od strane tumorskih ćelija i makrofaga tumora pozitivno korelira sa Ki67-indeksom u prelaznoj sluznici (158).

Sa druge strane, hiperproliferacija i poremećaj distribucije proliferišućih ćelija u naizgled zdravoj sluznici opisani su i kod pacijenata sa velikim sporadičnim adenomima u debelom crevu (159, 160, 161). Prisustvo hiperproliferacije kod ovih pacijenata, govori u prilog *field carcinogenesis* teoriji - da dugotrajno izlaganje karcinogenima dovodi do difuznih promena u naizgled zdravoj sluznici debelog creva i da navedene promene predstavljaju predispoziciju za nastanak karcinoma (159, 160).

Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima *Luigi B* i saradnika (160) koji su analizirali proliferaciju epitelnih ćelija zdravih ispitanika, ispitanika sa adenomatoznim polipima, sa adenokarcinomom debelog creva i proliferaciju u naizgled zdravoj sluznici udaljenoj od tumora.

Slične rezultate (hiperproliferacija uz pomeranje proliferišućih ćelija u više delove Liberkinovih kripti) na udaljenosti 10 cm od tumora, pokazali su *Hanna Moris* i saradnici (162) koristeći MCM2 (*Minichromosome maintenance protein 2*) kao marker proliferacije.

Naš rad, zajedno sa predhodno objavljenim radovima, pokazuje da postoji hiperproliferacija i pomeranje proliferišućih ćelija u gornje delove Liberkinovih kripti, u naizgled zdravoj sluznici, udaljenoj od tumora. Takođe, ukazuje na potrebu da se kod ispitivanja proliferacije u debelom crevu, kao kontrola koriste zdravi ispitanici a ne sluznica udaljena 10 cm ili više od malignog tumora.

Pored promena na epitelnim ćelijama, pokazali smo da na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora postoje strukturne i celularne promene lamine proprije sluznice debelog creva.

Tumori se više ne posmatraju samo sa stanovišta mutiranih epitelnih ćelija, već se smatraju složenim heterocelularnim sistemima čiji se nastanak i progresija odvijaju isključivo kroz brojne i multidirekzione interakcije između epitelnih ćelija i ćelijskih i strukturnih elemenata strome (84).

Nedvosmisleno je pokazano da postoje uzajamne interakcije između tumorskih ćelija adenokarcinoma debelog creva i elemenata vezivnog tkiva lamina proprije u kom se tumor razvija (86).

U lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovali smo promene u zastupljenosti krvnih i limfnih sudova, komponenata ekstracelularnog matriksa i miofibroblasta.

Na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, detektovali smo povećan broj kako ukupnih (CD34-pozitivnih) tako i novo-formiranih (CD105-pozitivnih) kapilara i malih krvnih sudova.

Na modelu pacova tretiranih azoksimetanom (AOM) primenom različitih metoda optičke spektroskopije, pokazano je da je prokrvljenost nezahvaćene sluznice debelog creva u okolini tumora povećana nekoliko puta, u poređenju sa sluznicom iste lokacije kod netretiranih pacova. Autori su ovaj fenomen nazvali ranim povećanjem mikrovaskularnog dotoka krvi (early increase in microvascular blood supply, EIBS) (109, 163).

EIBS je detektovan u sluznici rektuma kod pacijenta sa adenomom na drugom mestu u kolonu. EIBS nije detektovan u sluznici rektuma kod pacijenata sa divertikulozom, hiperplastičnim polipima i hemoroidima (109).

EIBS je karakterističan za "*Field carcinogenesis*" koncept i primarno je ograničen na sluznicu i male krvne sudove-arteriole i kapilare. EIBS se smatra formom neoangiogeneze i najizraženiji je u predelu baza kripti (109).

Etiologija EIBS-a nije razjašnjena do kraja. Jedna od teorija je da je sluznica izmenjenog "polja" hiperproliferativna i da postoji prelazak epitelnih i stromalnih ćelija sa aerobnog na aneorobni metabolizam, tzv Warburgov efekat (*Warburg effect*) (109, 163). Hipoksija indukuje neoangiogenezu preko niza faktora, od kojih je naročito važan hipoksijom indukovani faktor 1 (*hypoxia-inducible factor 1*). Pokazana je povećana

ekspresija *HIF1- α* u nezahvaćenoj sluznici debelog creva i kod ljudi i kod miševa. U istom radu, pokazano je da dolazi da povećane ekspresija gena koje indukuje *HIF1- α* , a koji su uključeni u anerobnu glikolizu (*GLUT2*, *PKMA*, *LDH*) (164).

HIF1- α indukuje i sintezu VEGF-A i matriks metaloproteinaza (MMPs). Važan izvor VEGF-A su i tumorske i sromalne ćelije, uključujući makrofage i miofibroblaste. VEGF-A je jedan od najznačajnijih faktora rasta uključenih u formiranje i funkciju novih krvnih sudova: reguliše proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija i mobilise prekursore endotelnih ćelija iz kostne srži u novoformirane krvne sudove. Jedan od markera prekursora endotelnih ćelija je endoglin, CD105, koji smo koristili u radu. Matriks metaloproteinaze deluju dvojako: razgradnjom ekstracelularnog matriksa oslobađaju vezani VEGF-A i remodeluju novoformirane krvne sudove (165).

To što je EIBS, kao i u našem radu, naročito izražen u predelu baza kripti, može se objasniti najintezivnijom proliferacijom ćelija, upravo u ovom odeljku. U predelu baze kripti nalaze se matične ćelije debelog creva. Prve promene u prelaznoj mukozi, u smislu povećane proliferacije ćelija, opisane se upravo u ovom odeljku (105).

Dakle, povećanje broja postojećih (CD34-pozitivnih) i novih krvnih sudova (CD105-pozitivnih) dešava se veoma rano u procesu transformacije sluznice debelog creva, bilo pod uticajem faktora koje sekretuje tumor, bilo u sklopu "*field carcinogenesis*" fenomena, kao promena koja stvara predispoziciju za nastanak tumora.

U lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika limfni sudovi nisu razvijeni. U samoj lamini muskularis mukoze i neposredno uz nju prisutna je bogata mreža limfnih sudova.

Dobro je poznato da je prisustvo metastaza u limfnim čvorovima važan prognostički faktor kod adenokarcinoma debelog creva. Međutim, tačan mehanizam nastanka metastaza nije do kraja rasvetljen. U nastanak metastaza uključene su složene interakcije tumorskih ćelija, mikrosredine tumora i okolnog tkiva. Invazija limfnih sudova je preduslov za nastanak metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (166, 167). Međutim, povezanost gustine limfnih sudova unutar tumora i nastanka metastaza je kontroverzna. Veliki broj autora smatra da je povećana gustina limfnih sudova unutar samog tumora (pre svega na periferiji tumora, pošto su limfni sudovi u centralnim delovima tumora često nefunkcionalni) povezana sa većom učestalošću metastaza u

limfnim čvorovima i lošijom prognozom kod brojnih tumora, uključujući adenokarcinom debelog creva (168, 169, 170).

S obzirom na odustvo limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva, smatralo se da se metastaze u regionalnim limfnim čvorovima mogu javiti tek kada tumor invadira laminu muskularis mukoze. Međutim, metastaze u regionalnim limfnim čvorovima zapažene su (u malom procentu) i kod pacijenata sa tumorom ograničenim na laminu propriju sluznice debelog creva. Dužim praćenjem pacijenata, pokazano je da su metastaze u regionalnim limfnim čvorovima češće kod pacijenata sa adenokarcinomom debelog creva koji zahvata laminu propriju u poređenju sa *in situ* tumorom (171, 172). Navedena zapažanja podstakla su na dodatna istraživanja koja su potvrdila da se i u lamini propriji sluznice debelog creva mogu detektovati limfni sudovi u određenim patološkim stanjima kao što su postojanje tumora i inflamacija (171).

Povećana gustina limfnih sudova zapaža se ne samo u područjima inflamacije i u tumoru, već i u nezahvaćenoj sluznici pacijenata sa inflamatornim bolestima creva i u prelaznoj sluznici, oko tumora (171).

U našem istraživanju, u nezahvaćenoj lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, zapažaju se dobro razvijeni limfni sudovi, neposredno iznad lamine muskularis mukoze. Takođe, duž cele lamina proprije sluznice debelog creva, na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, mogu se videti pojedinačne ili ređe, prisutne u manjim grupama, D2-40 pozitivne ćelije.

Lokalizacija limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva, neposredno uz laminu muskularis mukoze, sugeriše da se ne radi o *de novo* limfangiogenezi, nego da limfni sudovi nastaju od već postojećih limfnih sudova lamine muskularis mukoze.

U naše istraživanje nisu bili uključeni pacijenti sa inflamatornim bolestima creva, kao ni pacijenti sa karcinomom debelog creva koji je nastao u sluznici zahvaćenoj kolitisom (*colitis-associated cancer*, CAC). Pojava limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva, udaljenoj od tumora, ne može se, dakle, pripisati inflamaciji (171, 173).

Brojni faktori su uključeni u limfangiogenezu i proliferaciju i diferencijaciju limfnih edotelnih ćelija. Najznačajniji su VEGF-C i VEGF-D koji deluju putem VEGFR-3 receptora. U manjoj meri limfangiogenezu stimulišu VEGF-A, FGF2, IGF2, HGF i PDGF-BB (174, 175).

VEGF-C i VEGF-D mogu sekretovati same tumorske ćelije, ali i stromalne ćelije tumora, pre svega makrofazi. Tumorske ćelije takođe sekretuju TNF α i IL-6 koji povećavaju ekspresiju faktora koji stimulišu limfangiogenezu (175).

Jedan od mogućih mehanizama limfangiogeneze u udaljenoj lamini propriji sluznice debelog creva mogla bi biti sekrecija navedenih faktora, od strane tumorskih ćelija ili tumorom-aktiviranih ćelija strome. Zapaženo je da tumor indukuje limfangiogenezu u regionalnim limfnim čvorovima, čak i pre pojave metastaza (175). Takođe je pokazano da tumor regrutuje prekursore limfnih endotelnih ćelija iz kostne srži u novoformirane limfne sudove (165).

Drugi mogući mehanizam (pri čemu se navedeni mehanizmi međusobno ne isključuju) je indukcija limfangiogeneze hipoksijom koja postoji u sluznici "polja". Hipoksija indukuje proliferaciju i migraciju limfnih endotelnih ćelija. Brojni faktori su uključeni u indukciju limfangiogeneze hipoksijom. Jedan od najvažnijih je, već pomenuti, HIF-1 α , glavni transkripcioni faktor odgovoran za adaptaciju ćelija na hipoksiju. HIF-1 α , pored ostalog, indukuje ekspresiju VEGF-C i VEGF-D (167).

Zatim smo posmatrali komponente ECM (vlakna i osnovnu supstancu). Pokazali smo da na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora debelog creva postoji smanjena zastupljenost svih posmatranih komponenata ECM (kolagenih i retikularnih vlakana, periostina i hijaluronske kiseline) i povećanje prostora u lamini propriji sluznice debelog creva između komponenata ECM.

Dugo vremena ECM se smatrao inertnim substratom, trodimenzionalnom potkom koja "popunjava" prostor između ćelija i obezbeđuje podlogu za njihov rast i migraciju. Danas se zna da je ECM veoma kompleksna i dinamična struktura, čije promene prate tok i utiču na progresiju brojnih hroničnih bolesti, uključujući tumore (69, 85, 86).

Biohemijska svojstva komponenata ECM utiču na adheziju, morfologiju i migraciju ćelija (176), a biofizička i biomehanička svojstva regulišu zapreminu tečnosti u tkivima (56).

Detektovali smo promenu 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 NLM. Na isečcima sluznice debelog creva bojenim histohemijski, pokazali smo da su kolagena i retikularna vlakna

istanjena i da grade nepravilne snopove kroz laminu propriju sluznice debelog creva. Primenom softvera za analizu slike pokazali smo da postoji smanjena zastupljenost kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora. Kada se kolagena vlakna posmatraju u nefiksiranom i neobojenom tkivu koristeći NLM sa sposobnošću detekcije drugog harmonika, istanjena i neuređena kolagena vlakana se još jasnije uočavaju. Neuređenost kolagenih vlaknana kvatifikovali smo koeficijentom anizotropije β koji je statistički značajno manji 10 cm i 20 cm od tumora (što govori u prilog neuređenosti) u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika. Između vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva uočavaju se veliki "prazni" prostori, koji su CD34⁺/CD105⁻/podoplanin⁻. Pokazali smo da su "prostori" između kolagenih i retukularnih vlakana statistički značajno veći na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa zdravim ispitanicima.

Promene kolagenih i retikularnih vlakana (pri čemu su retikularna vlakna poseban tip kolagenih vlakana) su važna karakteristika 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 (176, 177). U remodelovanju kolagenih vlakana u samom tumoru učestvuju tumorske ćelije, aktivirani fibroblasti i miofibroblasti i inflamatorne ćelije (pre svega, makrofazi). Iako sve navedene ćelije, u većoj ili manjoj meri, učestvuju u remodelovanju kolagenih vlakana prilikom progresije tumora, što sam proces čini veoma kompleksim, najvažniji su miofibroblasti i fibroblasti (69, 176).

Interakcije između tumora i kolagenih vlakana unutar rastućeg tumora i u neposrednoj okolini su veoma složene i dinamične.

Unutar tumora, u neposrednoj okolini ali i na udaljenim, premetastatskim područjima odigrava se konstantno remodelovanje kolagenih vlakana u zavisnosti od stadijuma u kom se tumor nalazi. Promene u zastupljenosti i organizaciji kolagenih vlakana doprinose stvaranju mikrosredine koja pogoduje progresiji tumora preko uticaja na migraciju i polarizaciju ćelija (70, 71).

Najvažnije biofizičke karakteristike kolagenih vlakana koje utiču na migraciju i polarizaciju ćelija su: sastav, gustina, orijentacija i poroznost (70).

Kao što je rečeno, postoje dva glavna načina migracije ćelija kroz ECM: proteolitička i neproteolitička migracija (70), a glavni parametri koji utiču na tip migracije ćelija su poroznost i sposobnost ćelija i kolagenih vlakana da se deformišu.

Tumorske ćelije se teže deformišu u poređenju sa zdravim ćelijama i zato su veoma zavisne od proteolitičke razgradnje kolagenih vlakana. Tumorske ćelije mogu same stvarati enzime koji razgrađuju kolagen ili putem TGF- β i brojnih faktora rasta, aktivirati stromalne ćelije, pre svega miofibroblaste (70, 178).

Najznačajnija grupa enzima uključenih u proces razgradnje kolagena su matriks metaloproteinaze (MMPs) (179, 180).

MMP stimulišu migraciju tumorskih ćelija na više načina: pokazano je da ćelije karcinoma pluća koje ekspimiraju MMP9, na primer, imaju izraženu sposobnost migracije. MMP9 poreklom od tumorskih ćelija, stimuliše transdiferencijaciju lokalnih fibroblasta u miofibroblaste, koji dalje produkuju MMP9 (181). Pokazana je veća učestalost metastaza u jetri kod pacijenata sa karcinomom debelog creva gde tumorske i stromalne ćelije snažno ekspimiraju MMP2 (182) i MMP13 (183).

MT-MMP su najvažnije za migraciju kroz matriks bogat kolagenom, ne samo za tumorske ćelije, već i za migraciju endotelnih ćelija i fibroblasta i miofibroblasta (180). Smatra se da MT-MMP ostvaruju ove efekte razgradnjom kolagena u zidu krvnih sudova, razgradnjom kolagena u lamini proprijii, stvaranjem pora u ECM i aktivacijom fibroblasta u miofibroblasta (180, 181).

Aktivirani fibroblasti i miofibroblasti na invazivnom frontu tumora intezivno stvaraju izmenjen, "nezreli" ECM, tako zvani "neomatriks". "Neomatriks" nije okarakterisan do kraja, ali je poznato da sadrži povećane prostore, "pore" između komponenata, koje olakšavaju migraciju i tumorskih i stromalnih ćelija (89, 180). Dodatno, povećana propustljivost starih i novoformiranih krvnih sudova, neadekvatana limfna drenaža i pritisak koji stvara rastući tumor, dovode do stvaranje peritumorskog edema, koji dodatno isteže komponente ECM i širi pore između njih (180, 184).

Prostori između kolagenih vlakana, "pore", značajno utiču na migraciju ćelija. Naime, na različitim modelima, pokazano je da su u ECM 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 (176).

Pojava povećanih "pora" zapaža se na invazivnom frontu brojnih tumora. Takođe, pojava pora zapaža se i u prelaznoj sluznici oko karcinoma dojke (185). Remodelovanje ECM i pojava poroznog matriksa zapažaju se i u premetastatskim nišama, čak i pre nastanka tumora.

Naš rad je prvi koji opisuje povećanje "pora" između kolagenih i retikularnih vlakana u lamini propiji sluznice debelog creva ispitanika sa tumorom, na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora.

Pokazali smo da postoji smanjena zastupljenost periostina praćena povećanim prostorima ("porama") između molekula periostina u lamini propiji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa laminom proprijom sluznice debelog creva zdravih ispitanika.

Periostin je specifičan matricelularni protein koji je naročito zastupljen u tkivima bogatim kolagenom, kao što su periodontalni ligament, fascije skeletnih mišića i srčani zalisci. Količina periostina se povećava prilikom izlaganja tkiva mehaničkom stresu i u inflamaciji (64, 65).

U zdravom debelom crevu, periostin je eksprimiran u vidu mreže kroz laminu propiju i neposredno oko kripte, uz perikriptalne miofibroblaste. Pokazano je da su perikriptalni miofibroblasti glavni izvor periostina u lamini propiji sluznice debelog creva (66). Perikriptalni miofibroblasti igraju važnu ulogu u diferencijaciji epitelnih ćelija debelog creva, kako tokom fetalnog tako i tokom adultnog perioda. Perikriptalni miofibroblasti komuniciraju sa epitelnim ćelijama kolona parakrinom sekrecijom različitih molekula (od kojih su najvažniji TGF- β i IL-6) kroz pore na bazalnoj membrani (31, 66, 186). Sekrecijom periostina, perikriptalni miofibroblasti mogu uticati na proliferaciju i diferencijaciju epitelnih ćelija. Periostin svoje dejstvo ostvaruje vezujući se za receptore, α v-integrine: α v β 3, α v β 5 i α 6 β 4. Glavni mehanizam je aktivacija PI3K/Akt i/ili Wnt/ β -katenin signalnih puteva (187, 188). Sekretovani periostin ima i autokrino dejstvo na same miofibroblaste i stimuliše njihov rast, proliferaciju i migraciju. Periostin interaguje sa drugim komponentama ekstracelularnog matriksa, uključujući kolagen: periostin regrutuje BMP-1 koji aktivira LOX, enzim koji unakrsno povezuje kolagena vlakna; periostin indukuje ekspresiju MMP-9 (189), MMP-10 (190) i MMP-13 (191) koje vrše razgradnju kolagenih vlakana. Sekreciju periostina indukuju TGF- β ,

BMP-2 (*bone morphologic protein-2*), IL-4 i IL-13 poreklom iz mezenhimalnih ćelija (pre svega, perikriptalnih fibroblasta) (189).

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 (192, 193). Svi istraživači se slažu da su glavni izvor periostina u tumoru CAFs (*carcinoma associated fibroblast*) (66, 193). CAFs snažno ekspimiraju α SMA i smatraju se miofibroblastima. Tumorske ćelije ne ekspimiraju periostin ili ga ekspimiraju u manjoj meri. Ekspresija periostina u tumorskim ćelijama ne korelira ni sa jednim prognostičkim parametrom. U različitim istraživanjima na velikom broju uzoraka, pokazano je da je periostin snažno ekspimiran u stromalnim ćelijama u oko 30% karcinoma debelog creva (193). Snažna ekspresija periostina u stromalnim ćelijama unutar samog karcinoma debelog creva povezuje se sa lošom prognozom: infiltrativnim rastom tumora, uznapredovalijim TNM stadijumom, prisustvom nekroze u lumenu i smanjenim petogodišnjim preživljavanjem (192, 193, 194). Smatra se da periostin stimuliše preživljavanje, rast, invazivnost i nastanak metastaza u već unzapredovalim tumorima debelog creva. Glavni mehanizam kojim periostin stimuliše progresiju tumora je aktivacija već pomenutih signalnih puteva: PI3K/Akt i Wnt/ β -katenin (192, 195).

Smatra se da je periostin važan u nastanku metastaza karcinoma debelog creva. Učestalost metastaza u jetri je veća kod pacijenata sa snažnom stromalnom ekspresijom periostina u primarnom tumoru (192, 196).

Proces nastanka metastaza je složen i sastoji se iz više faza, od kojih svaka mora biti uspešno završena da bi nastale metastaze u udaljenim organima. Tumorske ćelije moraju da savladaju različite tipove stresa: gubitak adhezije, hipoksiju, nedostatak hranjivih materija i akumulaciju štetnih produkata metabolizma (195, 197). Zato je proces nastanka metastaza relativno neefikasan. Prve faze hematogene diseminacije tumora (gubitak adhezije, ulazak u krvni sud i ekstravazacija u metastatske organe) odvijaju se rano i veoma uspešno. Međutim, samo vrlo mali broj tumorskih ćelija uspeva da formira mikrometastaze u udaljenim organima, a još daleko manji broj uspeva da pređe u makroskopski vidljive metastaze. Dva procesa su kritična u progresiji mikrometastaza u makroskopski vidljive: inicijacija angiogeneze i prevencija apoptoze tumorskih ćelija (197, 198, 199).

Pokazano je da periostin ne utiče na formiranje mikrometastaza u jetri kod pacijenata sa karcinomom debelog creva, ali da stimuliše progresiju već uspostavljenih mikrometastaza u makroskopski vidljive, indukujući oba ključna procesa- angiogenezu i preživljavanje tumorskih ćelija (195, 196, 200). Oba efekta periostin ostvaruje vezivanjem za α v-integrine i pokretanjem PI3K/Akt i Wnt/ β -katenin signalnih puteva (195, 200).

Dakle, kod uznapredovalih tumora debelog creva, povećana ekspresija periostina je loš prognostički parametar-periostin stimuliše preživljavanje i proliferaciju tumorskih ćelija, stimuliše angiogenezu, učestvuje u remodelovanju ECM i nastanku metastaza.

Sa druge strane, u početnim fazama nastanka tumora debelog creva, prilikom progresije iz normalne sluznice u adenom i adenoma u adenokarcinom, opisuje se rano smanjenje periostina u lamini proprijii sluznice debelog creva (66). Smanjenje periostina prati smanjenje broja perikriptalnih miofibroblasta (66, 201). Pokazano je da se količina periostina u lamini proprijii sluznice debelog creva smanjuje, čak i pre nego što dođe do smanjenja broja miofibroblasta, prilikom progresije normalne sluznice u hiperplastičnu (66). Ekspresija periostina unutar adenoma je veoma slaba, dok sa prelaskom adenoma u adenokarcinom gotovo u potpunosti izostaje. Ekspresija periostina ponovo se povećava u ranom invazivnom karcinomu, predominantno na invazivnom frontu. Sa daljom progresijom tumora, kao što je već pomenuto, pojačava se ekspresija periostina u stromi tumora (66).

Smanjenje periostina na ovoj udaljenosti od tumora govori u prilog postojanju "*field carcinogenesis*" teorije. Naime, može predstavljati jednu od ranih promena u izmenjenom "polju" u sluznici debelog creva. Epitel sluznice "polja" je hiperproliferativan (109); smanjenje periostina može predstavljati zaštitni mehanizam, čiji je cilj da se proliferacija smanji. Kod periostin^{-/-} životinja smanjen je broj Ki67-pozitivnih ćelija u Liberkinovim kriptama. Smanjenje periostina može nastati usled smanjene sinteze od strane perikriptalnih miofibroblasta ili usled smanjenog broja perikriptalnih miofibroblasta. Zapravo, smatra se da perikriptalni miofibroblasti, kao odgovor na povećanu proliferaciju epitelnih ćelija, najpre smanjuju sintezu periostina, a zatim se i njihov broj postepeno smanjuje (66).

Primenom egzaktnih morfometrijskih metoda pokazali smo da postoje promene u distribuciji i zastupljenosti hijaluronske kiseline, kao komponente osnovne supstance

ekstracelularnog matriksa lamine proprije sluznice debelog creva. 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 (202). Sintezu hijaluronske kiseline vrše enzimi hijaluron sintaze (*hyaluronan synthase enzymes*, HAS), a razgradnju hijaluronidaze (Hyal), familija enzima koji vrše hidrolizu lanaca polimera hijaluronske kiseline na fragmente različite dužine (intermedijarne ili kratke). Fragmenti hijaluronske kiseline različite dužine (i molekularne mase) imaju veoma različite funkcije (202, 203).

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 zavisao od složenih interakcija između tumorskih ćelija i ćelijskih i vanćelijskih komponenta mikrosredine tumora (202, 204).

U adenokarcinomu debelog creva, povećana sinteza hijaluronske kiseline, odnosno povećana aktivnost HAS enzima, povezuju se sa lošijom prognozom. Međutim, povećana sinteza i akumulacija hijaluronske kiseline velike molekularne mase inhibira progresiju tumora, migraciju ćelija i nastanak metastaza (202, 204, 205).

U većini tumora povećanu sintezu hijaluronske kiseline prati povećana razgradnja (205). U adenokarcinomu debelog creva detektovani su povećana ekspresija i aktivnost Hyal-1 i Hyal-2 (205, 206). Povećana aktivnost hijaluronidaza, odnosno povećana razgradnja hijaluronske kiseline na fragmente manje molekularne mase, povezuje se sa bržom progresijom tumora, indukovanjem angiogeneze i stimulisanjem migracije tumorskih ćelija (207, 208). Hijaluronska kiselina velike molekularne mase (oblik u kojem je prisutna u homeostatskim uslovima) suprimira angiogenezu. Međutim, oligo-fragmenti hijaluronske kiseline, zajedno sa VEGF i FGF faktorima, stimulišu proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija i nastanak kapilara (202). Fragmenti hijaluronske kiseline stimulišu migraciju tumorskih i stromalnih ćelija putem interakcije

sa receptorima: CD44 i RHAMM (*Receptor for hyaluronan mediated motility*). Vezivanje hijaluronske kiseline za CD44 aktivira receptor za tirozin kinazu, i pokreće Ras/MAPK i PI3K/Akt signalne puteve. Takođe, vezivanje hijaluronske kiseline za CD44 aktivira Rac1 signalni put, koji je uključen u polimerizovanje aktinskih filamenata, formiranje lamelipodija, filopodija i ćelijsku pokretljivost. Hijaluronan-CD44 interakcija uključena je i u regrutovanje mezenhimalnih matičnih ćelija (MSCs) u tumor (209). Fragmenti hijaluronske kiseline male molekularne mase preko TLR4 indukuju reprogramiranje neutrofila u tumor-asocirane neutrofile, koji dodatno stimulišu pokretljivost tumorskih ćelija (205, 210) Razgradnja hijaluronske kiseline na manje fragmente, indukuje MMP-9 i MMP-13 u tumorima, čime stimuliše remodelovanje ECM (202, 211).

Pomenuti 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, ne može se zanemariti ni tradicionalna, biomehanička uloga hijaluronske kiseline u regulaciji zapremine tečnosti u tkivima (56).

Unutar samog tumora veoma često postoji edem. Uloga edema unutar tumora nije do kraja ispitana. Edem unutar tumora može biti veoma različitog porekla (56).

Ko što je rečeno, tumori bogati hijaluronskom kiselinom karakterišu se velikom gustinom negativnog naelektrisanja koje imobilise intersticijalnu tečnost i dovodi do formiranja želatinoznih regiona unutar tumora. Odbojne elektrostatičke sile između blisko postavljenih negativno naelektrisanih grupa, uzrokuju bubrenje ovih regiona. Takođe, velike gustine negativnog naelektrisanja, privlače veliki broj pozitivnih jona u intersticijum. Višak pozitivnih jona u intersticijalnom prostoru dovodi do nastanka razlike u Donanovom osmotskom pritisku tečnosti između unutrašnjosti tumora i okoline tumora (56, 61, 62).

Uzrok edema unutar tumora može biti i povećan IFP usled povećane propustljivosti novostvorenih krvnih sudova tumora ili usled disfunkcionalnosti intratumorskih limfnih sudova (56).

I kolagen ima veoma važnu ulogu u nastanku intratumorskog edema. Zanimljivo je da smanjenje količine hijaluronske kiseline unutar tumora, smanjuje količinu intersticijalne

tečnosti (a samim tim i pritisak tečnosti) unutar tumora, dok smanjenje količine kolagena ima sasvim suprotan efekat (56).

Dakle, brojni faktori regulišu količinu intersticijalne tečnosti unutar tumora.

Povećan solidni stres i IFP u velikoj meri utiču na progresiju tumora i odgovor na terapiju. Sa jedne strane, povećan solidni stres (čija je jedna komponenta pomenuti *swelling stress*), može komprimovati tumorske ćelije i smanjiti njihovu proliferaciju ali povećati invazivnost i metastatski potencijal (56, 212). Povećan solidni stres i IFP mogu komprimovati krvne i limfne sudove i doprineti hipoksiji unutar tumora (56, 213). Hipoksija zatim, pokreće niz signalnih puteva uključenih u preživljavanje tumorskih ćelija, mobilnost i metastatski kapacitet (214). Takođe, kompresija krvnih sudova vodi hiperperfuziji, odnosno redukovanom dospevanju hemoterapeutika i nanoterapeutika u tumor. Sa druge strane, povećan IFP olakšava transport faktora rasta i tumorskih ćelija iz tumora u okolno tkivo (215, 216, 217).

Osim u tumoru, edem postoji i u prelaznoj sluznici. Mehanizmi nastanka edema u prelaznoj sluznici isti su kao i unutar tumora (105).

Opisali smo pojavu povećanih prostora ("pora") između svih posmatranih komponenti ECM.

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, ne smemo zanemariti da uzrok edema mogu biti smanjena zastupljenost kolagena i povećan broj novoformiranih CD105-pozitivnih krvnih sudova, koji smo detektovali na ovoj udaljenosti od tumora.

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 komponenata. Međusobnom interakcijom svih komponenata, na još uvek nedovoljno jasan način, nastaje edem sluznice. Posledice ovog edema, kao i edema unutar samog tumora, mogu biti različite i takođe nisu ispitane do kraja.

Pojava povećanih prostora ("pora") između komponenata ECM može nastati i kao posledica smanjenje sinteze ili povećane razgradnje komponenata ECM (56).

Navedeni mehanizmi ne isključuju jedan drugi.

Posledice povećanih prostora ("pora") između komponenata ECM takođe, mogu biti veoma različite. Svaka od posmatranih komponenata ECM aktivno učestvuje u procesu nastanka i progresije maligne bolesti, različitim mehanizmima, uz interakciju sa svim drugim komponentama lamine proprije sluznice debelog creva. Zato promena u zastupljenosti i organizaciji svake od komponenata može imati specifične posledice, koje dodatno zavise od interakcije sa svim komponentama mikrosredine u kojoj se promena odvija.

Povećanje prostora ("pora") između komponenata ECM u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, može, kao i u prelaznoj sluznici, biti povezano sa povećanom migracijom ćelija, pre svega fibroblasta, iz nezahvaćene lamine proprije sluznice debelog creva u tumor ili u premetastatska područja (165).

Šta je uzrok a šta posledica, nije moguće odgovoriti bez dodatnih ispitivanja. Da li rastući tumor sekrecijom brojnih faktora rasta i citokina aktivira fibroblaste u lamini propriji udaljenoj od tumora, pa aktivirani fibroblasti menjaju sintezu ECM i pojačano eksprimiraju različite MMP koje razgrađuju komponente ECM i formiraju povećane prostore između njih, ili u sluznici "polja", promene koje stvaraju predispoziciju za razvoj tumora, vode aktivaciji fibroblasta i promenama u sintezi i razgradnji ECM, ostaje nerazjašnjeno.

Takođe, potrebna su dodatna istraživanja da bi se odgovorilo na pitanje da li fibroblasti i miofibroblasti lamine proprije sluznice debelog creva (bilo da su aktivirani faktorima koje sekretuje tumor ili promenama u sluznici "polja") smanjeno sintetišu ili povećano razgrađuju komponente ECM, ili remodeluju ECM zarad efikasnije migracije iz lamine proprije sluznice debelog creva. U poslednjem slučaju, smanjena zastupljenost svih komponenata ECM bila bi, bar delimično, posledica smanjenog broja ovih ćelija.

Najverovatnije su svi navedeni mehanizmi u različitom obimu uključeni u promene u zastupljenosti i organizaciji komponenata ECM u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora.

Da bismo se približili razumevanju kompleksnih procesa u udaljenoj lamini propriji sluznice debelog creva, sproveli smo kvantifikaciju svih tipova ćelija.

U našem istraživanju nije pronađena razlika u broju i distribuciji makrofaga, dendritskih ćelija, aktiviranih fibroblasta, T-limfocita i B-limfocita i plazma ćelija u lamini propriji sluznice debelog creva zdravih ispitanika i na udaljenosti 10 cm i 20 cm od adenokarcinoma.

Naš nalaz ne isključuje postojanje promena u odnosu podtipova analiziranih ćelijskih populacija niti postojanje funkcionalnih promena u ispitivanim ćelijama.

Poslednjih godina se naročito ističe značaj različitih populacija T-limfocita unutar samog tumora debelog creva u prognozi i terapiji. Pokazano je da je povećana gustina citotoksičnih ($CD3^+$ i $CD8^+$) i memorijskih ($CD45RO^+$) T-limfocita povezana sa boljim imunskim odgovorom usmerenim na tumor, dužim petogodišnjim preživljavanjem i boljim odgovorom na terapiju. O značaju T-limfocita u tumoru govori i oformljen sistem procene tumora baziran na broju T-limfocita, tzv. imunoskor. Imunoskor predstavlja broj citotoksičnih i memorijskih T-limfocita u središtu tumora i na invazivnim marginama. Pokazano je, čak, da imunoskor ima prednosti u odnosu na TNM klasifikaciju tumora: bolje korelira sa petogodišnjim preživljavanjem i smatra se najboljim prediktorom uspeha imunoterapije tumora (primene *checkpoint* inhibitora, antitela koje blokiraju PD-1, PD-1L i CTLA-4) (50).

Pokazali smo da postoji smanjena zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od adenokarcinoma, u poređenju sa laminom proprijom zdravih ispitanika.

U karcinomu 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. Na primer, fibroblasti sekretuju Wnt ligande i BMP (*bone morphogenetic protein*) antagoniste (218) čime održavaju nišu matičnih ćelija epitela creva. Sa druge strane, fibroblasti zavise od *Hedgehog* signalnih molekula koje sekretuju epitelne ćelije (84, 89, 90).

Kada epitelne ćelije creva zadobiju onkogene mutacije (na primer, gubitak APC), proksimani fibroblasti proliferišu i aktiviraju se (84, 219). Najvažniji produkti sekrecije

mutiranih epitelnih ćelija koji mogu aktivirati fibroblaste su TGF- β (220, 221) i IL-33 (222). Aktivacija fibroblasta praćena je ekspresijom markera za miofibroblaste α SMA (*alpha-smooth muscle actin*) i promenom u profilu sekrecije. Miofibroblasti sekretuju matriks metaloproteinaze (84, 220) i faktore koji stimulišu proliferaciju i migraciju intestinalnih epitelnih ćelija: amfiregulin, HGF (*hepatocyte growth factor*), FGF (*fibroblate growth factor*) i Wnt signalni molekuli (223, 224, 225).

Pored standardnog koncepta, da je prvi korak u nastanku karcinoma, promena na epitelnim ćelijama (onkogeno mutacija) a da su promene na stromi sekundarne, pojavljuje se nov koncept koji stromu stavlja u prvi plan. Smatra se da izmenjeni fibroblasti/miofibroblasti mogu inicirati malignu transformaciju epitelnih ćelija, putem sekrecije različitih faktora rasta (226). Pokazano je da dolazi do maligne transformacije pre-maligno izmenjenih ćelija epitela prostate kada se *in vitro* kultivišu sa miofibroblastima izolovanim iz karcinoma prostate (CAF, *carcinoma associated fibroblast*). Takođe, kada se zdrave žlezdane epitelne ćelije dojke transplantiraju u imunodeficientnog miša, zajedno sa miofibroblastima koji pojačano ekspimiraju TGF- β i HGF, zdrave epitelne ćelije postaju hiperproliferativne i nalikuju ćelijama dukalnog karcinoma. (226, 227, 228).

Generalno, povećana zastupljenost miofibroblasta unutar samog tumora povezuje se sa lošijom prognozom kolorektalnog karcinoma: nižim petogodišnjim preživljavanjem, učestalijim ponovnim javljanjem tumora nakon operacije i većom incidencom metastaza na jetri (229).

CAFs stimulišu progresiju tumora na više načina. Najpre, produkcijom brojnih faktora rasta i citokina koji stimulišu proliferaciju tumorskih ćelija (HGF, EGF, FGF, IFG, TGF- β , CXCL12 i brojnih drugih). Zapravo, najveći broj nabrojanih faktora rasta mogu proizvoditi i tumorske ćelije i putem njih stimulišu aktivaciju CAF-a. Neki od faktora rasta (na primer TGF- β i CXCL12) mogu delovati i autokrino. Sekrecijom navedenih faktora rasta od strane miofibroblasta i tumorskih ćelije uspostavlja se mehanizam pozitivne povratne sprege kojim se ubrzava progresija tumora (225, 226, 230, 231). CAFs stimulišu angiogenezu sintezom i sekrecijom VEGF-a, COX2 i VCAM1 (232).

CAFs stimulišu migraciju i invazivnost tumorskih ćelija. Stimulisani sa TGF- β sintetisanim od strane tumorskih ćelija, CAFs intenzivno proizvode MMPs (pre svega MMP2, MMP9 i MMP12). Glavni kolagen bazalne membrane, kolagen tip IV, supstrat

je MMP2 i MMP9 (220, 233). Pored sekrecije enzima koji razgrađuju ECM, CAFs stimulišu migraciju tumorskih ćelija na brojne druge načine: povećanom ekspresijom Snail1 transkripcionog faktora, koji je važan u epitelno-mezenhimnoj tranziciji (234); reorganizacijom aktinskih filamenata u tumorskim ćelijama (235); hipersekrecijom FGF1 koji se vezuje za FGFR-3 na tumorskim ćelijama; povećanom ekspresijom PDGFR-a, i brojnim drugim, još uvek nedovoljno ispitanim mehanizmima (220).

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, stielatne ćelije se diferenciraju u miofibroblaste koji zatim učestvuju u formiranju niše pogodne za rast metastaza (84, 232). Pokazano je da miofibroblasti izolovani iz metastaze kolorektalnog karcinoma u jetru, 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 (232).

Analogno tome, smatramo da su i miofibroblasti debelog creva zahvaćenog tumorom izmenjeni, ne samo u tumoru i neposrednoj okolini, već i u udaljenim delovima debelog creva.

Pokazano je da dolazi do smanjenja broja perikriptalnih miofibroblasta u sluznici želuca zahvaćenoj intestinalnom metaplazijom. Broj perikriptalnih miofibroblasta se smanjuje duž progresije metaplazije u adenom, adenoma u intramukozni karcinom, intramukoznog karcinoma u submukozni invazivni karcinom (236).

Smanjenje broja perikriptalnih miofibroblasta pokazano je i prilikom progresije sluznice debelog creva u adenom i adenoma u karcinom (201). Smanjenje broja perikriptalnih miofibroblasta korelira sa povećanim Ki67 indeksom u epitelnim ćelijama Liberkinovih kripi (201).

U prelaznoj sluznici, neposredno oko kolorektalnog adenokarcinoma, takođe, dolazi do smanjenja broja perikriptalnih miofibroblasta (237). Gubitak perikriptalnih miofibroblasta korelira sa povećanim stepenom histološke atipije u prelaznoj mukozi. U prelaznoj mukozi, pored naizgled normalnih, zapažaju se izdužene, razgranate i

proširene Liberkinove kripte. Upravo oko ovih izmenjenih kripti perikriptalni miofibroblastni omotač najpre postaje diskontinuiran ili se sasvim gubi (237)

U literaturi su nedostajali podaci o zastupljenosti miofibroblasta van samog tumora i prelazne mukoze. Mi smo pokazali da je, analogno prelaznoj mukozni, zastupljenost miofibroblasta smanjena u naizgled zdravoj lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora, u poređenju sa laminom proprijom pacijenata bez malignog tumora.

Zanimljivo je da je zastupljenost miofibroblasta naročito smanjena u donjim delovima Liberkinovih kripti, naročito u samom dnu. U dnu Liberkinovih kripti debelog creva nalaze se matične ćelije. Miofibroblasti igraju važnu ulogu u održavanju niše matičnih ćelija (238).

Wnt signalni put je ključan za regulaciju proliferacije intestinalnih epitelnih ćelija. Aktivacija *Wnt* signalnog puta dovodi do akumulacije β -katenina u jedru intestinalnih epitelnih ćelija. Glavni izvor kanonskih *Wnt*-a (*Wnt* 3, 6, 9b) su epitelne ćelije, dok nekanonske *Wnt* molekule (2b, 4, 5a, 5b) i *Wnt* antagoniste sekretuju mezenhimne ćelije lamine proprije, pre svega perikriptalni miofibroblasti (239). Jedna od ključnih uloga perikriptalnih miofibroblasta je da ograniče *Wnt*/ β -katenin signalni put na matične ćelije u dnu kripte i spreče preteranu aktivaciju ovog puta u zrelih intestinalnim epitelnim ćelijama (238). Intestinalni miofibroblasti, takođe, predstavljaju glavni izvor *Bmp*-a (*bone morphogenetic protein*). *Bmp* signalni put je glavni antagonista *Wnt*/ β -katenin signalnog puta: inhibira proliferaciju matičnih ćelija i stimuliše njihovu diferencijaciju u zrele intestinalne epitelne ćelije. Nedavno je otkriveno da miofibroblasti oko dna Liberkinovih kripti, u zoni intestinalnih matičnih ćelija ne sekretuju *Bmp* već *Bmp*-inhibitorne molekule (*gremlin-1*, *gremlin-2* i *hordinu* sličan molekul-1). Predloženo je da na ovaj način, lokalizovanom sekrecijom *Bmp*-antagonista intestinalni miofibroblasti učestvuju u održavanju niše matičnih ćelija (238, 240). U višim zonama (u predelu tela i vrata Liberkinovih kripti), smanjuje se sekrecija *Bmp*-antagonista a povećava sekrecija *Bmp*-a koji inhibiše *Wnt*/ β -katenin signalni put i stimuliše diferencijaciju ćelija. Dakle, postoji i fina funkcionalna specijalizacija intestinalnih miofibroblasta u zavisnosti od lokalizacije (240).

Gubitak miofibroblasta upravo u ovoj zoni govori u prilog poremećaja finih epitelno-mezenhimnih interakcija koje regulišu proliferaciju i diferencijaciju intestinalnih matičnih ćelija (238, 239, 240).

Još jedan mogući mehanizam smanjenog broja miofibroblasta je, kao što je već pomenuto, sekrecija brojnih faktora rasta od strane tumorskih ćelija, koji stimulišu sposobnost migracije miofibroblasta unutar tumora ali i udaljenih miofibroblasta u sam tumor i u premetastatska područja (165). Navedeni procesi ne isključuju jedan drugi, i predpostavlja se da oba mogu imati ulogu u smanjenju broja miofibroblasta u lamini propiji osoba sa adenokarcinomom debelog creva.

Analogno predhodnim razmatranjima, ostaje otvoreno pitanje da li promene u miofibroblastima predhode ili nastaju kao odgovor na promene epitelnih ćelija debelog creva.

Dakle, u slznici debelog creva udaljenoj 10 cm i 20 cm od adenokarcinoma postoje strukturne i celularne promene, po kojima se ova sluznica razlikuje od sluznice uzete sa iste lokacije od pacijenata koji nemaju karcinom. Da li opisane promene na udaljenosti od tumora nastaju usled uticaja rastućeg tumora, ili predstavljaju promenu koja predhodi nastanku tumora, nije do kraja jasno. Ne možemo isključiti mogućnost da oba mehanizma u određenom stepenu učestvuju u nastanku promena u udaljenoj sluznici. Dodatna ispitivanja sluznice na još većoj udaljenosti od tumora, mogla bi nas dovesti bliže odgovoru.

Smatramo da bolje razumevanje promena u nezahvaćenoj sluznici pacijenata sa tumorom i poznavanje mehanizama nastanka tih promena mogu doprineti boljem razumevanju procesa inicijacije tumora, interakcije tumora sa stromom i, što je naročito važno, procesa nastanka metastaza. Poznavanje promena u nezahvaćenoj sluznici, naročito sluznici rektuma, koja je najlakše dostupna, važno je i sa stanovišta skrininga u prevenciji karcinoma debelog creva.

6. Zaključci

Na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Morfometrijska analiza strukturnih i celularnih elemenata sluznice debelog creva pokazuje da postoje promene na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa sluznicom uzetom sa iste lokacije kod pacijenata bez tumora.
2. Postoje promene u svim parametrima fraktalne i teksturalne analize jedara epitelnih ćelija debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa jedrima epitelnih ćelija pacijenata bez tumora debelog creva.
3. Postoji promena u zastupljenosti sulfomucina i sijalomucina u peharastim ćelijama epitela debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa peharastim ćelijama pacijenata bez tumora.
4. Postoji hiperproliferacija i pomeranje proliferišućih ćelija u više delove Liberkinovih kriпти u epitelu debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa epitelnim ćelijama pacijenata bez tumora.
5. Postoji povećan broj ukupnih (CD34-pozitivnih) i novonastalih (CD105-pozitivnih) krvnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom uzetom sa iste lokacije kod pacijenta bez tumora.
6. Dolazi do stvaranja limfnih sudova u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora.
7. Postoji smanjena zastupljenost komponenata ekstracelularnog matriksa (kolagenih vlakana, retikularnih vlakana, periostina i hijaluronske kiseline) u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom uzetom sa iste lokacije kod pacijenta bez tumora.
8. Postoji povećana dezorganizacija kolagenih vlakana u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom uzetom sa iste lokacije kod pacijenta bez tumora.
9. Postoji povećanje prostora ("pora") između komponenata ekstracelularog matriksa (retikularnih vlakana, periostina i hijauronske kiseline) u lamini propriji sluznice

debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom uzetom sa iste lokacije kod pacijenta bez tumora.

10. Nema promene u broju T-limfocita, B-limfocita, plazma ćelija, dendritskih ćelija i aktiviranih fibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom uzetom sa iste lokacije kod pacijenta bez tumora.

11. Postoji smanjena zastupljenost miofibroblasta u lamini propriji sluznice debelog creva na udaljenosti 10 cm i 20 cm od tumora u poređenju sa laminom proprijom uzetom sa iste lokacije kod pacijenta bez tumora.

7. Literatura

1. Obradović M. Digestivni sistem. U: Bumbaširević V, Lačković V, Milićević NM, Milićević Ž, Mujović S, Obradović M et al. *Histologija*. Beograd: Medicinski fakultet u Beogradu; 2005; p.227-276.
2. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Baltimore, MD, Lippincott Williams & Wilkins 2006; 597-628.
3. Noah TK, Donahue B, Shroyer N. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res* 2011; 317(19):2702-2710.
4. Ceralli F, Familiari G, Marinozzi G, Muccioli-Casadei D. The glycocalyx of the epithelial cells of the colon, observed in normal and ulcerous colitic conditions. *Experientia* 1976; 32(12):1542-4.
5. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 2016; 164(3):337-40.
6. Brandtzaeg P. The gut as communicator between environment and host: Immunological consequences. *Eur J Pharmacol* 2011; 668:16-32.
7. Muniz LR, Knosp C, Yeretssian G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front Immunol* 2012; 3:310.
8. Gueking MB, McCoy KD, Macpherson AJ. The function of secretory IgA in the context of the intestinal continuum of adaptive immune responses in host-microbial mutualism. *Semin Immunol* 2012; 24:36-42.
9. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(3):141-53.
10. Okumura R, Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med* 2017; 49(5):338.
11. Kulkarni N, Pathak M, Lal G. Role of chemokine receptors and intestinal epithelial cells in the mucosal inflammation and tolerance. *J Leukoc Biol* 2017; 101(2):377-394.
12. Pedersen G. Development, validation and implementation of an in vitro model for the study of metabolic and immune function in normal and inflamed human colonic epithelium. *Dan Med J* 2015; 62(1):4973.

13. Johansson MEV, Hansson GC. Mucus and the goblet cell. *Dig Dis* 2013; 31(0):305-309.
14. Croix JA, Carbonero F, Nava GM, Russell M, Greenberg E, Gaskins HR. On the relationship between sialomucin and sulomucin expression and hydrogenotrophic microbes in the human colonic mucosa. *PLoS One* 2011; 6(9):e24447.
15. Danquah KO, Adjei E, Quayson S, Adankwah E, Gyamfi D, Ossei PPS et al. Mucin expression patterns in histological grades of colonic cancers in Ghanaian population. *Pan Afr Med J* 2017; 27:267.
16. Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucous system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10(6):352-361.
17. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12(5): 319-30.
18. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provides the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* 2014; 260(1):8-20.
19. Milićević NM and Milićević Ž. Limfatični organi U: Bumbaširević V, Lačković V, Milićević NM, Milićević Ž, Mujović S, Obradović M, Pantić SB, Stefanović BD, Trpinac D. *Histologija*. Beograd: Medicinski fakultet u Beogradu; 2005 p.277-306
20. Ohno H. Intestinal M cells. *J Biochem* 2016; 159(2):151-60.
21. El-Salhy M, Mazzawi T, Hausken T, Hatlebakk JG. Interaction between diet and gastrointestinal endocrine cells. *Biomed Rep* 2016; 4:651-656.
22. Kuramoto H, Kadowaki M, Sakamoto H, Yuasa K, Todo A, Shirai R. Distinct morphology of serotonin-containing enterochromaffin (EC) cells in the rat distal colon. *Arch Histol Cytol* 2007; 70(4):235-241.
23. Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev* 2008; 22:1856-64.
24. Umar S. Intestinal Stem Cells. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12(5):340-348.

25. Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, Gasbarrini GB, Gasbarrini A. Colon cancer stem cells: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 2013; 19:2997-3006.
26. Roy S, Majumdar AP. Cancer stem cells in colorectal cancer: genetic and epigenetic changes. *J Stem Cell Res Ther* 2012; Suppl 7.
27. Bumbasirevic V. *Veživna tkiva U: Bumbaširević V, Lačković V, Milićević NM, Milićević Ž, Mujović S, Obradović M, Pantić SB, Stefanović BD, Trpinac D. Histologija. Beograd: Medicinski fakultet u Beogradu; 2005 p.93-130.*
28. Maximow A. Muscular tissue: histogenesis and regeneration. In: Bloom W, ed. *A Textbook of Histology*. Philadelphia, Pa: Saunders; 1930:199–200.
29. Patrick A, Adegboyega, Randy C. Mifflin, John F. DiMari, Jamal I. Saada, Don W. Powell. Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps, and adenomatous colorectal polyps. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:829-836.
30. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999;277:183-201.
31. Powel DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X and Mifflin RC. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol* 2011; 73:213-237.
32. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(9):582-98.
33. Tao L, Huang G, Song H, Chen Y, Chen L. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. *Oncol Lett* 2017; 14:2611-2620.
34. Golder JP and Doe WF. Isolation and preliminary characterisation of human intestinal macrophages. *Gastroenterology* 1983; 84:795-802.
35. Bockman DE, Boydston WR and Beezhold DH. The role of epithelial cells in gut-associated immune reactivity. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 84:795-802.
36. Isidro RA, Appleyard CB. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; 311(1):59-73.

37. Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Bogunovic M, Spencer SP, Belkaid Y et al. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* 2014; 343:1249288.
38. Vinnakota K, Zhang Y, Selvanesan BC, Topi G, Salim T, Sand-Dejmek J et al. M2-like macrophages induce colon cancer cell invasion via matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol* 2017; 232(12):3468-3480.
39. Marech I, Ammendola M, Sacco R, Sammarco G, Zuccala V, Zizzo N et al. Tumour-associated macrophages correlate with microvascular bed extension in colorectal cancer patients. *J Cell Mol MEd* 2016; 20(7): 1373-1380.
40. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010.
41. Gross M, Salame TM, Jung S. Guardians of the gut-murine intestinal macrophages and dendritic cells. *Fron Immunol* 2015; 6:254.
42. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(6):435-446.
43. Ng SC, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Intestinal dendritic cells: their role in bacterial recognition, lymphocyte homing , and intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16(10):1787-807.
44. LEgitimo A, Consolini R, Failli A, Orsini G, Spisni R. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(11):3224-3235.
45. Kajihara M, Takakura K, Kanai T, Ito Z, Saito K, Takami S et al. Dendritic cell-based cancer immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(17):4275-4286.
46. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Dendritic cells in colorectal cancer and a potential for their use in therapeutic approaches. *Curr Pharm Des* 2016; 22(16):2431-8.
47. Brandtzaeg P and Johansen F. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 2005; 206:32-63.
48. Brandtzaeg P, Farstad IN, Helgeland L. Phenotypes of Tcells in the gut. *Chem Immunol* 1988; 71:1-26

49. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanches-Cabo F, Costes A et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(25):2654-66.
50. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M et al. Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity* 2016; 44(3):698-711.
51. Frantz C, Stewart KM and Weaver V. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123:4195-4200.
52. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009; 326(5957):1216-9.
53. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* 2010; 341(1):126-40.
54. Suhovskih AV, Aidagulova SV, Kashuba VI and Grigorieva EV. Proteoglycans as potential microenvironment biomarkers for colon cancer. *Cell Tissue Res* 2015; 358:56-66.
55. Monslow J, Govindaraju P, Puré E. Hyaluronan-a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Frontiers in Immunology* 2015; 6:231.
56. Voutouri C, Polydorou C, Papageorgis P, Gkretsi V, Stylianopoulos T. Hyaluronan-derived swelling of solid tumors, the contribution of collagen and cancer cells, and implications for cancer therapy. *Neoplasia* 2016; 18(12):732-741.
57. Stylianopoulos T, Martin JD, Snuderl M, Mpekris F, Jain SR et al. Coevolution of solid stress and interstitial fluid pressure in tumors during progression: Implication for vascular collapse. *Cancer Res* 2013; 73:3833-3841.
58. Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng* 2014; 16:321-346.
59. Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109:15101-15108.

60. Wiig H, Swartz MA. Interstitial fluid and lymph formation and transport: physiological regulation and roles in inflammation and cancer. *Physiol Rev* 2012; 92:1005-1060.
61. Eisenberg SR, Grodzinsky AJ. Swelling of articular cartilage and other connective tissues: electromechanochemical forces. *J Orthop Res* 1985; 3:148-159.
62. Wilson W, van Donkelaar CC, van Rietbergen R, Huiskes R. The role of computational models in the search for mechanical behavior and damage mechanisms of articular cartilage. *Med Eng Phys* 2005; 27:810-826.
63. Lindahl U, Couchman J, Kimata K, Esko JD. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor 2015.
64. Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Arch* 2011; 459:465-75.
65. Hyeon JO, Jeong MB, Xian-Yu W, Nam-Yun C, Jung HK, Gyeong HK. Overexpression of POSTN in tumor stroma is a poor prognostic indicator of colorectal cancer. *J Pathol Transl Med* 2017; 51(3):306-313.
66. Kikuchi Y, Kashima TG, Nishiyama T, Shimazu K, Morishita Y, Shimazaki M et al. Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. *J Histochem Cytochem* 2008; 56(8):753-64.
67. Xiaowen X, Wenjun C, Jie Y, Xue H, Xiaojie T, Yibo D et al. Periostin expression in intra-tumoral stromal cells is prognostic and predictive for colorectal carcinoma via creating a cancer-supportive niche. *Oncotarget* 2016; 7(1):798-813.
68. Bella J. Collagen structure: new tricks from a very old dog. *Biochem J* 2016; 473(8):1001-25.
69. Vannucci L. Stroma as an active player in the development of the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2015; 8(3):159-66.
70. Wolf K, Friedl P. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends Cell Biol* 2011; 21(12):736-744.
71. Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion; 2007; 9(8):893-904.

72. Madsen DH, Engelholm LH, Ingvarsen S, Hillih T, Wagenaar-Miller RA, Kjølner L et al. Extracellular collagenases and the endocytotic receptor, urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180, cooperate in fibroblast-mediated collagen degradation. *J Biol Chem* 2007; 282(37):27037-45.
73. Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(10):764-75.
74. O'Brien P, O'Connor BF. Separase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochem Biophys Acta* 2008; 1784(9):1130-45.
75. Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 2000; 148(6):1309-23.
76. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003; 160(2):267-77.
77. Friedl P, Wolf K. Proteolytic and non-proteolytic migration of tumor cells and leucocytes. *Biochem Soc Symp* 2003; (70):277-85.
78. Friedl P, Wolf K, Lammerding J. Nuclear mechanics during cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23(1):55-64.
79. Illina O, Bakker GJ, Vasaturo A, Hofmann RM, Friedl P. Two-photon laser-generated microtracks in 3D collagen lattices: principles of MMP-dependent and -independent collective cancer cell invasion. *Phys Biol* 2011; 8(1):0150101.
80. Torre LA, Bray F, Siegel R, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jmal A. Global Cancer Statistics, 2012. *Ca Cancer J Clin* 2015; 65:87-108.
81. Institut za zaštitu zdravlja Srbije "Dr Milan Jovanović Batut". Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji. Registar za rak u centralnoj Srbiji, Beograd 2016.

82. Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer* 2004; 108:433-42.
83. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF et al. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3:153-73.
84. Tape CJ. The heterocellular emergence of colorectal cancer. *Trends in Cancer* 2017; 3(2):79-88.
85. Hemmings C. Is carcinoma a mesenchymal disease? The role of the stromal microenvironment in carcinogenesis. *Pathology* 2013; 45(4):371-381.
86. Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, Lehnert H, Hass R. Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal* 2011; 13:9:18.
87. Zhan HX, Zhou B, Cheng YG, Xu JW, Wang L, Zhang GY et al. Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology. *Cancer Lett* 2017; 2:304-312.
88. Grisendi G, Bussolari R, Veronesi E, Piccinno S, Burns JS, De Santis G, et al. Understanding tumor-stroma interplays for targeted therapies by armed mesenchymal stromal progenitors: the Mesenkillers. *Am J Cancer Res* 2011; 1(6):787-805.
89. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(5):392-401.
90. Roulis M, Flavell RA. Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation* 2016; 92(3): 116-131.
91. Otranto M, Sarrazy V, Bonté F, Hinz B, Gabbiiani G, Desmoulière A. The role of fibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr* 2012; 6(3):203-19.
92. Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, Kashiwagi S, Matsuoka J, Doi Y, et al. Upregulation of cancer-associated myofibroblasts by TGF- β from scirrhous gastric carcinoma cells. *Br J Cancer* 2011; 105(7):996-1001.
93. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and

normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol* 2008; 44(5):509-17.

94. Zhang Y, Sime W, Sjölander A. Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cells migration. *Eur J Cancer* 2013; 49(15):3320-34.
95. Popivanova BK, Kostadinova FI, Furuichi K, Shamekh MM, Kondo T et al. Blockade of a chemokine, CCL2, reduces chronic colitis-associated carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 2009; 69(19):7884-92.
96. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili SA, Mardani F et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018; doi: 10.1002/jcp.26429.
97. Sundström P, Stenstad H, Langenes V, Ahlmanner E, Theander L, Ndah TG et al. Regulatory T cells from colon cancer patients inhibit effector T-cell migration through an adenosine-dependent mechanism. *Cancer Immunol Res* 2016; 4(3):183-93.
98. Umansky V, Blattner C, Fleming V, Hu X, Gebhardt C, Altevogt P et al. Myeloid-derived suppressor cells and tumor escape from immune surveillance. *Semin Immunopathol* 2017; 39(3):295-305.
99. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumor. *Nat Rev Immunol* 2012; 12(4):253-68.
100. de Visser KE, Kortjes LV, Coussens LM. *De novo* carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 2005; 7:411-23.
101. Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res* 2006; 66:7741-7.
102. Berntsson J, Nodin B, Eberhard J, Micke P, Jirström K. Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2016; 139(5):1129-39.
103. Flynn NJ, Somasundaram R, Arnold KM, Sims-Mourtada J. The multifaceted roles of B cells in Solid tumors: Emerging treatment opportunities. *Target Oncol* 2017; 12(2):139-152.

104. Miles FL, Sikes RA. Insidious change in stromal matrix fuel cancer progression. *Mol Cancer Res* 2014; 12(3):297-312.
105. Riddell RH, Path MB, Levin B. Ultrastructure of transitional mucosa adjacent to large bowel carcinoma. *Cancer* 1977; 40:2509-2522.
106. Galandiuk S, Rodriguez-Justo M, Jeffery R, Nicholson AM, Cheng Y, Oukrif D, et al. Field Cancerization in the intestinal epithelium of patients with Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 2012; 142(4):855-864.
107. Park S, Song CS, Yang H, Jung YS, Choi KY, Dong HK et al. Field cancerization in sporadic colon cancer. *Gut Liver* 2016; 10(5):773-80.
108. Ramirez N, Bandres E, Navarro A, Pons A, Jansa S, Moreno I et al. Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesion. *European journal of cancer* 2008; 44:2689-2695.
109. Backman V, Roy HK. Advances in biophotonics detection of field carcinogenesis for colon cancer risk stratification. *Journal of Cancer* 2013; 4(3): 251-261.
110. Terpstra OT, van Blankenstein M, Dees J, Eilers GA. Abnormal pattern of cell proliferation in the entire colonic mucosa with colon adenoma or cancer. *Gastroenterology* 1987; 92(3):704-8.
111. Patel A, Tripathi G, Gopalakrishnan K, Williams N, Arasaradnam R. Field cancerisation in colorectal cancer: A new frontier or pastures past? *World J Gastroenterol* 2015; 21(13):3763-3772.
112. Filipe MI, Branfoot AC. Abnormal patterns of mucus secretion in apparently normal mucosa of large intestine with carcinoma. *Cancer* 1974; 379:1-18.
113. Barton CK, Dhanpat J. Identification of lymphatics within the colonic lamina propria in inflammation and neoplasia using the monoclonal antibody D2-40. *Yale Journal of biology and medicine* 2008; 81:103-113.

114. Balázs M, Kovács A. The "transitional" mucosa adjacent to large bowel carcinoma-electron microscopic features and myofibroblast reaction. *Histopathology* 1982; 6:617-629.
115. Genovese L, Zawada L, Tosoni A, Ferri A, Zerbi P, Allevi R, et al. Cellular localisation, invasion, and turnover are differently influenced by healthy and tumor-derived extracellular matrix. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(13-14):2005-18.
116. Fu Y, Paul RD, Wang Y, Lopez DM. Thymic involution and thymocyte phenotypic alterations induced by murine mammary adenocarcinomas. *J Immunol* 1989; 143:4300-4307.
117. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6(5):963-8.
118. Patel A, Tripathi G, Gopalakrishnan K, Williams N, Arasaradnam RP. Field cancerisation in colorectal cancer: A new frontier or pastures past? *World J Gastroenterol* 2015; 21(13):3763-3772.
119. Bancroft JD, Layton C, Suvarna SK. *Bancroft's theory and practice of histology techniques*. Churchill Livingstone, Elsevier 2013; 173-186.
120. Bancroft JD, Layton C, Suvarna SK. *Bancroft's theory and practice of histology techniques*. Churchill Livingstone, Elsevier 2013; 340-341.
121. Karperien A. FracLac for ImageJ. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fracLac/FLHelp/Introduction.htm> 1999-2013.
122. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9:671-675.
123. Pantic I, Paunovic J, Perovic M, Cattani C, Pantic S, Jovanovic T et al. Application of fractal and grey level co-occurrence matrix analysis in evaluation of brain corpus callosum and cingulum architecture. *Microsc Microanal* 2014; 20:1373-1381.
124. Mohanaiah P, Sathyanarayana P, GuruKumar L. Image texture feature extraction using GLCM approach. *Int J Sci Res* 2013; 3(5):1-5.

125. Sharma N, Ray AK, Sharma S, Shukla KK, Pradhan S, Aggarwal LM. Segmentation and classification of medical images using texture-primitive features: Application of BAM-type artificial neural network. *J Med Phys* 2008; 33(3):119-26.
126. Spicer SS. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J Histochem Cytochem* 1965; 13:211-234.
127. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stain H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133:1710-15.
128. Melling N, Kowitz CM, Simon R, Bokemeyer C, Terracciano L, Sauter G et al. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2016; 69(3):209-14.
129. Yasuyoshi M, Yuji S, Shin-ichi W, Akihiro A, Tomohiro M, Kojiro O et al. CD105 is a more appropriate marker for evaluating angiogenesis in urothelial cancer of the upper urinary tract than CD31 or CD34. *Virchows Arch* 2013; 463:673-679.
130. Bradbury P, Gordon KC. Connective tissues and stains. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone, Edinburgh; pp. 121-144.
131. de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T et al. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods* 2012; 9:690-696.
132. Despotović SZ, Milićević NM, Milošević DP, Despotović N, Erceg P, Svorcan P et al. 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.
133. Doube M, Klosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordelières F, Dougherty RP, Jackson J et al. BoneJ: free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone* 2010; 47:1076-9.

134. Rabasovic MD, Pantelić DV, Jelenković BM, Ćurčić SB, Rabasović MS, Vrbica MD et al. Nonlinear microscopy of chitin and chitinous structure: a case study of two cave-dwelling insects. *J Biomed Opt* 2015; 20(1):016010.
135. Birk JW, Tadros M, Moezardalan K, Nadyarnykh O, Forouhar F, Anderson J et al. Second harmonic generation imaging distinguishes both high-grade dysplasia and cancer from normal colonic mucosa. *Dig Dis Sci* 2014; 59:1529-1534
136. Boye K, Maelandsmo GM. S100A4 and Metastasis. A small actor playing many roles. *Am J Pathol* 2010; 176(2):528-535.
137. Mishra Sk, Siddique HR, Saleem M. S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastats: preclinical and clinical evidence. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31(1-2):163-72.
138. Dawson PA, Filipe MI. An ultrastructural and histochemical study of the mucous membrane adjacent to and remote from carcinoma of the colon. *Cancer* 1976; 37(5):2388-98.
139. Stankovic M, Pantic I, De Luka S, Puskas N, Zaletel I, Milutinovic-Smiljanic S et al. Quantification of structural changes in acute inflammation by fractal dimension, angular second moment and correlation. *J Microsc* 2015; 261(3):277-284.
140. Pantic I, Paunovic J, Basta-Jovanovic G, Perovic M, Pantic S, Milosevic NT. Age-related reduction of structural complexity in spleen hematopoietic architecture in mice. *Exp Gerontol* 2013; 48(9):926-32.
141. Sanz-Pamplona R, Berenguer A, Cordero D, Mollevi DG, Crous-Bou M, Sole X et al. Aberrant gene expression in mucosa adjacent to tumor reveals a molecular crosstalk in colon cancer. *Mol Cancer* 2014; 13:46.
142. Nairn RC, Fothergill JE, McEntegart MG, Richmond HG. Loss of gastrointestinal specific antigen in neoplasia. *Br Med J* 1962; 1:1791-1793.
143. Lev R. A histochemical study of glycogen and mucin in developing human foetal epithelia. *Histochem J* 1968; 1:152-165.
144. Franzin G, Grigioni WF, Dina R, Scarpa A, Zamboni G. Mucin secretion and morphological changes of the mucosa in non-neoplastic diseases of the colon. *Histopathol* 1983; 7:707-718.

145. Kim ER, Chang DK. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol* 2014; 7(20):9872-81.
146. Croix JA, Carbonero F, Nava GM, Russell M, Greenberg E, Gaskins HR. On the relationship between sialomucin and sulfomucin expression and hydrogenotrophic microbes in the human colonic mucosa. *PLoS One* 2011; 6(9):e24447.
147. Lennon G, Balfe A, Bambury N, Lavelle A, Maguire A, Docherty NG et al. Correlations between colonic crypt mucin chemotype, inflammatory grade and *Desulfovibrio* species in ulcerative colitis. *Colorectal Dis* 2013; 16:161-169.
148. Gao R, Gao Z, Huang L, Qun H. Gut microbiota and colorectal cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36(5):757-769.
149. Gagnière J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(2):501-518.
150. Xiao H, Woods EC, Vukojicic P, Bertozzi C. Precision glycoalyx editing as a strategy for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(37):10304-10309.
151. Varaki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1253:16-36.
152. Kuniyasy H, Yasui W, Shinohara H, Yano S, Ellis LM, Wilson MR et al. Induction of angiogenesis by hyperplastic colonic mucosa adjacent to colon cancer. *Am J Pathol* 2000; 157:1523-1535.
153. Yoshikawa R, Utsynomiya J. Cell proliferation kinetics are abnormal in transitional mucosa adjacent to colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1996; 83:36-39.
154. Chakrabarty S, Rajagopal S, Huang S. Expression of antisense epidermal growth factor receptor RNA downmodulates the malignant behavior of human colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13:191-195.
155. Rajagopal S, Huang S, Moskal TL, Lee BN, El NAggar AK, Chakrabarty S. Epidermal growth factor expression in human colon carcinomas: anisense

- epidermal growth factor receptor RNA downregulates the proliferation of human colon cancer cells. *Int J Cancer* 1995; 62:661-667.
156. Radinsky R, Risin S, Fan D, Dong Z, Bielenberg DR, Bucana CD et al. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995; 1:19-31.
 157. Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, Dignass A, Podolsky DL. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin-15. *Gastroenterology* 1996; 111:1706-1713.
 158. Kuniyasu H, Ohomori H, Sasaki T, Sasahira T, Yoshida K, Yasuhiko K et al. Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis and metastasis. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4802-4810.
 159. Anti M, Armuzzi A, Morini S, Iacone E, Pignaturo G, Coco C et al. Severe imbalance of cell proliferation and apoptosis in the left colon and in the rectosigmoid tract in subjects with a history of large adenomas. *Gut* 2001; 48:238-246.
 160. Ponz de Leon M, Ronucci L, Di Donato P, Tassi L, Smerieri O, Amorico MG et al. Pattern of epithelial cell proliferation in colorectal mucosa of normal subjects and of patients with adenomatous polyps or cancer of the large bowel. *Cancer Res* 1988; 48:4121-6.
 161. Anti M, Marra G, Armelao F, Percesepe A, Ficarelli R, Ricciuto GM et al. Rectal epithelial cell proliferation patterns as predictors of adenomatous colorectal polyp recurrence. *Gut* 1993; 34:525-30.
 162. Hanna-Morris A, Badvie S, Cohen P, McCullough T, Andreyev HJN, Allen-Mersh TG. Minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) is a stronger discriminator of increased proliferation in mucosa adjacent to colorectal cancer than Ki-67. *J Clin Pathol* 2009; 62:325-330.
 163. Tiwari AK, Crawford SE, Radosevich A, Wali RK, Stypula Y, Kunte DP et al. Neo-angiogenesis and the premalignant micro-circulatory augmentation of early colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 2011; 306:205-13.

164. Dela Cruz M, Ledbetter S, Chowdhury S, Tiwari AK, Momi N, Wali RK et al. Metabolic reprogramming of the premalignant colonic mucosa is an early event in carcinogenesis. *Oncotarget* 2017; 8(13):20543-20557.
165. Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumpr-associated niche cells. *Genes Dev* 2008; 22:559-574.
166. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002; 16:922-934.
167. Shuang L, Qin L. Cancer stem cells, lymphangiogenesis, and lymphatic metastasis. *Cancer Lett* 2015; 357:438-447.
168. Muralidharan V, Nfuyen L, Banting J, Christophi C. The prognostic significance of lymphatics in colorectal liver metastasis. *HPB Surg* 2014; 2014:954604.
169. Wang XL, Fang JP, Tang RY, Chen XM. Different significance between intratumoral and peritumoral lymphatic vessel density in gastric cancer: a retrospective study of 123 cases. *BMC Cancer* 2010; 10:299.
170. Saad RS, Kordunsky L, Liu TL, Denning KL, Kandil HA, Silverman JF. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Modern Pathol* 2006; 19:1317-1323.
171. Barton CK, Dhanpat J. Identification of lymphatics within the colonic lamina propria un inflammation and neoplasia using the monoclonal antibody D2-40. *Yale J Biol Med* 2008; 81:103-113.
172. Fogt F, Zimmerman R, Ross H, Daly T, Gausas RE. Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous, and colonic mucosa using the novel immunostain D2-40. *Ocol Rep* 2004; 11(1):47-50.
173. Rahier JF, De Beauce S, Dubuquoy L, Erdual E, Colombel JF, Jouret-Mourin A et al. Increased lymphatic vessel density and lymphangiogenesis in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34(5):533-43.
174. Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:735-903.
175. Das S, Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1131_235-241.

176. Carey SP, Kraning-Rush CM, Williams RM, Reinhart-King CA. Biophysical control of invasive tumor cell behavior by extracellular matrix microarchitecture. *Biomaterials* 2012; 33(16):4157-4165.
177. Kehlet SN, Sanz-Pamplona R, Brix S, Leeming DJ, Karsdal MA, Moreno V. Excessive collagen turnover products are released during colorectal cancer progression and elevated in serum from metastatic colorectal cancer patients. *Sci Rep* 2016; 6:30599.
178. Hotary K, LI XY, Stevens SL, Weiss SJ. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* 2006; 20:2673-2686.
179. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011; 278:16-27.
180. Rowe GS, Weiss SJ. Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell-stroma interface. *Annu Rev Cell Dev* 2009; 25:567-95.
181. Brown GT, Murray GI. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 2015; 237:273-281.
182. Bates AL, Pickup MW, Hallett MA, Dozier EA, Fingleton B. Stromal matrix metalloproteinase 2 regulates collagen expression and promotes the outgrowth of experimental metastases. *J Pathol* 2015; 235(5):773-83.
183. Mendosa AM, VanSaun MN, Ustione A, Piston DW, Fingleton BM, Gordon DL. Host and tumor derived MMP13 regulate extravasation and establishment of colorectal metastasis in the liver. *Mol Cancer* 2015; 14:49.
184. Swartz MA, Fleury ME. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9:229-56.
185. Shawan PC, Rahman A, Kraning-Rush CM, Romero B, Somasegar S, Torre OM et al. Comparative mechanisms of cancer cell migration through 3D matrix and physiological microtracks. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 308(6):436-447.

186. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999; 27:183-201.
187. Lui AY, Zheng H, Ouyang G. Periostin, a multifunctional matricellular protein in inflammatory and tumor microenvironments. *Matrix Biol* 2014; 37:150-6.
188. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G et al. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(7):1279-1288,
189. Cui D, Huang Z, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in priming the tumor microenvironments for tumor progression. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(23):4287-4291.
190. Deraz EM, Kudo Y, Yoshida M, Obayashi M, Tsunematsu T, Tani H et al. MMP-10/stromelysin-2 promotes invasion of head and neck cancer. *PLoS One* 2011; 6:e25438.
191. Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Tsunematsu T, Kondo T, Subarnbhesaj A et al. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *J Biol Chem* 2012; 287:38716-38728.
192. Xu X, Chang W, Yaan J, Han X, Tan X, Ding Y et al. Periostin expression in intra-tumoral stromal cells is a prognostic and predictive for colorectal carcinoma via creating a cancer supporting niche. 2015; 7(1):798-813.
193. Oh HJ, Bae JM, Wen XY, Cho NY, Kim JH, Kang GH. Overexpression of POSTN in tumor stroma is a poor prognostic indicator of colorectal cancer. *J Pathol Transl Med* 2017; 51:306-313.
194. Li Z, Zhang X, Yang Y, Yang S, Dong Z, Du L, et al. Periostin expression and its prognostic value for colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2015; 16:12108-12118.
195. Bao S, Ouyang G, Bai X, Huang Z, Ma C, Lui M et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell* 2004; 5:329-338.
196. Wu G, Wang X, Zhang Z. Clinical implications of periostin in the liver metastasis of colorectal cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2013; 28:298-302.
197. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):563-72.

198. Kopfstein L, Christofori G. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contribution by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(4):449-68.
199. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29(16):15-8.
200. Xiao ZM, Wang XY, Wang AM. Periostin induces chemoresistance in colon cancer cells through activation of the PI3K/Akt/survivin pathway. *Biotechnol Appl Biochem*. 2015; 62(3):401-6.
201. Li A, Hasui K, Yonezawa S, Tanala S, SAto E. Immunohistochemical analysis of pericryptal fibroblast sheath and proliferation epithelial cells in human colorectal adenomas and carcinomas with adenoma components. *Pathol Int* 1999; 49:426-434.
202. Monslow J, Govindaraju P, Puré E. Hyaluronan-a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Frontiers in Immunology* 2015; 6:231.
203. Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater* 2014; 10(4):1558-1570.
204. Toole BP. Hyaluronan-CD44 interactions in cancer: Paradoxes and possibilities. *Clin Cancer Res* 2009; 15(24):7462-7469.
205. Nikitovic D, Tzardi M, Berdiaki A, Tsatsakis A, Tzanakakis GN. Cancer microenvironment and inflammation: role of hyaluronan. *Fron Immunol* 2015; 6:169.
206. Pure E, Cuff CA. A crucial role for Cd44 in inflammation. *Trends Mol Med* 2001; 7:213-21,
207. Zhuo L, Kanamori A, Kannagi R, Itano N, Wu J, Hamaguchi M et al. Shap potentiates the Cd44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *J Biol Chem* 2006; 281:20303-14.
208. Pasonen-Seppanen S, Karvinen S, Torronen K, Hyttinen JM, Jokela T, Lammi MJ et al. EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations

- with epidermal proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 2003; 120:1038-44.
209. Itano N, Kimata K. Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression. *Semin Cancer Biol* 2008; 18(4):268-274.
210. Wu ZQ, Peng C, Sun L, Li XF, Kuang DM. Neutrophils promote motility of cancer cells via a hyaluronan-mediated TLR4/PI3K activation loop. *J pathol* 2011; 225:438-47.
211. Fieber C, Baumann P, Vallon R, Termeer C, Simon JC, Hofmann M et al. Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J Cell Sci* 2004; 117:359-67.
212. Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol* 1997; 15:778-783.
213. Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One* 2009; 4:e4632.
214. Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA, Wilcox-Adelman SA, Boucher Y, Jain RK et al. Mechanical compression drives cancer cells towards invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109:911-916.
215. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumoral vessels. *Nature* 2004; 427:695.
216. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:393-410.
217. Stylianopoulos T, Jain RK. Combining two strategies to improve perfusion and drug delivery in solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:18632-18637.
218. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005; 19(8):877-90.
219. Cui G, Pinto D, Begthel H, Destrée O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 2005; 129:626-638.

220. Hawinkels LJ, Paauwe M, Verspaget HW, Wiercinska E, van der Zon JM, van der Ploeg K et al. Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF-beta signaling in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 2014; 33:97-107.
221. Jiang L, Shen Y, Guo D, Yang D, Liu J, Fei X et al. EpCAM-dependent extracellular vesicles from intestinal epithelial cells maintain intestinal tract immune balance. *Nat Commun* 2016; 7:13045.
222. Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP et al. IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc Natl Acad Sci* 2015; 112:2487-2496.
223. Shao J. Roles of intestinal myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. *Cancer Res* 2006; 66:846-855.
224. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 2010; 12:468-476.
225. Henriksson ML, Edin S, Dahlin AM, Oldenborg PA, Öberg Å, Van Guelpen B et al. Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. *Am J Pathol* 2011; 178:1387-1394.
226. Mukaida N, Sasaki S. Fibroblasts, an inconspicuous but essential player in colon cancer development and progression. *World J Gastroenterol* 2016; 22(23):5301-5316.
227. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59:5002-5011.
228. Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L et al. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:4966-4971.
229. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2082-2090.

230. Koliaraki V, Roulis M, Kollias G. Tpl2 regulates intestinal myofibroblast HGF release to suppress colitis-associated tumorigenesis. *J Clin Invest* 2012; 122:4231-4242.
231. Dubé PE, Yan F, Punit S, Girish N, McElroy SJ, Washington MK et al. Epidermal growth factor receptor inhibits colitis-associated cancer in mice. *J Clin Invest* 2012; 122:2780-2792.
232. Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin EW, de la Chapelle A et al. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004; 23:7366-7377.
233. Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, De Waver O. Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. *Front Oncol* 2015; 5:63.
234. Herrera A, Herrera M, Alba-Castellon L, Silva J, Garcia V, Loubat-Cassanovas J et al. Protumorigenic effects of Snail-expression fibroblasts on colon cancer cells. *Int J Cancer* 2014;134:2984-90.
235. De Boeck A, Hendrix A, Maynard D, Van Bockstal M, Daniels A, Pauwels P et al. Differential secretome analysis of cancer-associated fibroblasts and bone marrow-derived precursors to identify microenvironment regulators of colon cancer progression. *Proteomics* 2013; 13:379-88.
236. Nakayama H, Enzan H, Yasui W. Lack of pericryptal fibroblastic cells adjacent to intestinal epithelial metaplastic gastric glands. *Histopathology* 2006; 48(5):610-2.
237. Balázs M, Kovács A. The "transitional" mucosa adjacent to large bowel carcinoma-electron microscopic features and myofibroblasts reaction. *Histopathology* 1982; 6:617-629.
238. Powell DW, Oinchuk IV, Saada JI, Chen Xin, Mifflin RC. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol* 2011; 73:213-37.
239. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *annu Rev Physiol* 2009; 71:241-60.
240. Shedden JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-

associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. Proc Natl Acad Sci 2006; 103:14842-47.

Biografija

Sanja Despotović rođena je u Novom Pazaru, 1988. godine. Osnovnu i srednju školu završila je u Raški.

Medicinski fakultet upisala je 2007. godine. Od druge godine studiranja bila je demonstrator na Institutu za histologiju i embriologiju "Aleksandar Đ. Kostić".

Medicinski fakultet završila je 2013. godine, sa prosečnom ocenom 9.70.

Završila je specijalističke akademske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, modul Citologija, histohemija, elektronska mikroskopija, embriologija i odbranila završni specijalistički akademski rad "Celularne i strukturne odlike lamine proprije sluznice debelog creva zdravih osoba", 2015. godine.

Upisala je doktorske studije iz Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu, 2014. godine.

Postaje saradnik u nastavi na Institutu za Histologiju i embriologiju 2014. godine; 2016. godine izabrana je u zvanje asistenta.

Angažovana je na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, "Molekularna regulacija strukturne organizacije limfatičnih organa" kojim rukovodi profesor doktor Novica Milićević.

Član je Društva imunologa Srbije i Srpskog udruženja za mikroskopiju.

Učesnik je brojnih stranih i domaćih kongresa.

U saradnji sa drugim autorima, objavila je 5 radova, dok je prvi autor u 2 rada objavljenih u časopisima sa SCI liste.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Sanja Despotović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

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

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.06.2018.

Sanja Despotović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sanja Despotović

Broj upisa _____

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada Strukturne i celularne promene nezahvaćene sluznice debelog creva
osoba sa adenokarcinomom kolona

Mentor prof. dr Živana Milićević

Komentor prof. dr Dragoslav Milošević

Potpisani dr Sanja Despotović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.06.2018.

Sanja Despotović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

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

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.06.2018

Čana Đeovićubiš

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.