



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Младен Павловић

**УТИЦАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ IL-32 НА СТВАРАЊЕ КРВНИХ
СУДОВА У КАРЦИНОМУ ЖЕЛУЦА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КРАГУЈЕВАЦ, 2020.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Mladen Pavlović

**INFLUENCE OF IL-32 EXPRESSION ON BLOOD
VESSEL FORMATION IN GASTRIC CANCER**

Doctoral Dissertation

KRAGUJEVAC, 2020.

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Младен Павловић
Датум и место рођења: 19.05.1977., Крагујевац
Садашње запослење: Клинички центар Крагујевац, специјалиста опште хирургије
Докторска дисертација
Наслов: Утицај експресије IL-32 на стварање крвних судова у карциному желуца
Број страница: 127
Број слика: 43 (39 графикана, 4 табела)
Број библиографских података: 381
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија, Онкологија
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме:
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-65/21 од 18.01.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Проф. др Драган Чановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник 2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан 3. Проф. др Жељко Лаушевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан 4. Доц. др Драгче Радвановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан 5. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране дисертације:

Doctoral dissertation identification page

Author
Name and surname: Mladen Pavlović
Date and place of birth: 19.05.1977., Kragujevac
Current employment: Clinical Center Kragujevac, Surgeon
Doctoral Dissertation
Title: INFLUENCE OF IL-32 EXPRESSION ON BLOOD VESSEL FORMATION IN GASTRIC CANCER
No. of pages: 128
No. of images: 43 (39 charts, 4 tables)
No. of bibliographic data: 381
Institution and place of work: Faculty of medical sciences Kragujevac
Scientific area (UDC): Medicine
Mentor: Ivan Jovanovic, MD PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific fields of Microbiology and immunology, Oncology
Assessment and defense
Topic application date:
Decision number and date of acceptance of the doctoral topic: IV-03-65/21 from 18.01.2017. ГОДИНЕ
Commission for the evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none">1. Dragan Čanović, MD PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Surgery, president2. Nebojša Arsenijević, MD PhD, full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and immunology, Oncology, member3. Željko Laušević, MD, PhD, full professor at the Medical Faculty, University of Belgrade for the narrower scientific field of Surgery, member4. Dragče Radovanović, MD, PhD, Assistant professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Surgery, member5. Gordana Radosavljević, MD, PhD, Assistant professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and immunology, member
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation:
Date of defense of the dissertation:

Абстракт:

Карцином желуца (ГС) представља један од најчешћих карцинома у свету, који се често дијагностикује у поодмаклој фази са лошом прогнозом, што указује на потребу за новим дијагностичким и прогностичким маркерима. Циљ студије био је да се утврди експресија IL-32, проинфламаторних и ангиогених медијатора код пацијената са дифузним и интестиналним карциномом желуца и повезаност са клиничкопатолошким параметрима, као и експресија у туморском, перитуморском и здравом ткиву код пацијената са интестиналним карциномом желуца и однос са тежином болести. Анализирани су узорци ткива дифузног и интестиналног типа тумора 70 пацијената са карциномом желуца, као и узорци ткива интестиналног типа тумора 60 пацијената са карциномом желуца. Експресија IL-32, васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF), IL-17, IL-8 и CD31 мерена је имунохистохемијски. Експресија IL-32 била је значајно нижа у узорцима ткива пацијената са дифузним типом карцинома желуца, са тежим и прогресивнијим обликом ове болести. Експресија IL-17 је такође смањена код пацијената са дифузним типом карцинома желуца. Микроваскуларна густина је смањена код дифузног типа карцинома желуца. Експресија IL-32, VEGF и IL-17, као и микроваскуларна густина (MVD) су смањени у перитуморским ткивима у поређењу са туморским ткивом интестиналног типа желудачног карцинома. Даље, уочена је интензивнија експресија IL-32 и VEGF и појачана MVD код пацијената са тешким и прогресивним ГС. Смањена експресија IL-32 у туморском ткиву пацијената са дифузним типом карцинома желуца може утицати на његову улогу у ограничавању започетих проинфламаторних и проангиогених процеса. Већа експресија IL-32, VEGF и интензивна MVD у туморском ткиву пацијената са интестиналним типом ГС са уочљивом инвазијом лимфних судова може се сматрати знаком малигне прогресије тумора. Ово наглашава непрепознату улогу IL-32 у биологији дифузног типа карцинома желуца и указује на протуморигену и проангиогену улогу IL-32 у биологији интестиналног типа карцинома желуца.

Кључне речи: карцином желуца, IL-32, VEGF, IL-17, MVD

Abstract:

Gastric cancer (GC) represents one of the most common cancers worldwide, frequently diagnosed at advanced stages with poor prognosis, indicating on need for new diagnostic and prognostic markers. The aim of the study was to determine the expression of IL-32, proinflammatory and angiogenic mediators, in patients with diffuse and intestinal gastric cancer and the relationship with clinicopathological aspects, and in the tumor, peritumor and healthy tissue, in patients with intestinal gastric cancer and the relationship with the disease severity. The tissue samples of diffuse and intestinal types of tumor of 70 patients with gastric cancer were analyzed, and tissue samples of intestinal type of the tumor of 60 patients with gastric cancer were analyzed, respectively. Expression of IL-32, vascular endothelial growth factor (VEGF), IL-17, IL-8 and CD31 was measured by immunohistochemistry. IL-32 expression was significantly lower in tissue samples from patients with diffuse type of gastric cancer that is also a severe and more progressive form of this disease. Expression of IL-17 was also decreased in patients with diffuse type of gastric cancer. Microvascular density was diminished in diffuse type of gastric cancer. IL-32, VEGF and IL-17 expression as well as microvascular density (MVD) were diminished in adjacent tumor tissues compared with the tumor ones. Further, more intense expression of IL-32 and VEGF and enhanced MVD were noticed in patients with severe and more progressive GC. Downregulated expression of IL-32 in tumor tissue of patients with diffuse type of gastric cancer may implicate on its role in limiting ongoing proinflammatory and proangiogenic processes. Higher expression of IL-32, VEGF and intense MVD in the tumor tissue of GC patients with detectable lymph vessel invasion may be considered as a sign of the tumor's malignant progression. This emphasizes on unrecognized role of IL-32 in biology of diffuse type of gastric cancer, and indicates a protumorigenic and proangiogenic role of IL-32 in biology of intestinal type of gastric cancer.

Key words: gastric cancer, IL-32, VEGF, IL-17, MVD

Захвалница

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	4
1.1. Карцином желуца.....	4
1.1.1. Инциденца и морталитет	4
1.1.2. Морбидитет и морталитет кроз време	5
1.1.3. Етиологија.....	6
1.1.4. Анатомска класификација карцинома желуца	12
1.1.5. Хистолошка класификација карцинома желуца	12
1.1.6. Симптоми и дијагноза карцинома желуца	13
1.1.7. Хируршко лечење карцинома желуца.....	14
1.2. Интерлеукин 32	16
1.2.1. Секреција IL-32.....	16
1.2.2. Улога IL-32 у инфламацији	17
1.2.3. IL-32 у туморима.....	18
1.2.4. Клинички значај експресије IL-32 у туморима	18
1.2.5. Улога IL-32 у развоју карцинома	19
1.2.6. IL-32 и анти-туморска имуност.....	20
1.2.7. IL 32 и карцином желуца.....	21
1.2.8. IL-32 у ангиогенези	22
1.3. Интерлеукин 17	24
1.3.1. Улога IL-17 у инфламацији	24
1.3.2. IL-17 у туморима.....	24
1.3.3. IL-17 и карцином желуца	26
1.3.4. IL-17 у ангиогенези	26
1.4. Интерлеукин 8	28
1.4.1. IL-8 у туморима.....	28
1.4.2. Регулација експресије IL-8 у туморима	29
1.4.3. IL-8 и карцином желуца	29
1.4.4. IL-8 и ангиогенеза.....	30
1.5. Ангиогенеза.....	32
1.5.1. Ангиогенеза у физиолошким процесима.....	32
1.5.2. Ангиогенеза тумора	32
1.5.3. Механизми ангиогенезе	33

1.5.4. Васкулогенеза	34
1.5.5. Ангиогенеза „клијања“.....	35
1.5.6. Разлике између физиолошке и неоваскуларизације тумора.....	35
1.5.7. Ангиогенеза карцинома желуца.....	37
1.5.8. Инфламација и ангиогенеза код карцинома желуца.....	38
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	40
2.1. ГЛАВНИ ЦИЉЕВИ.....	40
2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	40
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	41
3.1. Одобрење етичког комитета.....	41
3.2. Испитивана популација	41
3.3. Фиксација ткива и бојење хематоксилином и еозином (H&E)	42
3.4. Имунохистохемијски метод бојења VEGF, IL-32, IL-17, IL-8 и CD31 ткивних исечака калупљених у парафину	42
3.5. Имунохистохемијско скоровање (Квантификација имунохистохемијског бојења)	43
3.6. Евалуација микроваскуларне густине (MVD) у карциномима хуманог порекла	44
3.7. Снага студије и величина узорка.....	45
3.8. Статистичка анализа	45
4. РЕЗУЛТАТИ	46
4.1. Карактеристике испитаника	46
4.1.1. Тежа и агресивнија форма болести код болесника са дифузним типом тумора.....	46
4.1.2. Мања експресија интерлеукина 32 повезана је са дифузним типом карцинома желуца	51
4.1.3. Мања микро-васкуларна густина у дифузном типу карцинома желуца.....	53
4.1.4. Мања експресија интерлеукина-17 у дифузном типу карцинома желуца ..	55
4.2. Анализа експресије IL-32, CD31, VEGF, IL-17 и IL-8 у ткиву интестиналног типа карцинома желуца.....	58
4.2.1. Експресија IL-32 у туморском ткиву повезана је са инвазијом лимфних судова.....	62
4.2.2. Микроваскуларна густина је повезана са TNM стадијумом и инвазијом крвних и лимфних судова	70
4.2.3. Експресија VEGF-а је повезана са TNM стадијумом тумора и инвазијом лимфних судова.....	77
4.2.4. Експресија IL-17 повезана је са туморском некрозом.....	84

4.3. Анализа експресије IL-8 у туморском, перитуморском и здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца	92
5. ДИСКУСИЈА	93
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	98
7. СКРАЋЕНИЦЕ.....	99
8. ЛИТЕРАТУРА.....	101

1. УВОД

1.1. Карцином желуца

1.1.1. Инциденца и морталитет

Карцином желуца представља важан здравствени и социо-епидемиолошки проблем у свету. Забележено је више од 1.000.000 нових случајева у 2018. и процењено 783.000 смртних случајева (што се изједначава са 1 на сваких 12 смртних случајева широм света), што га чини петим по учесталости уопште и трећим водећим узроком смрти од малигних болести (1). Стопе морбидитета и морталитета су два пута веће код мушкараца него код жена. Међу мушкарцима, то је најчешће дијагностикован и водећи узрок смрти од карцинома у неколико западноазијских земаља, укључујући Иран, Туркменистан и Киргистан (2). Стопе инциденце су изразито повишене у источној Азији (нпр. у Монголији, Јапану и Републици Кореји), док су стопе у Северној Америци и Северној Европи генерално ниске и еквивалентне онима које се виде широм афричких региона (1,3).

Неколико студија о миграцијама документовало је снажну еколошку компоненту у објашњавању регионалних варијација у стопама инциденце карцинома желуца. Стопа инциденце карцинома желуца међу јапанским мигрантима прве генерације на Хавајима била је нижа од стопе међу Јапанцима који живе у Јапану, а Јапанце друге генерације, рођене на Хавајима, прати даље смањење стопе, иако су и даље били више од белаца у популацији домаћина (4). *Helicobacter pylori* је главни фактор ризика за карцином желуца, и скоро 90% нових случајева карцинома желуца не-кардијалног порекла приписује се овој бактерији (5,6). Иако се често пријављују као један ентитет, желудачни карциноми углавном се разврставају у 2 топографске категорије. Стопа карцинома не-кардијалне регије желуца (који потиче из више дисталних региона) стално опада у последњих пола века у већини популација. Трендови се приписују непланираном тријумфу превенције (7), укључујући смањење преваленције *H. pylori* и напретка у чувању и складиштењу хране. Карцином кардије желуца (који се јавља у подручју уз езофагеално-гастрични спој) има епидемиолошке карактеристике сличније онима код аденокарцинома једњака (енгл. *Gastric cancer*, GC), а важни фактори ризика укључују гојазност и гастроэзофагеалну рефлуксну болест (енгл. *Gastroesophageal reflux disease*, GERD), Barrett-ов једњак (стање које је последица GERD-а) такође се сматра да повећава ризик; учесталост ових карцинома расте, посебно у земљама са високим дохотком (8–11).

У зависности од броја новооболелих према географским регионима, највише нових случајева на годишњем нивоу је у Азији (близу 770.000), затим у Европи (око 133.000), Латинској Америци и Карибима (близу 68.000), Африци (око 31.000) и Северној Америци (око 30.000). Остали региони су са значајно мањим бројем новооболелих на годишњем нивоу. Слични подаци добијени су и када се ради о броју преминулих на годишњем нивоу од малигнома желуца: Азија са непуних 585.000 умрлих, Европа (око 102.000), Латинска Америка и Кариби (близу 52.000) и остали региони са мање од 30.000 преминулих годишње (1,2).

Дистрибуција стопе обољевања према земљама показује да је карцином желуца најчешћи у Кини, Јапану, Индији, Кореји, Русији. Ова болест је ређа у земљама северне и западне Африке, и Северне Америке (2,3,8). Старосно стандардизоване стопе инциденције су око два пута веће код мушкараца него код жена, у распону од 4,9 у западној Африци до 32,1 у источној Азији за мушкарце и од 3,8 у западној Африци до 13,2 у источној Азији за жене (1,2). У развијеним земљама и земљама у развоју, учесталост је већа код мушкараца него код жена. Интестинални тип је два пута чешћи код мушкараца широм света. Тумори дифузног типа једнако су заступљени код оба пола.

Карцином желуца је трећи водећи узрок смрти од карцинома код оба пола широм света (783.000 смртних случајева, 8,2% од укупног броја) (1–3). Највеће процењене стопе смртности су у источној Азији (23 на 100.000 у мушкараца, 9.4 на 100.000 у жена), а најниже у Северној Америци (2.4 и 1.3, респективно). Ове стопе показују тенденцију благог пада у односу на раније податке (из 2012. године) (12). Високе стопе смртности су такође забележене код оба пола у Централној и Источној Европи, те у Централној и Јужној Америци. Ова висока смртност је вероватно последица касног дијагностиковања, најчешће онда када је болест унапредовала. Земље попут Јапана које су усвојиле програм скрининга успешно су побољшале преживљавање од ове болести (13–15).

У Србији према подацима GLOBOCAN- а за 2018. годину, карцином желуца се према учесталости не налази у првих 5 водећих. Инциденца за оба пола је 1213 новооболелих на годишњем нивоу, а морталитет 1007 умрлих. Због тога се овај карцином налази на 12. месту по учесталости у нашој земљи, а 7. месту по смртности. Код мушкараца желудачни карцином је на шестом месту по учесталости (са близу 800 новооболелих годишње, или 3,2% од укупног броја), и на шестом месту по смртности (око 650 умрлих, или 4,2%) (2). Код жена је скоро два пута ређи, што одговара и подацима на светском нивоу.

1.1.2. Морбидитет и морталитет кроз време

Учесталост карцинома опада широм света по стопи од 2% до 3% годишње. До касних 1930-их, малигном желуца је био водећи узрок смрти од карцинома у Сједињеним Америчким Државама, да би временом инциденца као и морталитет у САД значајно опали. Пад учесталости се односи на промене начина живота и утицај фактора животне средине. Смањење желудачног карцинома је заступљено у оба пола (16–18). У Сједињеним Америчким Државама, ово може бити повезано са повећаном употребом расхладних уређаја за складиштење хране. Воће и поврће постају све доступнији што је смањило употребу слане и димљене хране. Честа употреба антибиотика за разне инфекције може ерадииковати *Helicobacter pylori* која је један од главних узрока карцинома желуца (5,6,19).

Пад инциденције не односи се на све врсте карцинома желуца. У ствари, ово смањење примарно се односи на туморе дисталног дела желуца, док је учесталост карцинома кардије у порасту. Учесталост интестиналног типа је нагло опала током последњих неколико деценија вероватно зато што је више повезана са факторима околине и инфекцијом *Helicobacter pylori*. Учесталост дифузног типа је постепено опадала, што је више повезано са генетским факторима. Регресија морталитета од карцинома желуца не зависи само од инциденце. На то утиче напредак у раном откривању тумора у излечивој фази и премалигним лезијама. Овај тренд је посебно изражен у Јапану, где се постепено

смањење смртности од карцинома желуца од 1970. године објашњава широком применом ендоскопског и радиолошког скрининга (14,15,20). За ову болест стопа смртности се повећава са годинама. Процент смртних случајева карцинома желуца је највећи међу људима у доби од 75 до 84 године, а средња старосна смртност у САД-у је 72 године (3,18,21,22).

1.1.3. Етиологија

Карцином желуца је мултифакторска болест у чијој генези инфекција бактеријом *Helicobacter pylori* игра главну улогу, посебно за карцином дисталног дела желуца. Фактори ризика за карцином желуца укључују: старост (> 60 година), начин живота (пушење, конзумирање алкохола, конзумирање хране богате нитратима или нитритима) (8,23,24), инфекција *H. pylori* (5,6,19), болести желуца (Menetrier-ова болест), аутоимунски атрофични гастритис, пернициозна анемија и интестинална метаплазија, генетски фактори, лична или позната анамнеза карцинома желуца (8,25,26). Међу њима, инфекција *H. pylori* се сматра главним фактором ризика и могућим окидачем у 65%-80% случајева карцинома желуца (6,27,28). Инфекција *Helicobacter-ом pylori* је најзначајнији узрок спорадичног дисталног карцинома желуца(5). Током хроничног запаљења индукованог *Helicobacter-ом pylori* и каснијом карциногенезом, различити фактори, укључујући бактеријске, домаћинске и еколошке факторе, међусобно утичу на поправљање оштећења. То може да узрокује пролиферацију, апоптозу и неке епигенетске модификације тумор супресорских гена, што би на крају могло да индукује онкогенезу (24,27–29). Неки пацијенти са перзистентном инфекцијом *Helicobacter-ом pylori* развијају желудачну атрофију праћену интестиналном метаплазијом, која се може развити у дисплазију (28,30). Да ли ерадикација *Helicobacter pylori* у одсуству диспластичних или неопластичних промена спречава развој карцинома желуца није и даље разјашњено (31–33). Други патоген повезан са карциномом желуца је *Epstein-Barr* вирус. Овај патоген се налази у малигним ћелијама, али не у нормалним епителним ћелијама, од 80% карцинома желуца са лимфоидном стромом. Његова улога у карциногенези остаје нејасна (34–36). Око 10% случајева карцинома желуца су херeditарни (37,38). Сматра се да заиста наследни случајеви чине 1-3% свих малигнома желуца. Они се састоје од три главна синдрома: херeditарног карцинома желуца, желудачног аденокарцинома и проксималне полипозе желуца, и херeditарног колоректалног карцинома. У земљама и регионима где је учесталост ове болести ниска, већина породичних случајева вероватно је последица наследних мутација које повећавају ризик од рођења. Генетска основа - узрочне мутације у CDH1 (енгл. cadherin 1 gene) нађена је само у око 40% породица које су имале херeditарни карцином желуца. Мутације у CTNNA1 (енгл. catenin alpha 1 gene) су такође идентификоване као генетски узрок херeditарног желудачног карцинома (39–42). Процењени доживотни ризик од развоја наследног карцинома желуца до 80 година је 67% за мушкарце и 83% за жене. Инциденца карцинома дојке (углавном лобуларног типа) је повећана код жена са наследним карциномом желуца, од 10-12% до 20-40% (19). Тотална гастректомија се препоручује код ризичних чланова породице старијих од 20 година који имају мутацију CDH1, или код особа са позитивном биопсијом, тј. налазом који указује на малигну алтерацију без обзира на старост (13,43). Код оних млађих од 20 година са мутацијама CDH1 и онима старијим од 20 година који одаберу да се не оперишу или за

које је профилактичка гастректомија неприхватљива, препоручује се ендоскопски надзор (13,43,44). Код људи са другим наследним синдромима карцинома, као што су аденокарцином желуца и синдром проксималне полипозе желуца, пронађени су канцери желуца (45–47) и код оних са мутацијама у TP53 (енгл. tumor protein p53) (Li-Fraumeni синдром), APC (енгл. Adenomatous polyposis coli, фамилијарна аденоматозна полипоза), или STK11 (енгл. serine/threonine kinase 11) (Peutz-Jeghersov синдром) (38,48,49). Фактори животне средине играју важну узрочну улогу у онкогенези желуца. Недовољна конзумација воћа и поврћа и висок унос соли, нитрата и укишељене хране, као и пушење, повезани су са повећаним ризиком од карцинома желуца (23). Гојазност је такође фактор ризика (8,25,26) и гастро-езофагеална рефлуksна болест и гојазност су јасно повезани са развојем карцинома једњака и желуца и доприносе повећању њихове учесталости (50–52).

Helicobacter pylori инфекција

Фактор вируленције CagA (енгл. cytotoxin-associated gene A) потенцијално може изазвати карцином узрокујући хронично запаљење (53). Насупрот томе, антиоксиданти, као што су витамини А и С, садржани у свежем воћу и поврћу, типични за медитеранску исхрану, и зелени чај сматрају се заштитним факторима, јер су повезани са смањењем преваленције карцинома желуца (25,44,51,52). Естроген се сматра заштитним фактором за карцином желуца, што објашњава већу учесталост код мушкараца у поређењу са женама (3:1).

Helicobacter pylori инфицира желуца код око 60% одраслих у свету. Ова инфекција је важан и утврђен фактор ризика за карцином желуца. Најчешћа је хронична инфекција у свету, она погађа око 50% светске популације, али мање од 1% заражених особа ће развити карцином желуца (5,6). Јасно је показано да преваленца инфекције *Helicobacter pylori* варира између развијених земаља (мање од 40%) и земаља у развоју (80% - 90%). Просечна преваленција *H. pylori* износи 35 процената у земљама са високим дохотком и 85 процената у земљама са ниским приходима (54). Највећа преваленца је у Азији; у Јужној Кореји, инфекција достиже 90 процената у доби од 20 година (33,55). Регије са високом стопом учесталости карцинома желуца имају и високу стопу серопреваленције за *H. pylori*. Међутим, у неким регионима Африке и Јужне Азије, посебно Индије, стопе инфекције *H. pylori* су високе, али стопа оболевања од рака желуца и даље је ниска (5). Докази из претклиничких студија указују на то да *H. pylori* у интеракцији са дијеталним факторима попут соли утиче на ризик од рака (23). Чини се да инфекција *H. pylori* смањује и биорасположивост витамина С и гвожђа (31,32). Што је дуже време инфекције и што је већи утицај на желудачну слузницу, већа је вероватноћа да ће се развити карцином желуца. Место тумора је највероватније тамо где је мукоза највише погођена (32,56). Они који развију екстензиван гастритис и желудачну атрофију изложени су повећаном ризику од карцинома. У студијама преканцерозних лезија или желучане атрофије, искорењивање *H. pylori* промовише регресију ових прекурсора рака (32,33,57). Рано искорењивање *H. pylori* повезано је са смањеним ризиком од рака (32), што је искорењивање инфекције „поставило“ као стратегију за превенцију рака.

Ову бактерију су први описали 1983. године Warren и Marshall (Нобелова награда 2005.) и тек 1994. године класификована је као карциноген I класе. Тренутни епидемиолошки докази указују на то да се инфекција обично стиче у детињству (30,54). Иако инфекција *H. pylori* није довољан услов за развој карцинома желуца, она је повезана са високом

преваленцом ове болести и може се наћи и у слuzници желуца пацијената са хроничном инфламацијом (54,58). Подаци из клиничких испитивања су показали да ерадикација *H. pylori* може ефикасно да смањи развој преканцерозних лезија и карцинома желуца (31,33). Gui D. Eslick објавио је 2006. године резултат 5 мета-анализа које су показале позитивну повезаност између ове инфекције и карцинома желуца. Збирне процене из ових пет мета анализа кретале су се између 1.92- 2.65 (средња вредност 2.28) са интервалима поузданости у распону од 1.35 до 3.55. Истраживања су касније показала да су *H. pylori* CagA⁺, VacA⁺ тип s1 и m1 агресивнији и „канцерогенији“ од других типова и да удруживање има најјачи ефекат (57,59). Многе скорашње студије (рандомизирани студије) су проучавале рано искорењивање инфекције у превенцији карцинома желуца. Fusco је са сарадницима (60) објавила 2009. године мета-анализу 7 рандомизираних студија које су успоређивале ерадикацијски третман без лечења код *H. pylori*- позитивних пацијената и које су процењивале карцином желуца или прогресију пренеопластичних лезија током праћења. Свеукупно, 37 од 3388 (1,1%) третираних пацијената развило је карцином желуца у поређењу са 56 од 3307 (1,7%) нетретираних (контролних) учесника. Механизам карциногенезе није добро познат. Инфекција *H. pylori* може изазвати хронични гастритис, ово хронично стање може индуковати атрофију слuzнице желуца и интестиналне метаплазије за које се сматра да су преканцерозне лезије. У анализи 6 студија са укупно 6695 учесника у трајању од 4 до 10 година, релативни ризик за карцином желуца био је 0,65 (95% CI, 0,43 до 0,98) (61,62). Стога је закључено да искорењивање инфекције *Helicobacter*-ом *pylori* смањује ризик од карцинома желуца. Један од главних корака у превенцији карцинома желуца је идентификација особа оболелих од *H. pylori* са високим ризиком од карцинома желуца, тако да ови појединци могу бити циљани терапијским интервенцијама. Најновији подаци су показали да се инфекција *H. pylori* карактерише високим нивоом генетске разноликости. Поређење карцинома желуца и карцинома желудачне патологије повезане са *H. pylori* је показало разлике између сојева *H. pylori*, посебно присуства или одсуства хромозомског региона названог оток патогености cag (PAI) (19). Доступни подаци показују да је ризик од карцинома желуца веома низак код особа које „носе“ *H. pylori* сојеве који немају cag PAI. Међу особама које „носе“ сојеве који садрже cag PAI, ризик од карцинома желуца је вероватно већи и условљен је другим факторима (24).

Фактори животне средине

Дуван

Пушење је потврђен фактор ризика за карцином желуца. У великој популационој студији у Европи (EPIC), 17,6% случајева карцинома желуца „приписано је“ пушењу (63). Збирна анализа две популационе кохортне студије у Јапану показала је да је у поређењу са онима који никада нису пушили, релативни ризик за карцином желуца код садашњих пушача био 1.84, а за пушаче у прошлости 1.77 (64). За карцином желуца, јапанска 10-годишња студија је открила да су прошли и садашњи пушачи имали повећан ризик од карцинома желуца у дисталном делу у односу на непушаче са релативним ризиком од 2,0 и 2,1, респективно (65,66). Систематски преглед је потврдио да је релативни ризик за тренутне пушаче процењен на 1.56 (95% CI 1.36–1.80) за јапанску популацију и закључио да пушење дувана умерено повећава ризик од карцинома желуца, при чему разлика међу половима износи 1.79 (1.51–2.12)) и 1,22 (1,07–1,38) код мушкараца и жена (67,68).

Пушење повећава ризик за малигнومه кардије и не- кардијалне туморе. Такође је показано да је ризик од пушења већи код конзумирања алкохола и зависи од дозе (65). Ризик се смањује код престанка пушења > 10 година (67,69).

Алкохол

Алкохол је важан фактор ризика за карцином желуца. Недавна мета-анализа је показала да конзумација алкохола повећава ризик од карцинома желуца са односом изгледа (ОР) од 1,39 (95% СI 1,20 - 1,61) (70). Поред тога, интензивна конзумација алкохола је процењена као фактор ризика у ЕРIS студијама са РР од 1,6 и 1,4 респективно (71,72). Zaridze и сарадници (73) описали су повећан ризик од карцинома желуца код мушкараца и жена који редовно конзумирају јака алкохолна пића. Уочена је директна корелација између конзумирања алкохола и дувана и ризика од карцинома желуца у популационој проспективној кохортној студији (65,74). Студија из ове лабораторије показала је позитивну корелацију између конзумације алкохола и пушења цигарета са профилем липида у крви код пацијената са карциномом желуца (74).

Исхрана

а) Со. Многе еколошке, кохортне и контролне студије су потврдиле улогу соли у желучаној карциногенези и показале позитивну повезаност са карциномом желуца (23,75). Чини се да је ризик повезан са дозом соли у храни. D'Elia је 2012. године објавио (76) мета-анализу потрошње соли и ризика од карцинома желуца. Он је пронашао удружени релативни ризик од 1,68 са СI 1,17 - 2,41. Тајма и др. (77) открили су да склоност сланим намирницама, укључујући укишељено поврће и сушене и сољене рибе, типичну традиционалну јапанску храну, показује значајно позитивну повезаност са карциномом желуца са релативним ризиком од 2,60. Неколико биолошких маркера у крви и урину анализирано је у еколошким истраживањима и открило значајну и јаку корелацију између количине соли која се излучује у урину и смртности од карцинома желуца код мушкараца и жена у Јапану (78), као и у свету (79–81). У ери пре *Helicobacter*-а, нађено је да натријум хлорид (NaCl) побољшава канцерогене ефекте хемијских карциногена као што су MNNG и 4-нитрохинолински 1-оксид (4-NKO) у желуцу (82,83), вероватно због смањења вискозности слузи и оштећења заштитне мукозне баријере. Касније, након открића бактерија у хуманом желуцу, Nozaki et al. показали су (84,85) како исхрана са високим дозама соли појачава ефекте инфекције *H. pylori* на карциногенезу желуца. Учесталост карцинома желуца износила је 15% у групи са нормалном исхраном и 33%, 36% и 63% у групама са 2,5%, 5% и 10% NaCl, што показује повећање зависно од дозе. Смањење уноса соли би стога могло бити једна од стратегија за смањење учесталости карцинома желуца код људи.

б) N-нитрозо једињења (NOS). Нитрити и нитрати су природни молекули у поврћу и такође се додају сувом и прерађеном месу да би одложили кварење и раст патогених бактерија. Истраживања у протеклих 15 година довела су до промене парадигме у нашим идејама о здравственим ефектима и нитрита и нитрата. Недостаје епидемиолошки доказ који повезује карцином желуца код људи са нитритима и нитратима у исхрани. Преглед епидемиолошке литературе (86) показао је да су докази неуверљиви, посебно када су други фактори као што је инфекција *Helicobacter*-ом *pylori* снажно повезани са ризиком од

карцинома желуца. Ажурирани преглед у 2012. (87) и холандска кохорта (88) донели су чврсти закључак да нема повезаности, између стварања нитрозамина и карцинома желуца.

в) Унос меса и масти. Већи унос меса (црвено и прерађено месо) повећава ризик од некардијалног карцинома желуца, посебно код субјеката инфицираних *Helicobacter pylori*. Неколико потенцијалних механизма може објаснити овај ефекат. Прво, када се кува на високој температури дуже време, црвено и прерађено месо су главни извор канцерогених састојака, укључујући полицикличне ароматичне угљоводонике, хетероцикличне аminer и N-нитрозо једињења, који могу играти важну улогу у онкогенези (89,90). Друго, повећан унос гвожђа повезан са конзумирањем црвеног и прерађеног меса такође може играти улогу у онкогенези узрокујући оксидативна оштећења и укључивајући ендогено стварање канцерогених N-нитрозо једињења. Неколико великих проспективних истраживања карцинома и исхране указало је на потенцијалну повезаност између веће потрошње црвеног и прерађеног меса и ризика од карцинома желуца (91–93). У EPIC студији потврђена је ова повезаност, на сваких 50 g/дан повећане количине конзумираног меса, ризик од карцинома желуца је већи за 2,45 пута (94).

г) Воће, поврће и витамин С. Воће и сирово поврће богато витамином С и антиоксидансима смањује ризик од карцинома желуца према панелу кохортних и контролних студија случаја. Недавне студије и мета анализе ипак су показале да је заштитни ефекат слабији од раније описаног (95–98). Витамин С може се повезати са смањеним ризиком од карцинома желуца инхибирањем формирања N-нитрозо једињења. Larsson је 2006. објавио мета-анализу са заштитним ефектом са највећим уносом (99). Остали микронутријенти који имају могуће заштитне ефекте укључују цинк, витамин Е и каротеноиде (100,101).

Пол

У поређењу са женама, мушкарци имају већи ризик од оба кацинома - кардије (5-пута) и некардијалног (2-пута) (1,2). Разлози за такве разлике нису јасни. Еколошка или професионална изложеност могу играти улогу. На пример, мушкарци су историјски чешће пушили дуванске производе, иако се чини да повећане стопе код мушкараца и даље постоје чак и у земљама у којима мушкарци и жене имају сличне обрасце конзумирања дувана (65,74,102). Алтернативно, полне разлике могу одражавати физиолошке разлике. Естрогени могу штитити од онкогенезе. Код жена, одложена менопауза и повећана плодност могу смањити ризик од карцинома желуца, док анти-естрогенски лекови, нпр. Тамоксифен, могу повећати стопу карцинома (103–105). Ови хормони могу пружити заштиту од карцинома желуца током плодних година жена, али њихов ефекат се смањује након менопаузе, тако да жене добијају карцином желуца на начин сличан мушкарцима, иако са заостатком од 10 до 15 година (106–108).

Нестероидни анти-инфламацијски лекови

Постојећи докази указују на то да унос нестероидних антиинфламацијских лекова (NSAIL) може имати инверзну повезаност са ризиком од карцинома желуца. Две мета-анализе опсервационих студија показале су инверзну повезаност између употребе аспирина или било ког другог NSAIL и карцинома кардије и некардијалног карцинома

(109,110), док је друга показала инверзну повезаност употребе аспирина са не-кардијалним карциномом желуца, али не и са карциномом кардије (111). Две скорије мета-анализе (једна са 13, а друга са 15 студија) су показале инверзну повезаност између употребе аспирина и свих типова карцинома желуца (ОР ~ 0,65), са малом разликом између контроле случаја и кохортних студија у овом погледу (112,113). Ове две студије нису приказале резултате по под-локацијама карцинома. С друге стране, у збирној анализи седам клиничких испитивања дневне употребе аспирина (која је првобитно рађена за превенцију „васкуларних догађаја“), ризик од смрти од карцинома желуца у групи која узима аспирин није била нижа него у контролној групи: релативни ризик (95% CI) је био 1,85 (0,81-4,23) за 0-5 година праћења и 3,09 (0,64-14,9). Међутим, ове процене су засноване само на 36 смртних случајева (114).

Гастро-езофагеална рефлуксна болест (GERD)

GERD је снажно повезан са ризиком од аденокарцинома једњака, са приближно 5-7-струким повећањем ризика (52). Неколико студија је такође пријавило статистички значајну повезаност између GERD-а и карцинома кардије (115,116), са повећаним ризиком од 2-4 пута у већини студија, иако се не слажу све студије (117–119). Неки истраживачи су сугерисали да постоје два различита облика карцинома кардије: један сличан езофагеалном аденокарциному и повезан са GERD и један сличан не-кардијалном карциному желуца и повезан са тешким атрофичним гастритисом и инфекцијом *H. pylori* (50,120,121). Овај образац, ако заиста постоји, могао би да објасни нулту асоцијацију уочену код неких популација. Ако је повезаност између GERD-а и карцинома кардије стварна, онда механизам може бити сличан ономе за повезаност између GERD-а и аденокарцинома једњака: GERD може узроковати интестиналну метаплазију са потенцијалном прогресијом до аденокарцинома (19,57,122). Алтернативно, међутим, езофагеални аденокарциноми су суседни и често прелазе горњу границу желуца, тако да се могу погрешно класификовати као карциноми желуца (123,124). Нулта или инверзна асоцијација је пријављена за GERD и не-кардијални карцином желуца (117,125,126). Ово се може објаснити, барем делимично, повезивањем између атрофичног гастритиса и не-кардијалног карцинома. Тешки атрофични гастритис може бити повезан са смањеним излучивањем желучане киселине и мањим ризиком од GERD-а (127,128).

Зрачење

Дугорочно праћење преживелих из Хирошимае и Нагасакија утврдило је зрачење као фактор ризика за карцином желуца (129). Недавна студија преживелих након Hodgkin-овог лимфома такође је показала да је зрачење желуца повезано са ризиком од карцинома (130). Овај ефекат је био посебно изражен код оних који су истовремено примали прокарбазин као хемотерапијски агенс, тако да су они који су примали и високу дозу зрачења и прокарбазин имали 77 пута већи ризик од карцинома желуца (131).

1.1.4. Анатомска класификација карцинома желуца

Класификација тумора на основу анатомске локације је важна јер се прави карциноми желуца (не-кардијални) и гастро-езофагеалног споја (кардија) разликују у смислу учесталости, географске дистрибуције, узрока, клиничког тока болести и третмана. Карциноми гастроезофагеалног споја широко су категоризовани према *Sievert*-овој класификацији: 26 код правог карцинома кардије (*Sievert* тип II) туморски епицентар се налази 1–2 cm испод гастроезофагеалног споја; у дисталним езофагеалним аденокарциномима (*Sievert* тип I) и субкардијалном гастричном карциному (*Sievert* тип III) епицентри се налазе најмање 1 cm изнад или најмање 2 cm испод гастроезофагеалног споја, респективно(132) . Да ли се *Sievert*-ов тип II и тип III тумора биолошки разликују, није јасно. Међутим, *Sievert*-ова класификација је критикована јер не укључује никакве специфичне критеријуме за идентификацију аденокарцинома гастро-езофагеалног споја. Да би се помогла исправна класификација тумора, TNM класификација је увела поједностављене категорије: ако је епицентар тумора у дисталном једњаку, гастро-езофагеалном споју, или унутар проксималних 5 cm стомака, са масом тумора која се шири у гастро -езофагеални спој или дистални езофагус, класификован је као карцином једњака; ако је епицентар унутар 5 cm од гастроезофагеалног споја, али тумор се не протеже у гастроезофагеални спој или једњак, или ако је епицентар већи од 5 cm дистално од гастроезофагеалног споја, тумор се класификује као карцином желуца (123).

1.1.5. Хистолошка класификација карцинома желуца

Већина карцинома желуца су аденокарциноми желуца, али су веома хетерогени у погледу архитектуре и раста, диференцијације ћелија, хистогенезе и молекуларне патогенезе. Ова разноликост делимично објашњава разноликост хистопатолошких класификацијских шема. Најчешће се користе схеме Lauren (133) и WHO (134). Према Lauren- овој класификацији, желучани карциноми су подељени у два главна хистолошка типа, дифузни и интестинални, поред мешовитих и неодређених типова. Дифузни карциноми су слабо диферентовани и састављени су од усамљених или слабо кохезивних туморских ћелија у одсуству формирања жлезда. Насупрот томе, интестинални карциноми су углавном добро до умерено диференцирани и формирају glandуларне структуре које подсећају на колоректални аденокарцином, што објашњава име подтипа. Иако је Lauren-ова схема једноставна и робусна, WHO класификација, која укључује пет главних хистопатолошких ентитета карцинома, има предност што је у складу са хистолошким класификацијама карцинома у другим деловима црева и побољшава хармонизацију класификације. Категорије WHO су засноване на доминантним хистолошким обрасцима карцинома (тубуларне, папиларне, муцинозне, слабо кохезивне и ретке варијанте). Значајна особина често коегзистира са мање доминантним хистолошким елементима. WHO тубуларни и папиларни карциноми грубо одговарају интестиналном типу који је описала Lauren, а слабо кохезивни карциноми (који обухватају делове који се састоје делимично или потпуно од ћелија печатног прстена) одговарају Lauren дифузном типу (135,136). Lauren-ов интестинални тип карцинома желуца показује доминацију жлезданог епитела са ћелијама сличним интестиналним колонама, добром ћелијском кохезијом и потисном границом на инвазивној ивици. Lauren-ов дифузни тип карцинома желуца је састављен од распршених слабо кохезивних ћелија или малих група ћелија са малим или никаквим

формирањем жлезда и дифузном инфилтративном маргином. Туморске ћелије могу да садрже слуз и могу имати изглед ћелије печатног прстена. Карцином желуца који се састоји од 50% дифузног и 50% интестиналног типа, карцинома чврстог типа, и других који се не могу класификовати као дифузни или интестинални, називају се неодређени, некласификовани или мешани. Дифузни и интестинални карциноми имају различите клиничко-патолошке карактеристике (37,122): интестинални тип расте на прецизнији начин, знатно је већи у величини прије пробијања серозне површине, и има већу учесталост инвазије крвних судова и метастазе јетре и плућа, док се дифузни тип шири чешће путем лимфотока на плеуру и перитонеум. Однос мушког и женског мушког пола је 2,3 за интестинални тип и 1,5 за дифузни тип. Пацијенти са интестиналним типом тумора су у просеку 7 година старији.

Недавно су предложена три подтипа карцинома желуца на основу локације тумора, хистолошких карактеристика и клиничког тока (52): (1) проксимални недифузни карцином који се налази у желучаним кардијама и карактерише га glandуларна дисплазија и хронична инфламација без атрофије; (2) дифузни карцином који се може налазити било где у стомаку, нема glandуларну компоненту, и нема знакова инфламације или атрофије, и (3) дистални недифузни карцином који је интестинални тумор са хроничним гастритисом, атрофијом и интестиналном метаплазијом у позадини.

Трећа схема- класификација Гесеки дели карциноме на основу производње интрацелуларног муцина и степена диференцијације тубула у четири групе: група I: тубули су добро диференцирани, унутарћелијски муцин је сиромашан; група II: тубуле добро диференциране, интрацелуларни муцин богати; група III: тубуле слабо диференциране, интрацелуларни муцин сиромашан; група IV: тубуле слабо диференциране, унутарћелијски муцин (137–139). Већина студија, усредсређена на прогностички значај, није потврдила независну прогностичку вредност овог система (140–142). Иако тренутни хистопатолошки системи утичу на ендоскопске или хируршке изборе, они су још увек недовољни да би одредили прецизне третмане за поједине пацијенте.

1.1.6. Симптоми и дијагноза карцинома желуца

Већина пацијената са раним стадијем карцинома желуца су асимптоматски и стога се често поставља дијагноза када је болест у узнапредовалој фази. Најчешћи симптоми при дијагнози су анорексија, диспепсија, губитак тежине и бол у трбуху. Пацијенти са туморима у гастро-езофагеалном споју или проксималном желуцу такође могу имати дисфагију. Дијагноза карцинома желуца ослања се на ендоскопију и биопсију. Ендоскопски ултразвук и СТ грудног коша и абдомена су тренутно примарно средство за одређивање локално узнапредовалог рака желуца. Лапароскопија се користи да би се искључила мала количина перитонеалне метастатске болести. Мета-анализа је показала да су осетљивост и специфичност ендоскопске ултрасонографије такве да је могла да разликује туморе између T1-T2 (суперфицијални) и T3-T4 (напредне) стадијума, са осетљивошћу од 0·86 (95% CI 0·81-0·90) (143–145).

За дијагнозу, одређивање клиничког стадијума, процену одговора на лечење и скрининг за понављање након успешне терапије коришћени су туморски маркери желуца. Мада су пријављени многи биомаркери укључујући угљене хидратне антигене (CA) 72-4, алфа-фетопротеин, карбохидратни антиген (CA) 12-5, SLE, BSA-225, hCG и пепсиноген II/II ,

карциномембрионски антиген (CEA) и CA19-9 су још увек најчешће коришћени биомаркери у клиничкој пракси.

PET-CT и MRI се рутински не користе за дијагностику карцинома желуца, иако све више доказа сугеришу да би PET-CT могао побољшати стадирање кроз повећано откривање ангажованих лимфних чворова и метастатске болести. Ови тестови, међутим, нису увек информативни, посебно код пацијената са муцинозним туморима, јер би могли да подстакну болест (146,147). Чини се да се улога MRI такође увећава, посебно за детекцију перитонеалних метастаза (148,149). Интраперитонеалне метастазе су уобичајене код особа са карциномима желуца или гастроезофагеалног споја и тешко их је дијагностиковати конвенционалним методама.

Лапароскопско стадирање, са или без перитонеалне лаваже на малигне ћелије, остаје контроверзна, али експертске групе препоручују овај приступ код пацијената са потенцијално излечивим карциномом желуца или гастро-езофагеалног споја (150–152). Уколико перитонеална лаважа показује позитивну цитологију, у одсуству макроскопске перитонеалне метастазе, повезана је са лошим преживљавањем и дефинисана је као метастатска болест (153,154). Инфилтрација серозе је снажан показатељ перитонеалне карциноматозе, која се развија код до 60% пацијената са раком желуца.

1.1.7. Хируршко лечење карцинома желуца

Адекватна хируршка ресекција је једина куративна терапеутска опција за карцином желуца (155,156). Ендоскопска ресекција може бити погодна као алтернатива за операцију код малих добро диференцираних тумора (T1a) (157,158).

Напредак у технологији и минимално инвазивне стратегије створиле су нове могућности за операцију карцинома желуца. Минимално инвазивне процедуре су повезане са смањеном хируршком траумом и имуносупресијом у поређењу са конвенционалном отвореном хирургијом и, према томе, могу побољшати квалитет неге све док се поштују принципи хируршке онкологије.

Обим операције је одређен стадијумом тумора, пречником, локацијом и хистолошким типом. Адекватна операција желуца дефинише се као потпуна ресекција примарног карцинома са хируршким рубовима без тумора од најмање 4 cm и адекватном лимфаденектомијом. У пракси, ови захтеви одговарају тоталној гастректомији за карцином желуца са ћелијама печатастог прстена (*linitis plastica*), и онима који се налазе у горњој трећини желуца или са атрофичним гастритисом. Карцином у доње две трећине желуца се често може лечити субтоталном гастректомијом. Хирургија у Јапану и источној Азији традиционално је била опсежнија и агресивнија него у другим развијеним земљама. Иако не постоји светски консензус о степену лимфаденектомије, D2 лимфаденектомија (перигастрична [D1] плус целијачна артерија и њене гране) се генерално препоручује ако су придружене постоперативне морбидитетне и морталитетне стопе прихватљиво ниске - на пример, у великим болницама са искусним хирурзима (155,156). Овај приступ је допринео побољшању стопе излечења у различитим регистрима и студијама, са 30% на 55% у протеклој деценији. Други разлози су миграција у стадијуму због побољшаних метода *staging*-а, повећане употребе адјувантних и неoadјувантних терапија и централизације хируршке интервенције, што је довело до побољшања постоперативне смртности (1,2,18,22). Треба уклонити најмање 16 лимфних чворова како би се омогућило

адекватно стадирање тумора и осигурао адекватан стадијум тумора, као и одредила оптималност хируршке ресекције.

Трансабдоминална тотална гастректомија је стандардни хируршки приступ за лечење пацијената са *Sievert* тип II или III карциномом гастро-езофагеалног споја. Процедура је проширена трансхијалном ресекцијом дисталног једњака и лимфаденектомијом доњег медијастинума и абдоминалном D2 лимфаденектомијом . Торакоабдоминални приступ код ових пацијената може повећати ризик од морбидитета без побољшања преживљавања и стога се обично не препоручује за лечење желудачног карцинома кардије (тип II) или субкардијалног (тип III).

1.2. Интерлеукин 32

Иако је интерлеукин 32 (IL-32) званично први пут описан у литератури 2005. године, у раду Ким и сарадника (159), опис гена првобитно названог природни убица (NK) 4, датира из 1992. године (160). Ген за IL-32 се налази на хуманом хромозому 16p13.3 и састоји се од 8 егзона, од којих егзон 2 садржи ATG кодон (161). Код људи, постоји најмање 9 различитих изоформи IL-32 (IL-32 α , IL-32 β , IL-32 γ , IL-32 δ , IL-32 ϵ , IL-32 ξ , IL-32 η , IL-32 θ , и IL-32 ζ) генерисаних алтернативним спајањем пре-mRNA изоформе IL-32 γ , иако четири до данас најистраженије изоформе IL-32 α , IL-32 β , IL-32 γ и IL-32 δ , у хуманим природно-убилачким ћелијама (енгл. *Natural Killer*- NK) (162). Различите изоформе IL-32 показују разлике у смислу ефеката и могућности да изазову специфичан ефекат (163,164). IL-32 γ је најдужа (пун протеин) и најактивнија изоформа у смислу стимулације мононуклеарних ћелија периферне крви (PBMCs) и следствене производње про-инфламацијских цитокина у макрофагима (165,166) (18). IL-32 α је најзаступљенија, али и најкраћа и најмање активна проинфламацијска изоформа (167,168).

IL-32 транскрипт се експримира у различитим људским ткивима и органима као што су слезина, тимус, леукоцити, плућа, танко црево, дебело црево, простата, срце, плацента, јетра, мишић, бубрег, панкреас и мозак. IL-32 се експримира у хуманим субепителним миофибробластима (169) и хуманим примарним кератиноцитима (170), ћелијској линији мождане строме HS-5 и HS-27A, (171) и синовиоцитима и фибробластима (FLS) (172,173). Такође је забележена експресија IL-32 у ендотелним ћелијама. Интрацелуларни IL-32 у ендотелној ћелији људске пупчане вене (HUVEC) је конститутивно експримиран, а најизраженије IL-32 mRNA изоформе у нестимулисаним ЕС су α и γ изоформе (161,174,175). Експресија IL-32 mRNA је израженија у имунским ћелијама него у неимунским ткивима (159,175,176). У хуманом Т лимфоциту, анти-CD3 антитело, вирус хумане имунодефицијенције (HIV) и митогени као што је конканавалин А (Con A) индукују експресију интрацелуларног IL-32 (посебно IL-32 β). Нове изоформе (IL-32 ϵ , IL-32 ξ , IL-32 θ и smIL-32) су такође детектоване у Т лимфоцитима, а IL-32 β изоформа је претежно експримирана у активираним Т лимфоцитима (160,177,178). Цитокини IL-12, IL-18, IL-23 и TNF α повећавају експресију IL-32 mRNA у CD4⁺ Т лимфоцитима периферне крви. У В-лимфоцитима, експресија mRNA за IL-32 је повећана посредством активираних Т лимфоцита, Con A и анти-CD3 плус анти-CD28 антителима (176). Експресија или ослобађање IL-32 су такође проучавани у другим ћелијама имунског система, као што је NK ћелије (159,160), CD14⁺ моноцити, (176,179), дендритске ћелије периферне крви (180), дендритске ћелије добијене из моноцита периферне крви (176,181) и неутрофили (182).

1.2.1. Секретија IL-32

Образац експресије и функционална разлика изоформи IL-32 су и даље отворена питања. До сада, студије које су анализирале изоформе IL-32 су веома збуњујуће и нејасне. На пример, само IL-32 γ изоформа поседује хидрофобни сигнални пептид у свом N-термину, који је типична карактеристика секретованог цитокина. IL-32 не поседује трансмембрански домен, али имунохистохемијска анализа открива да је експримиран IL-32 у PBMC, активираних LPS-ом и *M. tuberculosis*, посебно повезан са ћелијском мембраном (180).

Нема очигледних доказа да се IL-32 излучује преко класичног ендоплазматски ретикулум (ER)/Golgi-зависног пута. IL-32 се може везати за мембрански протеин, као што је интегрин, јер има RGD мотив, а IL-32 изоформе садрже предвиђена места за сулфатацију тирозина која су уобичајена пост-транслациона модификација пронађена у секреторним протеинима (160,167). Штавише, не постоји специфичан рецептор за IL-32 преко кога иде сигнализација ванћелијског IL-32. Иако су механизми IL-32 секреције и екстрацелуларне сигнализације још увек нејасни, очигледно је да IL-32 испољава различите важне биолошке активности. Утврђено је да IL-32 сигнализације иде путем p38 MAPK путева и NFκB (167) у имунским ћелијама и такође је повезан са активацијом сигналних интермедијера p300 и DAPK-1 (183). Друге студије такође указују на улогу за ERK1/2 и PI3K/AKT сигнализацију у остеокластним прекурсорима (184), као и да је IL-32 такође повезан са NFκB-STAT3 сигнализацијом у ћелијама карцинома дебелог црева *in vitro* (185). Према томе, ћелијска активација посредована IL-32 је повезана са неколико различитих сигналних путева, од којих су неки делимично специфични за ткиво, и зависе од специфичних изоформи IL-32.

1.2.2. Улога IL-32 у инфламацији

Интерлеукин -32 је је укључен у патогенезу бројних хроничних инфламацијских болести и алергијских болести укључујући, реуматоидни артритис (RA), хроничну опструктивну плућну болест (COPD), егзацербацију COPD-а, инфламацијске болести црева (енгл. *Inflammatory Bowel Disease, IBD*), хронични риносинуситис и астму. IL-32 продукују различите ћелије имунског система (нпр. NK ћелије, Т лимфоцити, РВМС, и моноцити) и друге ћелије (нпр. ендотелне ћелије, фибробласти и кератиноцити) (170,172,175,176,181,186). Улога IL-32 у инфламацији је плејотропна, јер је укључена не само у промовисање проинфламацијских цитокина, већ и у стимулацију антиинфламацијских цитокина (163,179,186,187). IL-32 индукује производњу простагландина E2, проинфламацијског фактора, у *in vitro* условима. Код наивних мишева инјекција IL-32γ у колена појачава запаљење колена и узрокује отицање зглобова и оштећење хрскавице преко TNF-α зависног сигнала (172). Ниво IL-32 у синовијалној биопсији пацијената са активним RA позитивно корелира са брзином седиментације еритроцита, синовијалним инфламацијским статусом и концентрацијом проинфламацијских цитокина у синовијалној течности (TNF-α, IL-1β и IL-18) (188,189). Слично, експресија (и mRNA и протеина) IL-32 у назалној мукози је повећана у алергијском ринитису (AR). Код пацијената са AR, продукција IL-32 у назалној мукози позитивно корелира са продукцијом инфламацијских фактора (IL-1β, IL-18, и гранулоцитно-макрофагни фактор стимулације колоније [GM-CSF]). Про-инфламацијска функција IL-32 је даље потврђена у животињском моделу AR, у коме је IL-32 повећао производњу IgE и инфламацијских цитокина (190). У узорцима плућног ткива и плазме пацијената са НОВР, експресија IL-32 је висока и позитивно корелира са тежином опструкције протока ваздуха (191,192). Даља истраживања су показала да током акутног погоршања НОВР, упала и оксидативни стрес могу повећати експресију IL-32 у ћелијама хуманог епитела (НВЕ) кроз JNK сигнални пут. Везујући протеин c-Jun и cAMP одговора игра кључну улогу у IFN-γ- и H₂O₂-индукованој експресији IL-32 (167). Додатно, серумски ниво IL-32 је повећан код пацијената са H1N1 инфекцијом (193,194). Од

посебног интереса је да IL-32 такође може инхибирати производњу про-инфламацијских фактора. На пример, IL-32 може стимулирати експресију IL-10, анти-инфламацијског цитокина који може инхибирати производњу про-инфламацијских цитокина (нпр. IL-12, IL-1 β и TNF- α) (193,195).

Повећани ниво IL-32 mRNA корелира са тежином запаљења желуца. Ови резултати показују да је IL-32 вероватно укључен у запаљење желуца код пацијената са *H. pylori* инфекцијом. Ниво IL-32 mRNA је био значајно повишен код пацијената са *H. pylori* инфекцијом, а такође је примећена висока корелација између IL-32 mRNA и запаљења желуца, што указује да IL-32 може играти важну улогу у *H. pylori* инфламацији желудачне слузнице. Резултати су показали да је IL-32 експримиран у желучаним епителним ћелијама и да је његова експресија изражена у *H. pylori* позитивним ентероцитима. Пошто је показано да IL-32 индукује производњу IL-8 у желучаним епителним ћелијама и инхибира секрецију проангиогеног фактора VEGF у бронхијалним епителним ћелијама (196,197), а такође је запажено да ниво mRNA IL-32 позитивно корелира са експресијом IL-8, сви наведени резултати указују на то да је IL-32 вероватно настао пре инфилтрације ових ћелија, што је потврђено истраживањем које је потврдило да IL-32 индукује сазревање дендритских ћелија и промовише Th1 и Th17 поларизацију стечене имуности (198,199). Експресија IL-32 је претежно регулисана транслокацијом CagA у епителне ћелије, а други вирулентни протеини такође могу да утичу на патогени одговор *H. pylori* на желучане епителне ћелије. Експресија IL-32 је повишена код пацијената са *H. pylori* инфекцијом и корелира са тежином упале желуца. Регулација експресије IL-32 као одговор на *H. pylori* инфекцију зависи од различитих фактора интеракције. Ови подаци заједно указују да IL-32 може играти важну улогу у патогенези гастритиса узроковане инфекцијом *H. pylori*.

1.2.3. IL-32 у туморима

Сматра се да је око 25% свих карцинома узроковано хроничном инфекцијом и инфламацијом. Инфламацијске ћелије се налазе унутар тумора, а тумори се стварају на месту хроничне инфламације. Бројна истраживања су недвосмислено утврдила повезаност инфламације и тумора. Болест гастроезофагеалног рефлукса и *Barrett*-ов езофагус узроковани хронично запаљеним једњаком повећавају стопу карцинома једњака, а хронични бронхитис и емфизем такође су уско повезани са ризиком од карцинома плућа. Недостатак α -1-антитрипсина може изазвати инфламацију и цирозу јетре са повећаним ризиком настанка хепатоцелуларног карцинома. Хронични панкреатитис такође повећава ризик настанка карцинома панкреаса. IBD, као што је Кронова болест и улцерозни колитис повезани су са повећаном стопом аденокарцинома дебелог црева (200). Улога IL-32 у запаљењима и оногенези није разјашњена. Међутим, очигледно је да је IL-32 значајно експримиран и да има значајну улогу у хроничним запаљенским процесима и карциномима код људи, укључујући карцином плућа, карцином панкреаса, карцином грлића материце и карцином дебелог црева.

1.2.4. Клинички значај експресије IL-32 у туморима

Бројне студије су испитивале клинички значај експресије IL-32 као прогностичког фактора. Већа експресија IL-32 у туморском ткиву јетре, панкреаса, једњака, плућа и

желуца и серуму је откривена у поређењу са експресијом у нормалном ткиву или серуму здравих (167,197,201–204). Ови резултати су у складу са резултатима студије открили су да је IL-32 повезан са инвазијом туморских ћелија и метастазама у примарном аденокарциному плућа (204). Различити типови карцинома плућа показали су различите профиле експресије IL-32 протеина. Није пронађена експресија IL-32 у карциномима сквамозних ћелија, док је експресија IL-32 била снажно изражена у аденокарциномима и њиховим прекурсорским лезијама, што је одговарало клиничкој фази, метастазама лимфних чворова и удаљеним метастазама (205). Штавише, позитивна корелација између IL-32 и инвазије карцинома која је показана код карцинома плућа је такође забележена код карцинома желуца и дојке (206,207). Tsai и сарадници (208) су показали да експресија IL-32 у карциному желуца корелирала са агресивношћу карцинома и лошом прогнозом. Пацијенти са карциномом желуца имали су више нивое IL-32 у серуму у поређењу са здравим контролама или пацијентима са гастритисом и стога је IL-32 предложен као дијагностички маркер код карцинома желуца (197). Експресија протеина IL-32 у ћелијама карцинома желуца корелирала је са дубином инвазије тумора, метастазама у лимфним чворовима и васкуларном инвазијом (209). Коначно, у кутаном и лимфому желуца, експресија IL-32 у серуму у корелацији је са активношћу болести, а IL-32 ткивна експресија повезана је са прогресијом и метастазама у лимфним чворовима (210,211). Експресија IL-32 у HNSCC била је повезана са смањењем укупног преживљавања и преживљавања без болести (212), док је код карцинома дебелог црева IL-32 експресија била повезана са појавом удаљених метастаза и метастаза лимфних чворова (213,214). Код карцинома бубрежних ћелија, ћелијска експресија IL-32 корелира са високом стопом рецидива и ниским преживљавањем без рецидива, преживљавањем специфичним за болести и укупним преживљавањем, а то је разлог зашто је IL-32 предложен као прогностички маркер за карцином бубрежних ћелија (215). У студији која је укључивала карцином дојке, показана је позитивна веза између експресије IL-32 и величине тумора, броја метастатски измењених лимфних чворова и стадијума тумора (207). Насупрот наведених доказа, недавни извештај наводи да иако је забележена висока експресија IL-32 у ткиву карцинома грлића материце, није била у корелацији са смртношћу пацијената (216). Код хроничне мијеломоноцитне леукемије, експресија IL-32 била је нижа него код здравих донора. Осим тога, експресија IL-32 у стромалним ћелијама из коштане сржи пацијената са леукемијом играла је важну улогу у индуковању апоптозе у леукемијским ћелијама (217). У овим студијама, IL-32 је имао или про-онкогену или супресивну улогу у тумору, вероватно због разлике у доминантној IL-32 изоформи која је експримирана у туморском ткиву.

1.2.5. Улога IL-32 у развоју карцинома

Механизам или функција IL-32 у развоју карцинома још није јасно истражена. У бројним студијама различите ћелијске линије хуманих тумора су трансфектоване са IL-32 геном. Ефекат трансфекције IL-32 на инхибицију и промоцију тумора зависи од типа ћелија тумора. На пример, IL-32 β - трансфектоване ћелије карцинома дојке показале су већу способност миграције и инвазије од контролних туморских ћелија, и овај процес је углавном зависио од сигналног пута IL-32 β - VEGF- STAT3 (207). Поред тога, Tsai и сарадници (208) су открили да је ектопична експресија IL-32 у ћелијским линијама карцинома желуца повећала метастатски потенцијал путем повећане активности Akt, β -

катенина и HIF-1 α . Код карцинома панкреаса, супресија IL-32 је значајно стимулисала апоптозу смањењем експресије анти-апоптотичких протеина. Овај налаз је потврђен код хуманог НСС (202). Међутим, код хроничне мијелоидне леукемије, IL-32-трансфектоване ћелије су биле подложније убијању посредством NK ћелија него контролне ћелије тумора. Недавне студије су показале да је IL-32 повезан са растом ћелија карцинома и метастазама модулацијом NF- κ B сигнализације (183,205,208). Поред тога, IL-32 је повезан са сигнализацијом STAT3 раста ћелија карцинома (Ох,2011). Многе студије су показале да STAT3 сигнализација промовише развој карцинома и аблација STAT3 инхибира развој тумора (218–220). Он извештава да IL-32 γ инхибира раст ћелија карцинома инактивацијом STAT3 у туморским ткивима код мишева и хуманих ћелија карцинома дебелог црева. Такође је пронађено да IL-32 γ појачава TNF- α индуквану смрт ћелија карцинома дебелог црева кроз активацију p38 MAPK пута (183). Ови резултати сугеришу да је IL-32 повезан са развојем карцинома кроз модулацију сигнализације NF- κ B и STAT3, као и MAPK сигнализације.

Потенцијал за инвазију и метастазирање су важне карактеристике тумора које такође одређују агресивност тумора. Разни извештаји сугеришу да неколико изоформи IL-32 промовишу инвазију и миграцију тумора. Насупрот томе, неке студије показују да је експресија изоформи IL-32 α и IL-32 θ повезана са смањеном ЕМТ, инвазијом и миграцијом код карцинома панкреаса и карцинома дебелог црева (167,181). Према томе, поново различите IL-32 изоформе имају супротне ефекте на миграцију и инвазију, при чему су IL-32 β и IL-32 δ повезани са повећаним ЕМТ, инвазивним и метастатским потенцијалима, док IL-32 α и IL-32 θ потискују ове процесе. Сви наведени резултати показују да је експресија IL-32 повишена код многих карцинома, као и да овај цитокин повећава способност миграције и инвазије туморских ћелија.

1.2.6. IL-32 и анти-туморска имуност

IL-32 појачава осетљивост NK ћелија на туморске ћелије. IL-32 је првобитно идентификован као протеин у NK ћелијама. NK ћелије су ћелије урођене имуности које показују способност убијања туморских ћелија. Стога је могуће да IL-32 утиче на раст тумора модулацијом активности NK ћелија. Заиста, Cheon и сарадници извештавају да су ћелије хроничне мијелоидне леукемије (СМЛ) које прекомерно експримирају IL-32, укључујући K562, Kcl22 и BV173, биле веома подложне убијању посредованом NK ћелијама. Ова појачана осетљивост на NK ћелије настала је услед IL-32 -стимулисаног повећања експресије Fas и UL16 везујућег протеина 2 (ULBP2) активацијом p38 MAPK у СМЛ ћелијама (216). Поред ефекта IL-32 на повећање осетљивости туморских ћелија на NK ћелије, показано је и да IL-32 такође повећава цитотоксичност NK ћелија (198). Више истраживања је потврдило да IL-32 регрутује цитотоксичке Т лимфоците (CTL) и NK ћелије у туморску микросредину, при томе индукујући анти туморски ефекат. Једна студија која је тестирала могућност употребе IL-32 као анти-туморског лека показала је да IL-32 директно инхибира раст тумора инхибицијом NF- κ B и STAT3 у ћелијама тумора, регрутује антитуморске имунске ћелије, укључујући NK ћелије и CTL, и такође директно регулише цитолитичку активност NK ћелија повећањем експресије лиганада који изазивају смрт.

1.2.7. IL 32 и карцином желуца

У ранијим истраживањима, доказана је интензивна експресија IL-32 у ткиву карцинома желуца, док је у здравој мукози забележена значајно мања експресија (206). Механизам одговоран за интензивну експресију IL-32 у ћелијама карцинома желуца је тренутно неразјашњен. Показано је да интензивна транскрипциона активност региона 16p13.3 хромозома, који садржи ген за IL-32, често корелира са карциномом дојке и танког црева (207,221). Наведени налази указују да дисрегулација IL-32 сигнализације игра важну улогу у механизму развоја карцинома желуца, али је потребно више експерименталних доказа да поткрепи ову тврдњу. Иако већина заражених особа остаје асимптоматска током целог живота (28), инфекција *Helicobacter-om pylori* (*H. pylori*) изазива хронично запаљење слузнице желуца. Приближно 10% заражених *H. pylori* развијају пептичку улкусну болест, а 1 до 3% њих прогредира у карцином желуца (53,57). Експресија IL-32 била је значајно повећана у желудачној мукози оболелих од карцинома желуца, док је била неизражена у здравој желудачној мукози (206). Повећана експресија IL-32 углавном је локализована у цитоплазми ћелија епитела желуца, код гастритиса и карцинома желуца (209). С друге стране, један нуклеотидни полиморфизам (SNP) гена за IL-8, који је повезан са повећаном експресијом IL-8, идентификован је као фактор ризика за карцином желуца у јапанској популацији (222). С обзиром да IL-32 β повећава производњу IL-8, могуће је да прекомерна експресија IL-32 β у карциному желуца може бити повезана са карциногенезом овог тумора. Vang је са сарадницима урадио генске анализе и установио да је SNP у IL-32 β сам повезан са карциногенезом желудачног карцинома. Студија је показала позитивну везу између SNP-а на IL-32 rs2015620 код кинеске популације и карцинома желуца (223). Поред могућности да је IL-32 β повезан са карциногенезом, улога IL-32 у прогресији овог тумора и метастазирања је такође откривена анализом 120 пацијената којима је дијагностикована ова болест (224). Цитоплазматска експресија IL-32 била је већа у малигним фазама, а IL-32 β је главна пронађена изоформа, са мањом експресијом IL-32 α и IL-32 γ . Штавише, обе изоформе IL-32 су биле интензивно експримиране код пацијената са малигном инвазијом серозе зида желуца и метастазама на лимфним чворовима. Ова студија подржава могућност да IL-32 може бити прогностички маркер за карцином желуца. Истакнут је и основни молекуларни механизам којим IL-32 утиче на инвазивност код овог малигнома. Ћелије хуманог карцинома желуца TSGH9201 које су прекомерно експримирале IL-32 γ показале су пораст и унутар- и ван-ћелијског нивоа IL-32 β , и повећане капацитете миграције и инвазије. Даље, појачана активација сигналног пута АКТ- β -катенин помоћу IL-32 β била је праћена повећаном производњом IL-8, васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF) и активне матрикс металопротеиназе 2 и 9 (MMP2 и 9) (201). Иако је неколико студија показало позитивну везу између нивоа експресије IL-32 и метастаза и инвазије код пацијената са карциномом желуца (216,225), једно истраживање је показало да IL-32 нема значајну везу са маркером малигности TNF- α код пацијената са карциномом желуца (221). Ово одступање између осталог сугерише да су у будућим студијама потребни експерименти са већим узорком. Имуносупресивне ћелије које инфилтришу тумор, укључујући макрофаге повезане са тумором (TAMs), мијелоидне супресорске ћелије (MDSC) и регулаторни Т лимфоцити (Treg) су у корелацији са лошом прогнозом, док су имуноактиваторске и ефекторске ћелије, укључујући CTL, дендритске ћелије и активирани Т лимфоцити повезане са бољом прогнозом код ове болести. Chang и сарадници извештавају да су високи нивои IL-32, заједно са IL-6, IL-10, С-С мотивом

лиганда хемокина (CCL) 7 и CCL21 детектовани у серуму болесника са карциномом желуца и били су повезани са лошом прогнозом (221). Иако функције ванћелијског и циркулишућег IL-32 у ћелијама карцинома желуца нису испитиване у тој студији, сасвим је могуће да циркулишући IL-32 игра функционалну улогу у имунокомпетентним ћелијама у туморској микросредини, с обзиром да циркулишући IL-32 позитивно регулише про-инфламацијске цитокине, укључујући IL-1, IL-6 и TNF- α . Из свега проистиче да је IL-32 β индукован инфекцијом *H. pylori* главна изоформа пронађена код карцинома желуца и да стимулише производњу различитих цитокина, укључујући IL-8, CXCL1, CCL21, MMP2/9 и TNF- α . Ови инфламацијски цитокини су повезани са карциногенезом и инвазијом код карцинома желуца. Међутим, ванћелијски IL-32 β није утицао на производњу цитокина у AGS ћелијама (225). Због тога су потребне додатне студије како би се утврдило право дејство ванћелијског IL-32 β . Kaplan-Meier-ова анализа преживљавања показала је да је већа експресија IL-32 значајно повезана са лошом прогнозом пацијената са карциномом желуца. IL-32 је додатно идентификован као независни прогностички маркер у мултиваријатној анализи паралелно са познатим клиничким и патолошким факторима за карцином желуца. Даља анализа предиктивног потенцијала експресије IL-32 указује на његову корисност као предиктора за идентификацију агресивног карцинома желуца, у складу са Kaplan-Meier и Cox регресионом анализом. Ова студија пружа доказе за то да је IL-32 користан независни биомаркер за прогнозу. Већа експресија IL-32 је у корелацији са лошим постоперативним исходима пацијената са карциномом желуца (197). Ектопична експресија највеће варијанте IL-32, која се може спајати у IL-32 β и IL-32 α у ћелијама карцинома желуца, корелира са морфологијом вретенастог облика и повећаном способношћу миграције ћелија. Резултати указују на то да све изоформе IL-32 могу имати сличну функцију, као што је фацитирање миграције. IL-32 активира ћелијску инвазију делимично индуковањем експресије IL-8, VEGF, MMP2 и MMP9, што води деградацији екстрацелуларног матрикса. Ектопична експресија IL-32 праћена је повећаном експресијом фактора хипоксије 1 α (HIF-1 α), једним од најјачих регулатора ангиогенезе. Према томе, и β -катенин и HIF-1 α укључују IL-32-индуковану инвазију ћелија под активацијом фосфо-АКТ сигнализације. Други истраживачи су показали улогу IL-32 у регулацији експресије IL-8 у ендотелним ћелијама, што указује на улогу у модулацији ендотелне функције (216). Резултати колективно подржавају важну улогу IL-32 у ангиогенези у карциному желуца. Ова студија је по први пут показала да IL-32 стимулише активацију АКТ и β -катенина као и HIF-1 α за индукцију IL-8, VEGF, MMP2 и MMP9 секрецију за метастазирање карцинома желуца. Очигледно, p-АКТ, активирани β -катенин као и HIF-1 α су усходни регулатори експресије IL-8. Међутим, не можемо искључити могућност унакрсне сигнализације између IL-8, VEGF, MMP2, и MMP9. Прекомерна експресија IL-32 уочена је код карцинома желуца, што указује на критичну улогу у развоју и прогресији малигности. Ови резултати заједно показали су да IL-32 функционише као потенцијални терапеутски циљ и користан независни прогностички маркер преживљавања пацијената.

1.2.8. IL-32 у ангиогенези

Ангиогенеза, формирање нових крвних судова у окружењу тумора, стимулише прогресију тумора обезбеђивањем кисеоника и хранљивих материја како би се олакшао раст тумора и

утиче на метастатски потенцијал тумора (226). VEGF и његови рецептори су кључни фактори укључени у ангиогенезу, поред MMP-а који утичу пут за формирање нових крвних судова (227). *In vitro* студије указују да IL-32 утиче на експресију VEGF и експресију MMP код различитих типова карцинома, укључујући карцином дојке и карцином желуца (228). Интересантно, људске васкуларне ендотелне ћелије такође експримирају функционални IL-32 (175). Штавише, блокирање рецептора за VEGF у ендотелним ћелијама повећало је експресију IL-32 и резултирало хиперпролиферацијом ендотелних ћелија. Редукција IL-32 у овим ћелијама није утицала на ниво VEGF-а, али је довела до смањења експресије IL-8 и MMP9. У функционалном тестовима за ангиогенезу, IL-32γ дозно зависно повећава формирање цеви, посредовано интегрином $\alpha V\beta 3$. У *in vivo* моделу ангиогенезе, VEGF и IL-32γ су били једнако ангиогени, мада је други сигнал био потребан да би ћелије реаговале на егзогени IL-32γ (228). Ово сугерише да IL-32 може индуковати ангиогенезу било интеракцијом са ендотелним ћелијама у окружењу тумора, преко интегрин $\alpha V\beta 3$ у зависности од VEGF, или путем индукције експресије VEGF. У хуманој пулмонарној артеријској хипертензији и мултиформним глиобластомима, хиперпролиферативне ендотелне ћелије (EC) су значајно експримирале IL-32 (228). Надаље, инхибиција IL-32 негативно је утицала на пролиферацију ендотелних ћелија и смањила нивое експресије азотног оксида, IL-8 и MMP-9 код одраслих и неонаталних EC (228,229). Функционалне студије које су користиле тестове ангиогенезе засноване на ко-култури показале су повећано формирање цеви у зависности од дозе IL-32. С друге стране, инхибитор $\alpha V\beta 3$ ослабио је овај одговор и смањило експресију индукованог IL-8. Ове студије су показале да IL-32 промовише ангиогенезу делимично кроз интегрин $\alpha V\beta 3$. Директна повезаност између IL-32 и ангиогенезе тумора остаје недовољно истражена, а сродне студије су ограничене. Код карцинома желуца, IL-32 може индуковати експресију IL-8, VEGF, MMP2 и MMP9 (216). IL-8 је посебно добро успостављен потентни промотор ангиогенезе. IL-32 може индиректно промовисати ангиогенезу тумора индуковањем других цитокина и фактора раста. Може бити корисно проценити ангиогену активност IL-32 у људском карциному, јер ангиогенеза игра кључну улогу у патогенези и прогресији карцинома. IL-32 је укључен у више аспеката развоја карцинома, укључујући раст, миграцију и ангиогенезу.

1.3. Интерлеукин 17

Интерлеукин 17 (IL-17) је проинфламацијски цитокин који је идентификован пре скоро две деценије. Ген који кодира IL-17 први пут је описао и клонирао Rouvier, из библиотеке cDNA хибрида цитотоксичких Т лимфоцита миша. Породица IL-17 и њени рецептори, који деле минималну хомологност са другим цитокинима или познатим протеинима, препознати су као посебна породица рецептора за цитокине и важни су за физиолошки имунски одговор домаћина. Интерлеукин 17А (IL-17А, уобичајено познат као IL-17) је клониран 1993. године (230). Описан је и први рецептор за везање IL-17 (IL-17RA) 1995. (231). Породица IL-17 се састоји од шест структурно сличних цитокина IL-17А (IL-17), IL-17В, IL-17С, IL-17D, IL-17Е (IL-25) и IL-17F. IL-17А и IL-17F су структурно најсличнији и обично их копродукују ћелије типа 17 (232). Слично томе, породица IL-17R садржи пет рецепторских субјединица, IL-17R А, IL-17R В, IL-17R С, IL-17R D и IL-17R Е. Интересовање за IL-17 убрзало се открићем да IL-17 продукује посебан тип CD4⁺ помагачких Т лимфоцита (енгл. *T helper*- Th17). Показало се да IL-17 производе и остале ћелијске популације, попут CD8⁺ Т лимфоцита (Tc17), као и разни типови урођених лимфоидних ћелија, укључујући $\gamma\delta$ Т лимфоците, НКТ ћелије, урођене лимфоидне ћелије групе 3 (ILC3) и „природне“ Th17 ћелије, НК ћелије, моноците, макрофаге, дендритичне ћелије (DC), микроглију, неутрофиле, еозинофиле, астроците и олигодендроците (233). IL-17 који производе Th17 лимфоцити представља само делић укупног IL-17 (234,235).

1.3.1. Улога IL-17 у инфламацији

Због своје способности да индукује продукцију неколико цитокина и хемокина, IL-17 је уско повезан са инфламацијом. У том погледу, IL-17 је критично укључен како у основну заштиту од инфекција, тако и у неколико поремећаја који су карактеристични за хроничну инфламацију. Блокирајући сигнализацију IL-17 у експерименталним моделима инфективних болести, показано је да IL-17 доприноси одбрани домаћина против екстрацелуларних бактеријских и гљивичних патогена. Ту спадају *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Salmonella enterica*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocitogenes*, *Helicobacter pilori*, *Citrobacter rodentium* и *Tripanosoma cruzi* (видети преглед Gu и сар., 2013(236)). Овде IL-17 делује углавном као моћан индуктор регрутовања неутрофила и гранулопоезе. IL-17 је повезан са патогенозом инфламацијских болести (237). IL-17 индукује експресију хемокина CXCL1, CXCL6 и CXCL8, нуклеарног фактора-каппа В (NF- κ B), фактора стимулације раста гранулоцита (G-SCF), гранулоцитно-моноцитног фактора стимулације раста (GM-CSF), адхезивних молекула (ICAM-1) и цитокина IL-6 (238,239).

IL-17 код људи повезан је с патологијом у бројним аутоимунским и инфламацијским стањима, као што су реуматоидни артритис (РА), мултипла склероза (МС), псоријаза, *Crohn*-ова болест, системски еритематозни лупус (SLE), астма, Бехчетова болест и хипер IgЕ синдром (233).

1.3.2. IL-17 у туморима

После откривања имунске осовине IL-23/Th17, појавила се идеја да IL-17 може да фацитира развој малигнома промовишући хроничну инфламацију ткива. Заиста,

повећана експресија гена за IL-17 може се наћи код више малигних обољења, укључујући карциноме грлића материце, једњака, желуца, хепатоцелуларни карцином и карциноме колоректума (240). За многе типове тумора, посебно на мукозним баријерама, генетски потписи Th1 лимфоцита (IFNG, STAT1, TBKS21) и CD8⁺ цитотоксичких Т лимфоцита (PRF1, GZMB) повезани су са бољим исходом и дужим преживљавањем без рецидива, док Th17 потпис (RORC, IL17, IL23, STAT3) одговара лошијем исходу болести (234). Ова дихотомија је још јаснија у одговорима на терапију контролних тачака (нпр., Анти-CTLA4 и анти-PD1 третмани) који имају снажан антитуморски Th1 и CTL потпис (241). Један од кључних фактора који промовише Th17 имунски одговор је микробна дисбиоза. Концепт да микробиолошка колонизација може предиспонирати развој тумора додатно је поткрепљен опажањем да гастритис индукован *Helicobacter pylori* често иницира стварање желудачног карцинома на начин зависан од IL-17 (242). Код људи се појављује веза између специфичних класа микроорганизама и развоја CRC-а. Инфекције инвазивним бактеријама *B fragilis*, *F nukleatum*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Gemella morbilliform* и *Parvimonas micra* удружене су са онкогенезом код пацијената са породичном аденоматозном полипозом (243). Ови резултати сугешу да састав микробиома црева вероватно мења равнотежу између повољног Th1 и Th17 имунског одговора и на тај начин може да посредује реакцији пацијента на имунотерапију. Заиста, недавне студије пружиле су директан доказ да микробиомска заједница може утицати на реакцију на терапију блокадом контролних тачака (241).

Про-туморска улога IL-17

Иако су сагледани бројни докази који истражују Th17 ћелије и њихове потенцијалне ефекте супресије или појачавања тумора (234,244), специфична веза између саме производње IL-17 и ефеката на биологију тумора није јасна. Присуство овог цитокина у микрооколини тумора може бити један од кључних фактора који фаворизују раст тумора, ангиогенезу и самим тим метастазирање. Улога IL-17 у онкогенези почиње од почетних фаза генезе. Утврђено је да игра улогу у најранијем формирању тумора, повећаним присуством унутар туморске микросредине (244). У погледу протуморске улоге, постоје снажни докази који произлазе из улоге IL-17 у хроничној инфламацији (245). То се постиже инхибицијом инфлуksа цитотоксичких Т лимфоцита и акумулацијом мијелоидних супресорских ћелија, чиме се модификује локална микроседина и инхибира локални антитуморски имунски одговор (234). IL-17 такође игра улогу у одржавању хроничне инфламације око (245) и унутар туморског ткива (244). Ово се дешава као одговор на ослобађање лактата из ћелија тумора што резултира повећаним ослобађањем IL-17, нарочито IL-17A, путем зависним од IL-23 (245,246). Пораст продукције IL-17 може индуковати ослобађање цитокина IL-6 и последичну активацију STAT3 сигналног пута (234). Активацију STAT3 следи активирање NF-κB пута (234), који је повезан са продукцијом проинфламацијских цитокина (219). Улога IL-17 у онкогенези није ограничена само на стварање савреног окружења и базе за формирање тумора, већ је одговорна и за пролиферацију ћелија тумора (232,240). Поред мањег директног утицаја на пролиферацију и опстанак ћелија тумора (244), јер све туморске ћелије не експримирају рецептор за IL-17, главна протуморска улога IL-17 је проинфламацијска и ослања се на његово проангиогено дејство на ендотелне ћелије и фибробласте.

Анти-туморска улога IL-17

Упркос доказима који подржавају пролиферативну улогу IL-17 у онкогенези, постоје докази који показују да IL-17 може појачати антитуморски имунски одговор и изазвати смањење величине тумора. То је показано имунизацијом Th17 ћелија у туморско окружење које активирају цитотоксичне Т лимфоците (238). Могући механизам је путем удруживања IL-17 и регрутовања тумор-инфилтрирајућих IFN- γ^+ ефекторских ћелија, и NK ћелија уз истовремено смањење броја Treg лимфоцита (247). Показано је да IL-17 индукује продукцију IL-6 из разних ћелија. Штавише, стимулација IL-17 може да индукује производњу IL-12 у макрофагима (248). И IL-6 и IL-12 повезани су са индукцијом акумулације CTL специфичних за тумор. Иако је показано да IL-17 подстиче раст тумора индукујући ангиогенезу, исти механизам обезбеђује канал преко којег леукоцити могу доћи у туморску микросредину и прићи релативно неприступачним ћелијама тумора у језгру чврсте туморске масе. Стога, ангиогенеза изазвана IL-17 такође може промовисати антитуморски имунски одговор тако што ће омогућити леукоцитима да дођу и нападну унутрашњу масу чврстог тумора.

1.3.3. IL-17 и карцином желуца

Само неколико студија анализирано је IL-17 у тумору желуца. Zhou et al. су показали да IL-17A и вероватно IL-17F могу покренути трансдукцијске путеве, повећати експресију MAPK-a и регрутовати учешће неутрофила у желуцаној инфламацији и на тај начин подстаћи напредовање карцинома преко IL-17R. Ови ефекти су значајно поништени прекидом сигнализације IL-17R A или IL-17R C (234). Друга студија је показала да су IL-17A и IL-17F полиморфизми једног нуклеотида (SNP) повезани са ризиком од развоја карцинома желуца (249). Међутим, накнадне репликационе студије које су истраживале повезаност између IL-17A и IL-17F варијанти са ризиком од развоја рака желуца биле су контроверзне (242,249,250).

1.3.4. IL-17 у ангиогенези

Улога IL-17 у ангиогенези није јасно дефинисана. Постоје контрадикторни резултати у вези са улогом IL-17 у развоју тумора и ангиогенези. Код мишева, тумор трансфектован IL-17 показао је знатно мањи раст у поређењу са контролним туморима (251). Поред тога, раст тумора и метастазе на плућима су повећани код мишева са недостатком IL-17 (252), што сугерише да IL-17 инхибира развој тумора и неоваскуларизацију. Други су показали да IL-17 повећава развој крвних судова на роњачи пацова и васкуларност тумора на животињским моделима, што указује да IL-17 може бити важан за ангиогенезу (233). Међутим, постоје и подаци који сугеришу да сам IL-17 није у стању да индукује ангиогенезу, али може индиректно индуковати раст хуманих микроваскуларних ендотелних ћелија (HMVEC), промовишући митогену активност васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF), основног фактора раста фибробласта (bFGF) и фактора раста хепатоцита (HGF) (253). Заиста, IL-17 је про-ангиогени фактор који индукује неоваскуларизацију и раст тумора директном индукцијом производње VEGF-a и ангиогенина-2 стромалних (мијелоидних ћелија и фибробласта) и епителних ћелија (254,254,255).

Повезаност IL-17 и VEGF-а није потпуно разјашњена. Показано је да серумске концентрације IL-17 и VEGF-а корелирају међусобно и са негативном прогнозом, код оболелих од колоректалног (256) и неситноћелијског карцинома плућа (252). Показано је и да IL-17 директно индукује VEGF у неколико малигних ћелијских линија, укључујући карцином желуца, дојке и плућа (252,253,257,258). IL-17 такође може да стимулише ослобађање VEGF-а у нормалним фибробластима плућа, коже и рожњаче, синовиоцитима, и хондроцитним ћелијама(253,259–261). Такав ефекат, међутим, не делује као општа појава, јер секреција VEGF-а није откривена у дермалним микроваскуларним ћелијама стимулираним IL-17 (232,261).

Пацијенти са карциномом желуца чији су тумори имали већи ниво инфилтрације Th17 са већом експресијом IL-17 и IL-23 mRNA „пате“ од дубље инвазивне болести са већом учесталашћу лимфне захваћености (262).

1.4. Интерлеукин 8

Интерлеукин 8 (IL-8), такође познат као CXCL8, је про-инфламацијски СХС хемокин који је познат по улози у промоцији хемотаксије и дегранулације неутрофила (263). Примарна аминокиселинска секвенца интерлеукина-8 садржи два N-терминална цистеинска остатка одвојена јединственом аминокиселином која подстиче стварање две дисулфидне везе у структурама аминокиселина вишег нивоа (264). Присуство ове секвенце сврстава IL-8 у породицу хемокина CXCL, отуда скраћеница CXCL8. IL-8 припада супер-фамилији хемокина који имају хемотактичку активност за неутрофиле, еозинофиле, базофиле, моноците, мастоците, дендритске ћелије, NK ћелије, Т и В лимфоците (265). Синтеза IL-8 углавном је регулисана факторима транскрипције NF- κ B, ређе NF-IL6 (266). Ген који кодира цитокин IL-8/CXCL8 налази се на хуманом хромозому 4к13-21 и састоји се од четири егзона и три интрона (267). IL-8 се обично излучује у занемарљивим количинама и познато је да је његова експресија индукована различитим стимулусима, укључујући проинфламацијске цитокине, као што су IL-1 или фактор некрозе тумора (264), бактеријски или вирусни производи (268), и ћелијски стрес (266).

Биолошки ефекти IL-8 се остварују преко два површинска рецептора звана CXCR1 и CXCR2 (264). Ови рецептори деле изванредну сличност и хомологност у својој структури што сугерише да су продукт умножавања гена.

У нормалној физиологији, макрофаги, ендотелне ћелије и епителне ћелије производе IL-8 као одговор на инфекцију или повреду ткива, где је једна од функција IL-8 да индукује хемотаксију гранулоцита, пре свега неутрофила, на захваћено место. Једном када буде локализован на месту повреде, IL-8 може промовисати санацију инфекције индукујући фагоцитозу, оксидативни стрес и ослобађање DNA мреже познате као неутрофилне ванћелијске замке које хватају и убијају инвазивне микроорганизме (269). Друга функција IL-8 је активирање ангиогеног одговора. IL-8 сигнализација у васкуларним ендотелним ћелијама индукује пролиферацију ћелија, преживљавање и миграцију (270), што на крају кулминира формирањем нових крвних судова (271).

1.4.1. IL-8 у туморима

Претходне студије су показале да IL-8 индукује ангиогенезу (271) и убрзава прогресију многих карцинома код људи, укључујући рак простате (272), неситноћелијски карцином плућа (267), меланом (273) и рак јајника (274). Штавише, студије су показале да IL-8 има прогностичку вредност код многих малигних тумора (275). Аберантно повишен ниво IL-8 у серуму чак може претходити дијагнози карцинома плућа за неколико година (276).

Бројне студије су показале да прогресија и метастазирање тумора могу бити повезане са прекомерном експресијом IL-8 (277). Познато је да IL-8 учествује у прогресији тумора промовисањем „ангиогеног одговора“ ендотелних ћелија, регрутовањем неутрофила на месту тумора, и пролиферацији, преживљавању и миграцији туморских ћелија (265).

Бројна истраживања сугеришу да IL-8 игра критичну улогу током туморске ангиогенезе, раста и метастаза у хепатоцелуларном и назофарингеалном карциному, плућним канцерима, карциному простате, карциному желуца и панкреаса (278). Блиска повезаност експресије CXCL8 и васкулогенезе и метастазе приказана је и код других малигних

обољења, укључујући карцином желуца (196), карцином дојке (279), меланом (280) и карцином главе и врата (265).

Сматра се да IL-8 игра најмање пет улога у биологији примарних и метастатских карцинома, укључујући следеће: (1) контролисање инфилтрат леукоцита у ткиво тумора, (2) модификација имунског одговора тумора, (3) регулација ангиогенезе, (4) аутокрин или паракрин регулација раста тумора и преживљавање, и (5) промовисање миграције туморских ћелија (28). Докази показују да биолошка активност IL-8 у туморима и микро окружењу може допринети прогресији болести.

1.4.2. Регулација експресије IL-8 у туморима

Експресија IL-8 може бити индукована различитим стимулусима, као што су липополисахариди, цитокини (IL-1, TNF- α) и бактеријским или вирусним производима, док је IL-8 такође конститутивно експримиран код многих хуманих карцинома (277–279). Ћелијски стрес, као што су хипоксија и ацидоза, азотни оксид (NO) и ћелијска густина такође имају значајан утицај на експресију IL-8 у карциному људи (269). Имунохистохемијска студије су показале да је IL-8 преодминантно експримиран у туморским ћелијама које окружују некротичне области карцинома- глиобластома, малигног меланом и карцинома панкреаса (278,280,281). Kunz је са колегама (273) показао да у ћелијским линијама меланом аноксија може изазвати експресију IL-8 у високо агресивним/метастатским ћелијским линијама, али не и у слабо агресивним ћелијским линијама. Керин и сарадници такође су показали да хипоксија повећава брзину транскрипције гена IL-8 и стабилност транскрипта IL-8 код рака панкреаса (282). Смањење ванћелијског рН такође промовише хипоксијом посредовану регулацију IL-8 и изазива брзу експресију IL-8 у ћелијским линијама рака дебелог црева и панкреаса (283). Блага ацидоза (рН = 6,9 ~ 7,4) може активирати AP-1 и NF- κ B.

1.4.3. IL-8 и карцином желуца

Експерименти *in vitro* су показали да линије епителних ћелија желуца третиране са егзогеним CXCL8 повећавају експресију рецептора епидермалног фактора раста, MMP-9, и васкуларног ендотелног фактора раста; у исто време овај третман смањује експресију E-кадхерина и повећава инвазивни потенцијал ових ћелија. Клиничка истраживања су показала да CXCL8 нивои позитивно корелирају са обимом инвазије ткива и метастазама. У пацијената са CRC-ом, повишени нивои CXCL8 позитивно корелирају са величином тумора, нивоом инфилтрације, и метастазама у јетри. Повећана експресије оба CXCL8 рецептора у желудачној слузокожи позитивно корелира са метастазама карцинома желуца. Позитивна корелација између CXCL8 и инвазије ткива и метастазе је додатно потврђена *in vitro* експериментима, при чему смањење експресије CXCR1 и CXCR2 инхибира миграторну способност епителних ћелија желуца. Слично, прекомерна експресија CXCL8 у епителним ћелијским линијама колоне *in vitro* побољшава ћелијску пролиферацију, миграцију и инвазивни потенцијал. Фактор раста васкуларног ендотела (VEGF) и интерлеукин 8 (IL-8) доприносе прогресији гастроинтестиналних тумора, као што индукују и туморску ангиогенезу. VEGF побољшава пропустљивост туморских крвних судова, индукује активност серин протеазе или металопротеазе и инхибира апоптозу ендотелних ћелија и сазревање дендритских ћелија. IL-8 појачава митогену активност,

појачава ћелијску адхезију, и позитивно регулише металопроотеиназе. Показана је позитивна корелација између системских вредности IL-8 и метастаза лимфних нодуса, што је уобичајено код болесника са рекурентним карциномом желуца, као и код перитонеалне дисеминације. Kitada и сарадници приметили су да је експресија IL-8 била већа у ткиву карцинома желуца него у нормалном околном ткиву, и показао да су IL-8 mRNA и протеин локализовани у цитоплазми ових ћелија (284). Потврђена је продукција IL-8 у туморским ћелијама, *in vitro*. IL-8 у карциному желуца игра и улогу у ангиогенези. Неколико независних студија је показало у *in vivo* и *in vitro* условима да ћелијске културе хуманог карцинома желуца производе велику количину интерлеукина-8 (IL-8) после кокултивације са *H. pylori* (285–287). Различити типови инфламацијских стимулуса, укључујући LPS, IL-1, фактора некрозе тумора α (TNF α), могу активирати транскрипцију IL-8 гена у различитим ћелијама. IL-8 је главни цитокин за активирање неутрофила и игра централну улогу у имуно-патогенези повреде желудачне слузокоже индуковане *H. pylori*. Ниво IL-8 је 10 пута већи у узорцима карцинома него у нормалном желучаном ткиву (288).

1.4.4. IL-8 и ангиогенеза

Стопа преживљавања пацијената са карциномом желуца значајно је смањена код пацијената са туморима који експримирају висок ниво CXCL8 (196). Различити сигнални молекули произведени током метаболизма тумора могу изазвати лучење CXCL8, што резултира промовисањем ангиогенезе тумора. Производња лактата индукује аутокрину производњу CXCL8 и тако промовише ангиогенезу тумора у *in vivo* моделу колоректалног карцинома (283). Експериментално, повећана експресија CXCL8 *in vivo* повећала је стварање крвних судова. CXCL8 доприноси ангиогенези преко вишеструких механизма, укључујући индукцију експресије васкуларних ендотелних фактора раста (289) као MMP-2 и MMP-9 ендотелних ћелија; ова два фактора су укључена у деградацију базалне мембране током ангиогенезе. CXCL8 је такође способан да индукује пролиферацију и ендотелних ћелија капилара (290). Коначно, показало се да и CXCL8 инхибира апоптозу ендотелних ћелија.

CXCL8 индукује ангиогенезу

Укључивање IL-8 у туморску ангиогенезу су први пут демонстрирали Smith и сарадници, који су показали да је IL-8 прекомерно експримиран у ћелијама бронхогеног карцинома. Ангиогена активност IL-8 из макрофага и IL-8 добијених из туморских ћелија потврђена је касније у неколико студија (279,291,292). Интеракција IL-8 и IL-8R може промовисати ангиогенезу кроз индукцију миграције ендотелних ћелија, пролиферацију и хемотаксу (278,293). Неколико студија је показало у ксенографт моделима да је прекомерна експресија IL-8 директно у корелацији са ангиогенезом, туморигенезом и метастатским потенцијалом у неким ћелијским линијама карцинома, као што је хумани меланом, карцином панкреаса, простате, желуца и мокраћне бешике (272,282,288). Naraguchi и сарадници (283) су показали да су код колоректалног карцинома, ниво IL-8 у ткиву тумора и серумски IL-8 у корелацији са микроваскуларном густином, и серумски IL-8 нивои су били већи у Dukes C колоректалним карциномом са метастазама него код Dukes A и B. Tahara и др. (294) показали су да се IL-8, IL-8 RA и IL-8 RB изражавају у већини

карцинома желуца, а IL-8 повећава експресију EGF рецептора, VEGF-a и самог IL-8 од стране самих туморских ћелија, док IL-8 смањује експресију E-кадхерина и повећава експресију и активност MMP-9. Ови резултати сугеришу да се IL-8 произведен у ћелијама карцинома желуца користи за одржавање ангиогенезе и инвазије ткива и метастаза путем аутокриних/паракриних механизма.

У биопсијама ткива мукозе пацијената са желудачним карциномом нађене су повећане вредности CXCL8 које паралелно повећавају васкуларизацију тумора (295). Преживљавање болесника са желудачним карциномом је значајно смањено код болесника са туморима који експримирају висок ниво CXCL8 (287,288). Експериментално, повећана CXCL8 експресија *in vivo* појачава формирање крвних судова, док генетичко брисање CXCR2 поништава ове ефекте.

Истраживања су показала да CXCL8 доприноси ангиогенези путем вишеструких механизма, укључујући индукцију експресије VEGF-a као и MMP -2 и MMP-9 у ендотелним ћелијама. Ова два фактора су укључени у деградацију базалне мембране током ангиогенезе (294). Коначно, CXCL8 такође инхибира апоптозу ендотелних ћелија путем повећања експресије антиапоптичких протеина, што као су Bcl -Ks L и Bcl-Ks S.

1.5. Ангиогенеза

Истраживање ангиогенезе тумора је један од главних фокуса у биомедицини. Историјски, др Вирхов је први идентификовао огроман број крвних судова у туморима 1863. Године (296). Неколико деценија касније 1907., Голдман је први описао васкуларизацију тумора у карциномима стомака, јетре и других органа (297). 1913. Murphy је описао ангиогени одговор изазван Jensen-овим ћелијама саркома пацова у хориоалантоичној мембрани пилића (САРМ) (298). Израз "ангиогенеза" први пут је употребљен 1935. године и описивао је формирање нових крвних судова у плаценти (299), а четири године касније за зарастање рана и раст тумора (300,301). Међутим, тек је 1971. Folkman изнео хипотезу да инхибиција ангиогенезе може бити потенцијални начин да се инхибира прогресија тумора (302). Након тога, независне студије Senger и Dvoraka, Ferrara и Henszela, као и Connolly-ја и његових колега омогућиле су дефинисање, идентификацију и клонирање васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF), кључног проангиогеног фактора (303–306).

Ангиогенеза игра централну улогу у разним физиолошким процесима у људском телу, не само током развоја фетуса, већ и у обнови ткива након операције или трауме. Ангиогенеза може бити знак зарастања рана, менструалног циклуса, карцинома и разних исхемијских и запаљенских болести (226). Поље истраживања ангиогенезе тумора утврђено је приближно 1970-их Фолкмановом хипотезом да раст тумора зависи од ангиогенезе (302). Поред раста тумора, друго обећавајуће поље на које је ангиогенеза привукла пажњу као критична мета су кардиоваскуларне болести (307). Раст нових капилара из постојећих крвних судова је сложен вишестепени процес који садржи низ ћелијских догађаја који воде неоваскуларизацији (308).

1.5.1. Ангиогенеза у физиолошким процесима

Ангиогенеза је сложен процес који захтева координисану активност различитих васкуларних компоненти: поделу ендотелних ћелија, деградацију мембрана васкуларног корита и околног ванћелијског матрикса и миграцију ендотелних ћелија. Про-ангиогени молекули се одржавају у стању мировања и регулишу се када је потребна ангиогенеза за физиолошке процесе, као што су репродукција, ембриогенеза, диференцијација органа и поправљање ткива (309). У физиолошким условима, спољни стимулуси, укључујући хипоксију, хипогликемију, и механички стрес, активирају високо уређену мрежу ангиогенезе (310). Хипоксија, најчешће проучавано активацијско средство, појачава фактор-индукован хипоксијом (HIF-1), mTOR, киназе ендоплазматског ретикулума и растворљиве гуанил циклазе, што индукује развој васкулатуре и органа током ембриогенезе (309). Код одраслих је ангиогенеза укључена у одржавање васкулатуре у зарастању рана, исхемији, оваријалној функцији, као и пролиферацији ендометријума током репродуктивног циклуса и у формирању плаценте (311).

1.5.2. Ангиогенеза тумора

Ангиогенеза тумора, процес којим крвни судови продиру и расту у микроокружењу тумора, од суштинског је значаја за снабдевање кисеоником и хранљивим материјама, а самим тим и за опстанак чврстих неоплазми. Узимајући у обзир улогу у прогресији тумора и метастазама, ангиогенеза је једна од основних карактеристика карцинома (312). Будући

да су Фолкманове пионирске студије поставиле почетне темеље ангиогенезе тумора пре 40 година, истраживање у пољу достигло је значајан ниво зрелости, омогућавајући детаљан опис сложених процеса патолошке пролиферације крвних судова (302).

1.5.3. Механизми ангиогенезе

Крвни судови се могу описати као високо разгранате цевасте мреже које омогућавају транспорт гасова, хранљивих материја, сигналних молекула и ћелија. Поред своје хранљиве функције, крвни судови пружају почетне трофичке сигнале неопходне за морфогенезу органа и развој сваког сложеног организма (313). Док је луминална страна свих врста крвних судова, укључујући артерије, вене и капиларе, формирана једноредним ендотелним ћелијама, споља су покривене базалном мембраном, а затим слојем помоћних ћелија (перицити и ћелије васкуларног глатког мишића). Прототипски, васкулогенеза и ангиогенеза клијања су два главна механизма одговорна за неоваскуларизацију. Ангиогенеза клијања дефинисана је као формирање нових васкуларних структура из постојећег крвног суда, док се васкулогенеза односи на ново формирање крвних судова услед диференцијације васкуларних прогениторних ћелија. Оба механизма који доприносе формирању и преуређивању мреже судова током развоја, остају готово неактивни у организму одраслих и реактивирају се само како би се омогућило поправљање ткива или у случају болести. Поред васкулогенезе и ангиогенезе клијања, недавно су описани и други мање учестали механизми, укључујући ко-оптацију крвних судова, интусусцепцију и васкулогену мимикрију. У већини случајева, сви ови процеси међусобно се не искључују и истовремено учествују и у физиолошкој и у патолошкој ангиогенези.

Први ангиогени фактор раста, основни фактор раста фибробласта (β FGF), припада породици FGF. β FGF стимулише све главне кораке у каскади ангиогенезе и производе га многе ћелије, међу којима су макрофаги и ћелије тумора. Иако FGF нема сигналну секвенцу која омогућава редовно лучење, он се ослобађа у ванћелијском матриксу након чега се покреће ангиогенеза. β FGF је плејотропни митоген за раст и диференцијацију, за који се зна да учествује у пролиферацији ендотелних ћелија, разградњи ванћелијског матрикса, миграцији ендотелних ћелија и модулацији адхезивних молекула (314).

Породица ангиопоетина, још једна значајна породица фактора раста у ангиогенези, укључује три члана (код људи), наиме ангиопоетин-1 (Ang-1), ангиопоетин-2 (Ang-2) и ангиопоетин-4 (Ang-4) који се сви везују за рецептор ендотелне тирозин киназе Tie-2. Ang-1 активира Tie-2 сигнализацију док Ang-2 инхибира ову активацију. Ang-1 је укључен у миграцију ендотелних ћелија, адхезију и регрутовање перицита и ћелија глатких мишића, док је Ang-2 дестабилизатор крвних судова (310). Ang-1 се производе многе врсте ћелија, укључујући ћелије мурала (перицити, ћелије глатких мишића), фибробласта и моноцита, делујући на тај начин паракрино; Ang-2 готово искључиво производе ендотелне ћелије (315). Улога Ang-1 у туморској ангиогенези је контроверзна. У ствари, његова прекомерна експресија подстиче дивергентне одговоре у зависности од типа тумора, у распону од промоције до ограничења раста (316). Ang-2 је главни ангиопоетински лиганд у туморима (317). Његов ниво је регулисан хипоксијом (315). Прекомерна експресија Ang-2 у ћелијама карцинома дојке индукује интратуморално крварење и нефункционалне и ненормалне крвне судове (318,319). Делује кординисано са VEGF -ом, а функционална корелација координисане активности VEGF/Ang-2 је повећање пропусности крвних судова домаћина, губитак функције крвно-мождане баријере у

церебралним судовима, микроваскуларна дилатација и стварање клице. У каснијој фази развоја тумора, Ang-2 и VEGFR-2 су високо експримирани у ћелијама домаћина али и у туморским ћелијама (320).

Улога запаљења и инфламацијских ћелија у развоју и напредовању тумора је добро позната. Циркулишући леукоцити, црвена крвна зрна и тромбоцити учествују у ангиогенези излучивањем VEGF-а (321), што објашњава ангиогенезу у туморима крвних ћелија. Поред VEGF-а, активирани тромбоцити ослобађају и друге ангиогене протеине, укључујући FGF, фактор раста сличан инсулину 1 (IGF-1) и тромбоцитни фактор раста (PDGF) као и Ang, CXCL12, MMP- (металопротеиназа-) 1, MMP-2 и MMP-9 (321). VEGF, β FGF, епидермални фактор раста (EGF), PDGF и TGF- , такође продукују тумор асоцирани макрофаги (322). Након регрутовања и активације, макрофаги излучују широк спектар фактора раста, цитокина (као што су IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 и IL-17) (323), хемокина и ензима који разграђују матрикс и олакшавају миграцију ендотелних ћелија преко ремоделирања ванћелијског матрикса. У хипоксичном окружењу попут оног у туморима, хипоксија регулише експресију различитих проангиогених хемокина у макрофагима, укључујући CXCL 12, CCL2, CXCL8, CXCL1, CXCL13 и CCL5 (324,325).

1.5.4. Васкулогенеза

Васкулогенеза је опсежно описана у раним фазама васкуларног развоја. Тек 1997. године откривено је да се раст нових крвних судова у постембрионим ткивима догађа и путем васкулогенезе (326). Штавише, убедљиви докази упућују на то да циркулирајуће ендотелне ћелије прогенитори (EPC, ангиобласти) које потичу из коштане сржи доприносе индукцији и прогресији постнаталне неоваскуларизације (327), и експримирају неколико специфичних маркера ендотелне лозе као што су CD34, CD31, VEGFR-2 и Tie-2. Заједно са EPC-ом, зреле циркулишуће ендотелне ћелије које потичу из крвних судова такође учествују у васкулогенези одраслих. Штавише, да би се олакшала инкорпорација тих ендотелних циркулишућих ћелија и одржала стабилност урођене васкулатуре, регрутују се хематопоетске матичне и прогениторне ћелије (328). Неколико хемокина, цитокина и фактора раста који се стварају као одговор на исхемију ткива и раст тумора подстичу мобилизацију и регрутовање EPC-а.

Мобилизација EPC-а започиње након активирања матриксне металопротеазе 9 (MMP9) у остеобластичној зони. Активација MMP9 покреће протеолитичку обраду мембрански везаног Kit лиганда у свом растворљивом активном облику. Солубилни Kit лиганд је цитокин активан у матичним ћелијама који поспешује миграцију хематопоетских и ендотелних ћелија прогенитора у васкуларну зону коштане сржи и њихово ослобађање у циркулацији (329). У овом кораку, P-селектин, E-селектин и интегрини су критични за исправно пријањање EPC-а на зидове суда (330). Диференцијација у зреле ендотелне ћелије углавном је посредована VEGF-ом. Поред физичког доприноса EPC-а новоформираним судовима, EPC подржавају ангиогенезу паракриним механизмом који укључује ослобађање проангиогених фактора (331). Допринос васкулогенезе формирању туморских судова креће се од 0,1 до 50%, зависно од експерименталног модела и типа тумора. Поред активирања ангиогенезе, EPC су у стању да подстакну раст метастазе усмеравањем у метастатска места пре доласка туморских ћелија (328). Спонтана секреција SDF-1 од стране EPC-а ствара градијент који може промовисати екстравазацију и развој пре-метастатске нише (332).

1.5.5. Ангиогенеза „клијања“

Ангиогенеза „клијања“ је најбоље описани механизам који тумори користе да би промовисали сопствену васкуларизацију индукујући нове капиларне клице из постојећих капилара домаћина. Механизам укључује неколико добро дефинисаних секвенцијалних корака и интеракцију између солубилних фактора, компоненти ванћелијског матрикса (енгл. *Extracellular Matrix*, ЕСМ) и ћелија (333). На почетку ангиогенезе клијања дестабилизују се ендотелни перичитни контакти који су неопходни за интегритет крвних судова и одржавање мировања. Ендотелне и муралне ћелије деле сложену базалну мембрану која формира заштитни омотач око ендотелних тубула, спречавајући тако да резиденцијалне ендотелне ћелије напусте своје место. Једном дестабилизоване, ендотелне ћелије пролазе ендотелно-мезенхимски прелаз који појачава њихова миграторна, инвазивна и пролиферативна својства. Те активирание ћелије су у стању да разграде околну ЕСМ и базалну мембрану активираним протеазама (попут ММП-а), отварајући пут за навођену миграцију и пролиферацију. Затим се формира лумен крвног суда поларизацијом ендогених ћелија које мигрирају (334). На овом кораку формира се незрели крвни суд, а супротни мезенхимално-ендотелни прелаз усмерава преокрет пролиферативног стања ендотелних ћелија у претходно стање мировања. Повратак мировању се дешава синтезом нове базалне мембране и регрутовањем перичитних и муралних ћелија (313). Овај последњи корак је познат као сазревање судова и карактерише га недостатак ангиогенезе тумора. Главна група сигналних путева неопходних за почетне морфогенетске догађаје укључује VEGF и Notch (335). Процес клијања се дешава све док се проангиогени сигнали не смање, формира се нова базална мембрана, поново успостави мировање (336). У прелазу из активног клијања у мировање, ћелије ендотелних врхова усвајају фенотип сличан „фаланзи“, са карактеристикама луменизованих, непролиферативних и непокретних ћелија (337). На крају, зрелост и стабилизација постижу се стварањем лумена и миграцијом перичита дуж базне мембране док се крвни судови не покрију, што покреће крв и омогућава перфузију.

1.5.6. Разлике између физиолошке и неоваскуларизације тумора

У физиолошким условима, већина крвних судова одраслих особа остаје у мировању, са минималном стопом пролиферације ендотелних ћелија у сврху одржавања промета ћелија и васкуларног интегритета. Ангиогенеза је ограничена на велике метаболичке потребе растућих ткива или зарастање рана и поправљање ткива. Током одрасле доби, три различите локације женских репродуктивних органа чине неколико ткива одраслих којима је потребна стална ангиогенеза: (I) месечно, током репродуктивног циклуса, како би се обновила слузница материце; (II) у јајницима током сазревања јаја у овулацији; и (III) током трудноће како би се синтетисала плацента (338). Посебно, раст фоликула и развој жлезда корпуса у потпуности зависе од ангиогенезе, што омогућава почетни брзи раст корпуса лутеума и касније регресију фоликуларних крвних судова. Координирано и временски регулисано деловање индуктора и инхибитора ангиогенезе регулише ток циклуса јајника (339). VEGF се сматра главним стимулусом током васкуларног раста у функцији оваријума, чија је експресија временски и просторно повезана са пролиферацијом крвних судова у јајнику и јавља се прво у периваскуларним ћелијама. Поред тога, азотни оксид, моћан вазодилататор и стимулатор производње VEGF-а,

ослобађају ендотелне ћелије лутеалних артериола и капиlara. Стога се успоставља параракрина сигнална петља између периваскуларних ћелија, које производе VEGF, и ендотелних ћелија, које производе азотни оксид, осигуравајући координирану регулацију ангиогенезе и вазодилатације (340). Иако већина васкуларног плексуса остаје мирна у ткивима одраслих, ендотелне ћелије задржавају способност брзог дељења као одговор на физиолошки стимулус, као што је инфламација или хипоксија. На пример, током зарастања рана, ангиогенеза се поново активира за регенерацију оштећених ткива. У овом контексту, неколико проангиогених фактора као што су VEGF и Ang-2 брзо се прекомерно експримира, док је Ang-1 регулисан сличном кинетиком, омогућавајући дестабилизацију постојећих судова и формирање нових капиlara. Напокон, VEGF и Ang-2 враћају се на почетне нивое како би омогућили тренутно сазревање и стабилизацију нових крвних судова. Читав процес је у потпуности контролисан у одређеној временској и просторној секвенци, што резултира у чврсто регулисаној равнотежи про- и анти-ангиогених молекула (341). Као резултат подешене равнотеже, ови физиолошки процеси индукују стварање стабилног и функционалног васкуларног стабла. Супротно томе, промена равнотеже између негативних и позитивних регулатора ангиогенезе поспешује абнормални раст крвних судова, што се може видети у многим патолошким стањима. Промена равнотеже може индуковати прекомерну или дефектну ангиогенезу која може појачати или погоршати патолошке симптоме. Као што је објашњено у претходним одељцима, најпознатије стање у коме се укључује ангиогенеза је карцином. Међутим, други примери прекомерне ангиогенезе који настају када оболеле ћелије производе абнормалне количине фактора раста укључују, између осталог, инфламацију, гојазност, дијабетес, цирозу или астму. Насупрот томе, недовољна ангиогенеза повезана је са дисфункцијом крвних судова и болестима попут остеопорозе, исхемијске болести срца или прееклампије (313). Иако физиолошка и патолошка ангиогенеза деле већину молекуларних механизма, они се разликују у многим карактеристикама. Неколико линија доказа показује да су молекули попут циклооксигеназе-2, протеазе, TSP-2 и фактора раста на месту посебно укључени у патолошку неоваскуларизацију. Штавише, патолошка ангиогенеза се обично одређује инфламацијом или хипоксијом, па је стога окарактерисана инфилтрацијом макрофага и леукоцита у оболела ткива.

И на морфолошком и функционалном нивоу, туморски крвни судови показују јединствене карактеристике које их разликују од нормалних. Микро окружење тумора карактерише неконтролисана и континуирана прекомерна производња ангиогених фактора. Таква екстремна стимулација ендотела води развоју незреле и структурно и функционално абнормалне васкулатуре (342). У ствари, васкуларно стабло тумора је хаотично, испуњено је слепо завршеним васкуларним гранама и подручјима испрекиданог и реверзног крвотока који смањује васкуларну функцију и доводи до подручја снижене перфузије и касније хипоксије (343). Настала нередовна перфузија спречава испоруку хранљивих материја и кисеоника. Регије сиромашне крвним судовима прате веома густа подручја, а када се погледа микроскопом, туморски судови варирају од неправилних, ненормално широких, тортуозних и облика попут серпентина, с неравномерним пречником и прекомерним гранањем, до танких капиlara са малим луменима. Поред тога, сваки слој зида туморског суда је такође ненормалан. Ендотелне ћелије васкуларизације тумора слабо су повезане, и формирају повремене вишеслојне слојеве. Штавише, туморске судове карактерише неправилна базална мембрана и недостатак функционалних периваскуларних ћелија, што их чини пропусним и са бројним отворима, проширеним међућелијским

спојевима и испрекиданом базалном мембраном. На молекулском нивоу се наводи да ендотелне ћелије из тумора регулишу различите гене у поређењу са нормалним ендотелним ћелијама, и називају се туморским ендотелним маркерима или ТЕМ (344). Структурне неправилности туморских судова су последице патолошке неравнотеже активатора и инхибитора ангиогенезе. Молекулске студије су показале изражену регулацију mRNA VEGF код већине хуманих тумора (334). VEGF који ослобађају ћелије тумора и строма не само да покреће пролиферацију ендотелних ћелија и ангиогенезу клијања, већ и промовише повећану васкуларну пропустљивост, што чини да туморски судови буду веома пропусни. Трајна неравнотежа у производњи проангиогених фактора и трајни недостатак фактора који стабилизују крвне судове ствара незрелу и нефункционалну васкуларну мрежу која подсећа на структуру суда која није у стању да се избори са брзом стопом раста масе тумора која се шири (343).

1.5.7. Ангиогенеза карцинома желуца

Бројна истраживања показују да је ангиогенеза у туморском ткиву под контролом различитих фактора које ослобађају и туморске и стромалне ћелије. У случају тумора гастроинтестиналног система, најзначајнији ангенени фактори су: васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF), фактор раста фибробласта (FGF), интерлеукин 8 (IL-8) и ендотелни фактор раста ендотелног порекла (PD) -ECGF (222). Међу њима се сматра да је VEGF једна од најистакнутијих одредница ангиогенезе у карциному желуца. Описано је да висока концентрација VEGF-а може изазвати агресивни раст и метастазирање тумора. Због тога, пацијенти са VEGF позитивним туморима имају лошију прогнозу од болесника са VEGF негативним туморима (227). У том контексту, студија Schimanskog и сарадника је дефинисала утицај VEGF -A, -B, -C и -D на дисеминацију и опстанак тумора код пацијената са карциномом желуца. Показано је да је експресија VEGF -D била значајно повезана са изразитом метастатском болешћу, али не и са преживљавањем пацијената (345). Студија Нап и сарадника показала је да су пацијенти са експресијом VEGF -C у туморском ткиву имали значајно нижу стопу преживљавања у поређењу са пацијентима без експресије VEGF -C у туморском ткиву. Стопа преживљавања је значајно ниже и код пацијената са експресијом VEGF рецептор-3 (VEGFR-3) у туморском ткиву, у поређењу са онима који без експресије VEGFR-3. Дакле, може се рећи да експресија VEGF -C и VEGFR-3 корелира са лошијом прогнозом болести (346).

Неколико студија је испитивало циркулирајући ниво VEGF -A код пацијената са карциномом желуца и корелирало ниво са клиничко-патолошким карактеристикама тумора, исходом и одговором на терапију (347–349). Седам студија пронашло је повезаност између циркулишућих нивоа VEGF -A у плазми или серуму и укупног преживљавања, а две студије откриле су повезаност између нивоа VEGF -A и стадијума болести. Само једна студија није открила повезаност између нивоа VEGF -A у плазми и укупног преживљавања. Једно истраживање је проценило нивое VEGF -A у серуму у пре- и пост-оперативном периоду код пацијената са карциномом желуца и открили да су нивои VEGF -A у серуму смањени након операције и да су преоперативни нивои VEGF -A у серуму били независни прогностички фактор за преживљавање (350). Такође је утврђено да су нивои VEGF -A у плазми повећани код пацијената са карциномом желуца који имају туморе са венском инвазијом и метастазама у лимфним чворовима у поређењу са туморима без венске инвазије или метастазама у лимфним чворовима (351). Укратко,

већина студија које су испитивале системске вредности VEGF -A код пацијената са карциномом желуца показале су повезаност између нивоа VEGF -A и укупног преживљавања или стадијума болести.

17 примарних студија и три метаанализе откриле су повезаност између експресије VEGF -A и преживљавања. Једна метаанализа од 30 студија ($n = 2.166$) проценила је повезаност експресије VEGF -A, анализирани имунохистохемијом, и преживљавање код пацијената са карциномом желуца. Стопе пацијената са већом експресијом VEGF -A кретале су се од 26,7 до 89,9%.

Још један од фактора раста који учествује у стварању туморских крвних судова је FGF. У контексту ангиогенезе, два најдетаљније проучена FGF су кисели фактор раста фибробласта (α FGF или FGF-1) и основни фактор раста фибробласта (β FGF или FGF-2). Све већи број доказа упућује на то да FGF може деловати заједно са VEGF-ом да би интензивирао ангиогенезу тумора (352). Циљање путева FGF и VEGF синергистички може бити ефикасније у сузбијању раста и ангиогенезе тумора него циљање било ког другог фактора појединачно. Описано је да је код пацијената са карциномом желуца FGF прекомерно експримиран (353). Доказана је позитивна корелација између експресије FGF и инвазивности тумора и метастаза у лимфним чворовима. Експресија FGF-2 корелира са рецидивом након ресекције карцинома желуца (354).

Цитокин који може стимулисати поделу ендотелних ћелија и затим подстаћи ангиогенезу је IL-8. Куаи и сарадници у својој студији закључују да је прекомерна експресија IL-8 у ћелијским линијама карцинома желуца вероватно одговорна за повећану адхезију ћелија, миграцију, и инвазију. Сматра се да је експресија IL-8 такође повезана са резистенцијом на оксалиплатин. Инхибиција IL-8 експресије са малом интерферирајућом RNK смањује адхезију, миграцију, инвазију и резолуцију оксалиплатина у ћелијама желуца KATO-III. Ови резултати указују да IL-8 може деловати као мета у терапији карцинома желуца (355). Треба напоменути и да количина IL-8 mRNA у неоплазми значајно корелира са васкуларизацијом. Стога се сматра да IL-8 регулише неоваскуларизацију у карциному желуца (196,356).

1.5.8. Инфламација и ангиогенеза код карцинома желуца

Доказано је да је у основи 15-20% карцинома инфламација. У генези карцинома приказана су два одређена фенотипа макрофага: класично активирани макрофаги (M1) и алтернативно активирани макрофаги (M2). Треба напоменути да се макрофаги локализовани у строми тумора називају тумор-асоцирани макрофаги- TAM. Ове ћелије регрутују се из циркулишућих моноцита као одговор на хемоатрактанте, укључујући моноцитни хемоатрактантни протеин-1 (MCP-1) и запаљенски протеин макрофага-1 α (MIP-1 α) (357,358). Студија Vu и сарадника показује да TAM могу да подстакну ангиогенезу и лимфангиогенезу код оболелих од карцинома желуца, вероватно посредством VEGF-a. Такође, детектована је позитивна повезаност између броја TAM и микроваскуларне густине (MVD) (359). Штавише, у карциному желуца велики број TAM корелира са метастазама у лимфним чворовима, интестиналним типом тумора и експресијом Fas лиганд (FasL). Ови резултати могу сугерисати да TAM „сарађују“ са FasL-ом туморских ћелија и представљају препреку инфилтрацији CD8⁺ Т лимфоцита у туморску микросредину. Експресија FasL у CD8⁺ Т лимфоцитима и у природним ћелијама убицама (NK) игра значајну улогу у FasL- посредованом убијању туморских ћелија (360).

Један од најзначајнијих хемоатрактаната за регрутовање макрофага је MCP-1, који производе туморске ћелије. Kuroda и сарадници су показали је да је трансфекција гена за MCP-1 у ћелије тумора одговорна за снажну инфилтрацију макрофага у ткиво тумора и појачани метастатски потенцијал у мишјем ортотропном моделу имплантације (361). Идеја да MCP-1 игра значајну улогу у патогенези карцинома снажно је подржана студијом Futagami и сарадника, који су анализирали експресију MCP-1, његовог рецептора CCR2 и експресију CD40 лиганда (CD40L) у ткиву карцинома. Њихови резултати показују да је у ткиву карцинома желуца постојала значајна корелација између микроваскуларне густине и експресије CD40L, MCP-1 и CCR2 (362).

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1. ГЛАВНИ ЦИЉЕВИ

Основни циљ планираног истраживања је да се испита улога интерлеукина-32 у процесу ангиогенезе карцинома желуца.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Одредити експресију IL-32, VEGF-a, IL-8, IL-17 и микроваскуларне густине (MVD) у туморском, перитуморском и ткиву здраве желудачне слузнице;
2. Испитати повезаност експресије IL-32 са експресијом VEGF-a и микроваскуларном густином (MVD) у туморском, перитуморском и ткиву здраве желудачне слузнице;
3. Испитати повезаност експресије IL-32, VEGF-a и микроваскуларне густине (MVD) са експресијом IL-8 и IL-17 у наведеним ткивним узорцима;
4. Испитати повезаност експресије IL-32, VEGF-a, микроваскуларне густине (MVD), IL-8 и IL-17 са стандардним клиничко-патолошким параметрима тумора.

2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Експресија IL-32, VEGF-a, IL-8 и IL-17 значајно је већа у туморском у односу на перитуморско ткиво и ткиво здраве желудачне слузнице;
2. IL-32 је у корелацији са повишеним маркерима ангиогенезе у ткиву карцинома желуца, и стимулише процес ангиогенезе код ове болести ;
3. Експресија IL-32 је позитивној корелацији са другим проангиогеним цитокинима (IL-17 и IL-8).

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Одобрење етичког комитета

Истраживање је спроведено на Клиници за општу и грудну хирургију, Клиничког центра у Крагујевцу, Србија, Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија и Центру за патоанатомску дијагностику, Клиничког центра у Крагујевцу, Србија за период од 2002. до 2016. године.

Спровођење студије на материјалу узетом од болесника одобрио је Етички комитет Клиничког центра Крагујевац, (одлука број 01-11478 од 12.09.2016. године), као ретроспективно – проспективну непрофитну студију, у области изучавања основних патогенетских механизма болести коришћењем патохистолошког материјала узетом од пацијената, из постојеће архиве, а само за потребе научноистраживачког истраживања. Пре спровођења истраживачког поступка, болесници су информисани о истраживању, након чега су потписали информисани пристанак за учешће у студији. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом добре клиничке праксе (енгл. *Good Clinical Practice, GCP*).

3.2..Испитивана_популација

У студију су укључени анализирани ткивни узорци 80 пацијената са карциномом желуца који су оперативно лечени (ресекционим процедурама желуца) у Клиници за хирургију Клиничког центра Крагујевац, у периоду од 2002. до 2016. године а којима је болест дијагностикована у Центру за пато-анатомску дијагностику Клиничког центра Крагујевац. Дијагноза карцинома желуца је постављена на основу ендоскопских и хистопатолошких критеријума. Класификација је учињена према критеријумима AJCC (енгл. *American Joint Committee on Cancer*) и UICC (енгл. *The Union for International Cancer Control*) - TNM, градирање тумора према класификацији WHO (енгл. *World Health Organization*). У студију су укључени пацијенти са карциномом желуца, који је био ресектабилан што је дефинитивно утврђивано интраоперативно. Искључујући критеријуми за одабир оболелих су били: пацијенти са недовољно јасно дефинисаним патохистолошким налазом, затим са нересектабилним карциномом желуца, пацијенти без адекватних и/или потпуних клиничких података, као и они који су преоперативно третирани хемио- или радиотерапијом. Након тога, сви пацијенти подељени су на две групе у зависности од патохистолошке дијагнозе тумора на оне са интестиналним и са дифузним типом карцинома желуца, по Lauren- овој класификацији (133). Укупан број пацијената са интестиналним типом карцинома желуца је 60, а са дифузним типом 20.

Ткивни узорци су подељени на три групе: туморско ткиво, перитуморско ткиво (околина тумора), и здрава слузница (без елемената тумора) као контролна група.

Након фиксације и рутинске обраде ткивног материјала дијагноза је постављана на основу Н&Е (енгл. *Hematoxylin and eosin staining, H&E*) и стандардног имунохистохемијског бојења.

Хистопатолошки извештај садржи податке о патолошком стадијуму болести (енгл. *Pathologic TNM classification*, pTNM) базиран на величини тумора и присуству метастаза у регионалним лимфним нодусима, хистолошком типу и степену диференцијације тумора, нуклеарном градусу и митотском индексу, присуству стромалне моноклеарне реакције, дезмоплазије, некрозе у тумору, постојању лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије. Анализом су обухваћени и старост и пол пацијената.

Хистопатолошке (микроскопске) особине су подразумевале одређивање хистолошког (HG) и нуклеарног градуса (NG) тумора. Хистолошки градус тумора означава степен диференцијације и број митоза туморских ћелија и у складу је са агресивношћу тумора. У односу на њега болесници су подељени у две категорије: оне са добро и средње диферентованим типом тумора као лезије ниског степена, и слабо диферентованим типом тумора као лезије високог степена, према водичима СЗО (363).

Нуклеарни градус је такође параметар који указује на степен малигности ћелија. Заснива се на одређивању измењености морфологије једра малигне ћелије у односу на непромењену, здраву ћелију. Дефинише се као низак (NG I), средњи (NG II) и висок (NG III) нуклеарни градус (364,365).

Митотски индекс представља однос броја ћелија које се деле у односу на број ћелија који не пролазе кроз митозу, у одређеној ћелијској популацији (366).

3.3. Фиксација ткива и бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Ову врсту обраде ткива смо радили према процедури описаној у раду Јовановића и сарадника (367). Узорци ткива су фиксирани у раствору формалина. Затим су узорци дехидратисани потапањем кроз серију алкохола растуће концентрације а попречни пресеци дебљине 4- 5 μm сечени на микротому (Leica RM 2135, Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Затим је уследило стандардно бојење методом хематоксилин-еозин. Овако припремљени ткивни исечци су анализирани светлосним микроскопом.

3.4. Имунохистохемијски метод бојења VEGF, IL-32, IL-17, IL-8 и CD31 ткивних исечака калупљених у парафину

Експресија **VEGF, IL-32, IL-17, IL-8 и CD31** у ткиву карцинома желуца испитана је имунохистохемијски, коришћењем моно и поликлоналних антитела: анти- VEGF (ab16883, Abcam, Cambridge, UK, 1:200), анти- IL-32 (ab37158, Abcam, Cambridge, UK, 10 $\mu\text{g/ml}$), анти- IL-17 (ab79056, Abcam, Cambridge, UK, 1:100), анти- IL-8 (ab18672, Abcam, Cambridge, UK, 1:1000) и анти- CD31 (ab79056, Abcam, Cambridge, UK, 1:200). Процес је у потпуности обављен према процедури описаној у раду Јовановића и сарадника (367).

3.5. Имунохистохемијско скоровање (Квантификација имунохистохемијског бојења)

Експресију испитиваних имунохистохемијских маркера у ткиву тумора, перитуморском ткиву и здравој слузници су одређивала два истраживача.

За одређивање имунохистохемијског (ИНС) скорa за интерлеукин 32 коришћен је семи-квантитативни модификовани скоринг систем, према Joosten-у и Seo-у (368,369), према коме се оцењују проценат обојених ћелија у туморском ткиву и интензитет бојења. Скор је добијен као збир појединачних вредности за проценат и интензитет бојења туморских ћелија. Скала за оцењивање експресије (процент позитивних ћелија) се кретала у интервалу од 0 до 3: 0=одсуство имунохистохемијске реакције или мање од 10 % позитивних ћелија; 1=од 11% до 25% позитивних ћелија; 2=од 26-50% позитивних ћелија; 3=више од 51% позитивних ћелија. Интензитет бојења је квантификован вредностима од 0 – 3: 0 – нема имунохистохемијског бојења; 1 – слаб интензитет имунохистохемијског бојења; 2 – умерен интензитет имунохистохемијског бојења; 3 – јак интензитет имунохистохемијског бојења (табела 1). Укупан скор добијен збиром појединачних вредности износио је од 0 до 6.

Интерлеукин 32 – евалуација имунохистохемијске експресије			
Скор	Процент позитивних ћелија	Скор	Интензитет имунохистохемијског бојења
0	Мање од 10% позитивних туморских ћелија	0	Нема имунохистохемијског бојења
1	Од 11 – 25 % позитивних туморских ћелија	1	Слаб интензитет имунохистохемијског бојења
2	Од 26-50 % позитивних туморских ћелија	2	Умерен интензитет имунохистохемијског бојења
3	Више од 51% позитивних туморских ћелија	3	Јак интензитет имунохистохемијског бојења

Табела 1. Одређивање експресије ИНС за интерлеукин 32 у ткиву хуманог карцинома желуца на основу процентуалне заступљености и интензитета ИНС бојења

Експресија VEGF-а је процењивана на основу модификованог критеријума за скоровање који су предложили Lastraioli и Raica (349,350) за интерпретацију овог белега у карциному желуца. Исти се заснива на присуству, проценту и интензитету позитивних ћелија. Очитавано је цитоплазматско и мембранско бојење туморских ћелија. Имунохистохемијски скор је одређиван на основу процента туморских ћелија које су биле позитивне на VEGF. Негативне контроле се нису бојиле. Скала за оцењивање експресије се кретала у интервалу од 0 до 3: 0= нема обојених ћелија; 1= мање од 25% обојених ћелија; 2= од 25-50% обојених ћелија; 3= више од 50% обојених ћелија. Према интензитету бојења одређена су четири степена: 0= нема имунохистохемијског бојења; 1=слаб интензитет бојења, бледо жута боја; 2=умерен интензитет бојења, браон боја; 3=јак

интензитет бојења, тамно браон боја. Укупан скор је рачунат као збир појединачних вредности и износио је од 0 – 6.

Експресија интерлеукина 8 је одређивана на основу семи-квантитативног скоринг система који су раније описали Sun Q и Li XJ (281,283), а заснива се на проценту обојених ћелија у односу на укупан број ћелија, као и на интензитету бојења. Цитоплазматско и мембранско бојење интерлеукина 8 је класификовано на следећи начин: одсуство бојења је скоровано са 0; слабо бојење = 1, умерено бојење = 2, и јак интензитет бојења је скорован са 3. Процент обојених ћелија је скорован на следећи начин: одсуство обојених ћелија = 0; 1-10% обојених ћелија = 1; 11-50 % обојених ћелија = 2; 51-80 обојених ћелија = 3; 81-100 % = 4. Укупан скор имунохистохемијског бојења добијен је множењем појединачних вредности, и износио је од 0 – 12. Као коначан скор је рачуната добијена средња вредност појединачних скорова оба истраживача (Табела 2).

Интерлеукин 8 – имунохистохемијска експресија			
Скор	Процент позитивних ћелија	Скор	Интензитет имунохистохемијског бојења
0	Нема имунохистохемијског бојења	0	Одсуство обојених ћелија
1	Слаб интензитет имунохистохемијског бојења	1	1-10 % обојених ћелија
2	Умерен интензитет имунохистохемијског бојења	2	11-50 % обојених ћелија
3	Јак интензитет имунохистохемијског бојења	3	51-80 % обојених ћелија
		4	81-100 % обојених ћелија

Табела 2. Имунохистохемијска експресија интерлеукина 8 – скоринг систем. Укупан скор је добијен као множење два скор- интензитета бојења и процента обојених ћелија.

Експресија интерлеукина 17 је утврђивана на основу локализације у цитоплазми мононуклеарних ћелија. Анализа је рађена употребом светлосног микроскопа, бројањем позитивних ћелија у три „жаришта“ у интратуморском ткиву, на x400 увеличању према Iida-и (370).

3.6. Евалуација микроваскуларне густине (MVD) у карциномима хуманог порекла

Процена микроваскуларне густине (енгл. *Microvessel density*, MVD) вршена је имунохистохемијском методом, применом анти-CD31 антитела и употребом светлосног микроскопа (Axioskop 40, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany). MVD (микроваскуларне структуре/HPF) је израчунавана према критеријумима које су поставили *Weidner* и сарадници, односно као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса (371).

3.7. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о експресији IL-32 у карциномом желуца и у здравој слузници, а ови подаци су добијени из студије Seo EH и сарадника (201). Према подацима из литературе IL-32 је детектован код 29% пацијената са карциномом желуца, док у здравој слузници није детектована експресија овог цитокина. Студијски узорак је израчунат узимајући да је $\alpha=0.05$, а снага студије $1-\beta=0.95$ (95%) за χ^2 тест, поредећи групе међу собом. Имајући у виду горе наведене параметре применом комерцијалног програма GPower софтверска верзија 3.0.10 утврдили смо да је за дате критеријуме неопходан узорак од најмање 48 пацијената.

3.8. Статистичка анализа

Статистичка обрада резултата извршена је помоћу комерцијалног програмског пакета SPSS (SPSS v.20.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Добијени резултати су груписани и приказани, табеларно и графички. За утврђивање мера централне тенденције и варијабилитета коришћене су методе дескриптивне статистике. Резултати су приказани као средње вредности (енгл. mean), стандардне грешке (енгл. standard error), медијане (енгл. med), перцентили (енгл. percentiles), минимум, максимум и проценти. Пре статистичке обраде података, испитана је нормалност расподеле добијених вредности. Нормалност расподеле унутар група анализирана је Kolmogorov- Smirnov-им и Shapiro-Wilk-овим тестовима. Уколико су вредности имале нормалну расподелу користили смо Student's-ов t тест, док у случају вредности које нису имале нормалну расподелу, користили смо непараметријски Mann-Whitney-ев тест. Spearman - овом корелацијом је процењивана могућа веза између експресије IL-32 и хистолошког облика и инвазије лимфних судова код карцинома желуца. Снага корелације дефинисана је као негативна или позитивно слаба (-0,3 до -0,1 или 0,1 до 0,3), умерена (-0,5 до -0,3 или 0,3 до 0,5) или јака (-1,0 до -0,5 или 1,0 до 0,5). Све статистичке анализе су урађене са интервалом поверења од 95%. Резултати статистичке анализе су прихваћени као статистички значајни, уколико је ниво вероватноће нулте хипотезе $<5\%$, односно уколико је значајност теста $p<0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Карактеристике испитаника

У овој студији анализирано је седамдесет испитаника са карциномом желуца. Демографске, клиничке и патолошке карактеристике ових болесника приказане су у Табели 3. Пацијенти са карциномом желуца разврстани су у два скупа узимајући у обзир тип тумора: дифузни (n=20) и интестинални тип карцинома желуца (n=50). Статистички значајна разлика је забележена у расподели према полу (p=0.025). Међу оболелим од дифузног типа карцинома желуца, 12 од 20 су припадници женског пола, док је међу оболелим од интестиналног типа 9 од 50 припадница женског пола. Значајна је и разлика у узрасту између оболелих од дифузног (средња старосна доб $65,2 \pm 2,72$) и интестиналног типа карцинома желуца (средња старосна доб $75,07 \pm 1,13$). Пацијенти са дијагностикованим интестиналним типом карцинома желуца су знатно старији (p=0.005) у односу на пацијенте код којих је дијагностикован дифузни тип тумора (Табела 3).

4.1.1. Тежа и агресивнија форма болести код болесника са дифузним типом тумора

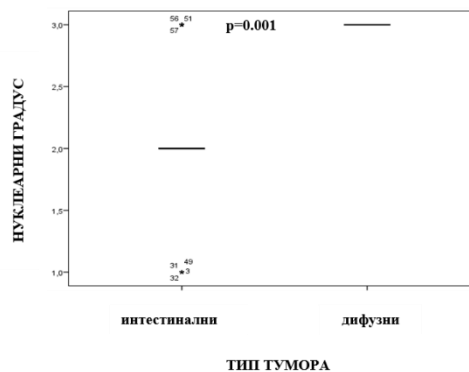
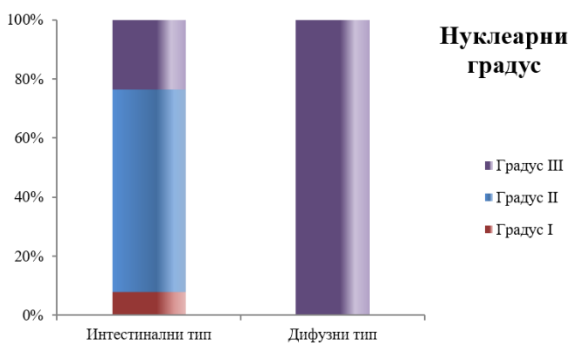
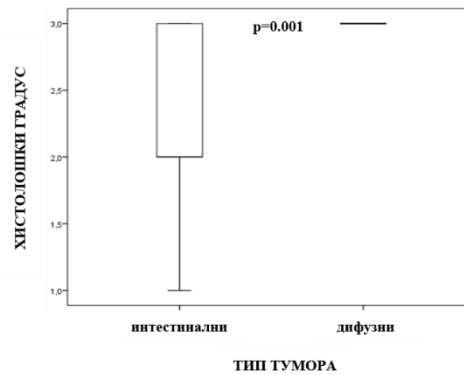
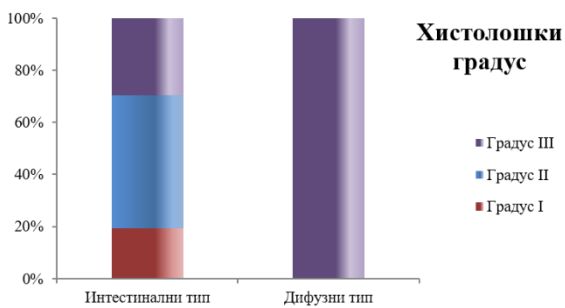
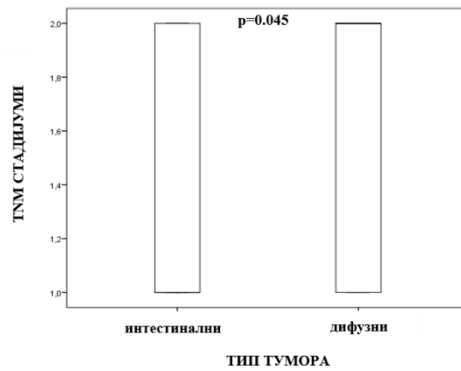
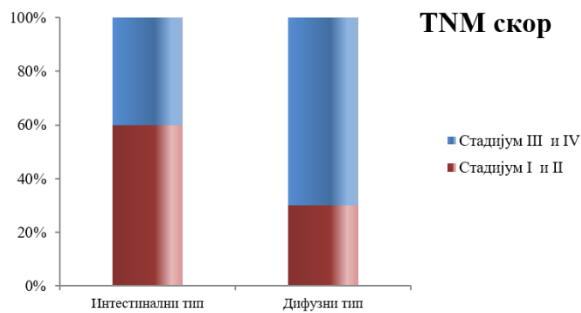
Болесници са интестиналним, односно дифузним типом карцинома желуца разврстани су у два скупа узимајући у обзир TNM стадијума болести: I+II и III+IV. Као што је приказано у Табели 1, показано је да оболели са дифузним типом тумора имају већи TNM стадијум болести (TNM стадијум III+IV) (p=0.045), док болесници са интестиналним типом карцинома желуца углавном имају локализован тумор (TNM стадијум I+II). Затим смо анализирали нуклеарни градус туморског ткива: I+II и III+IV. Ова класификација је заснована на процени величине и облика једра у туморским ћелијама и проценту туморских ћелија које су у фази деобе или раста. Болесници са дифузном формом карцинома желуца су имали већи нуклеарни градус (p = 0.001), док су пацијенти са интестиналним типом карцинома желуца углавном имали нижи нуклеарни градус (Табела 1). Потом, анализирали смо пацијенте са различитим облицима карцинома желуца, према хистолошком градусу: добро/умерено и слабо диферентовани. Добро диферентовани и умерено диферентовани тумори (добро/умерено) су дефинисани као лезије ниског степена диференцијације док су лоше (слабо) диферентовани тумори дефинисани као лезије високог степена диференцијације, према водичима СЗО. Оцењивање је засновано на процени најлошије области, изузев подручја фокалне дедиференцијације присутне на инвазивној маргини тумора. Претходна истраживања су показала да су слабо диферентовани тумори агресивнији него добро/умерено диферентовани, у мултиваријантној анализи. Већина пацијената са дифузним типом карцинома имала је слабо диферентовано туморско ткиво (p = 0,001), док су пацијенти са интестиналним типом карцинома желуца имали углавном боље диферентовано туморско ткиво (Табела 3).

Табела 3. Основне карактеристике пацијената са интестиналним и дифузним типом карцинома желуца

	Карцином желуца		<i>p</i>
	Интестинални тип (n=50)	Дифузни тип (n=20)	
Пол (мушки/женски)	41/9	8/12	<i>0.025</i>
Старост (средња вредност [ранг])	75.07 (54-92)	65.20 (55-79)	<i>0.005</i>
TNM класификација (I и II/III и IV)	30/20	6/14	<i>0.045</i>
Нуклеарни градус (I/II/III)	4/35/11	0/0/20	<i>0.001</i>
Хистолошки градус – диференцијација (добро/умерено/слабо)	11/26/13	0/0/20	<i>0.001</i>
Васкуларна инвазија (присутна/одсутна)	37/13	8/12	<i>0.011</i>

Табела 3. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Постоји статистички значајна разлика у полу, старости болесника, стадијуму и градусу у односу на локализацију болести. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

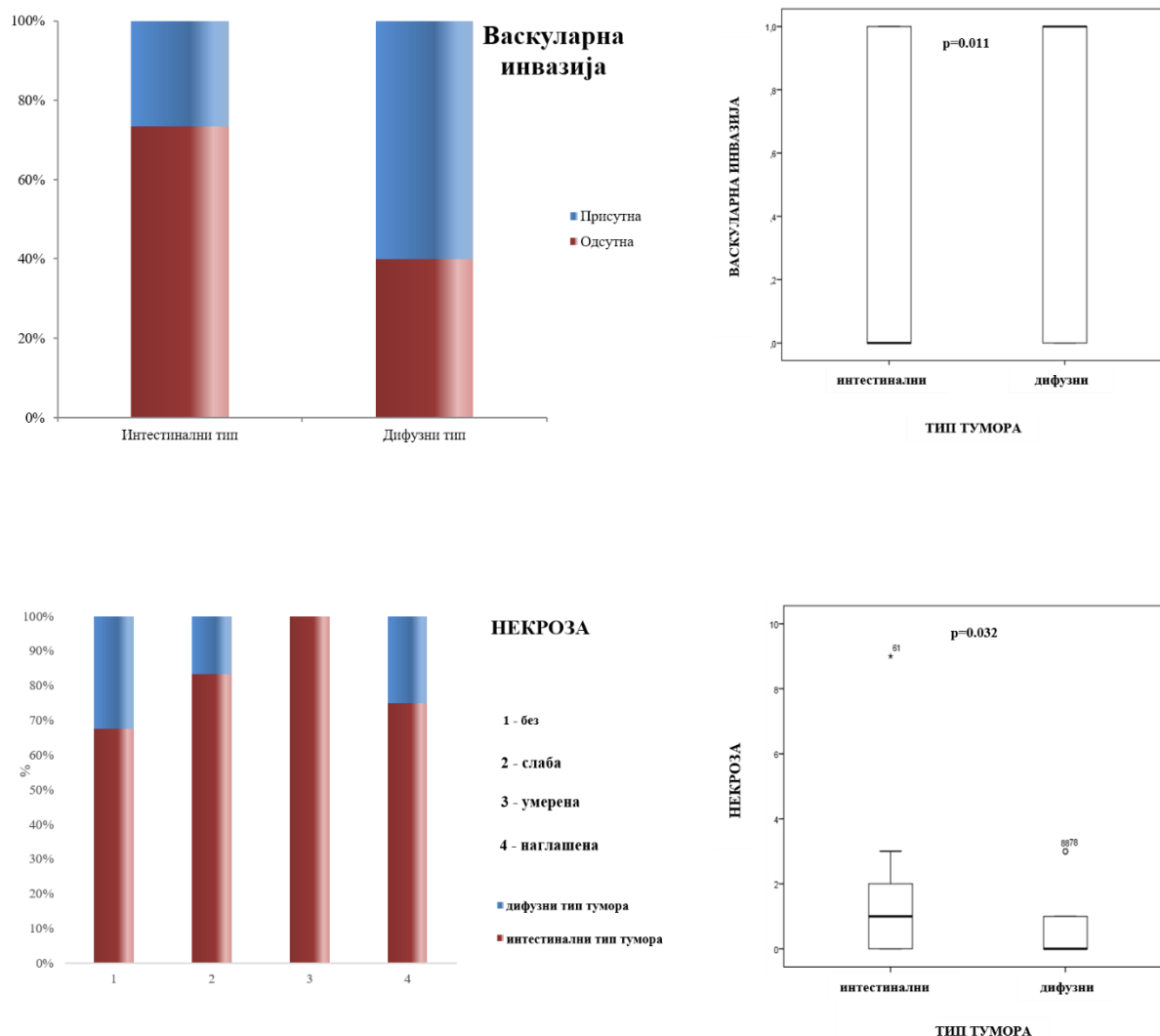
Значајно већи проценат оболелих са дифузним типом тумора има већи TNM скор као и хистолошки и нуклеарни градус, у односу на оболеле од интестиналног типа тумора (Фигура 1).



Фигура 1. Испитаници са дифузним типом тумора имају тежу и агресивнију форму болести. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Пацијенти са карциномом желуца су подељени у две групе, на основу типа тумора (интестинални и дифузни). Поређење типова карцинома желуца, интестинални и дифузни тип, у односу на TNM стадијум болести, хистолошки и нуклеарни градус. У свим наведеним случајевима постоји статистички значајна разлика ($p < 0.05$) између испитиваних категорија. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

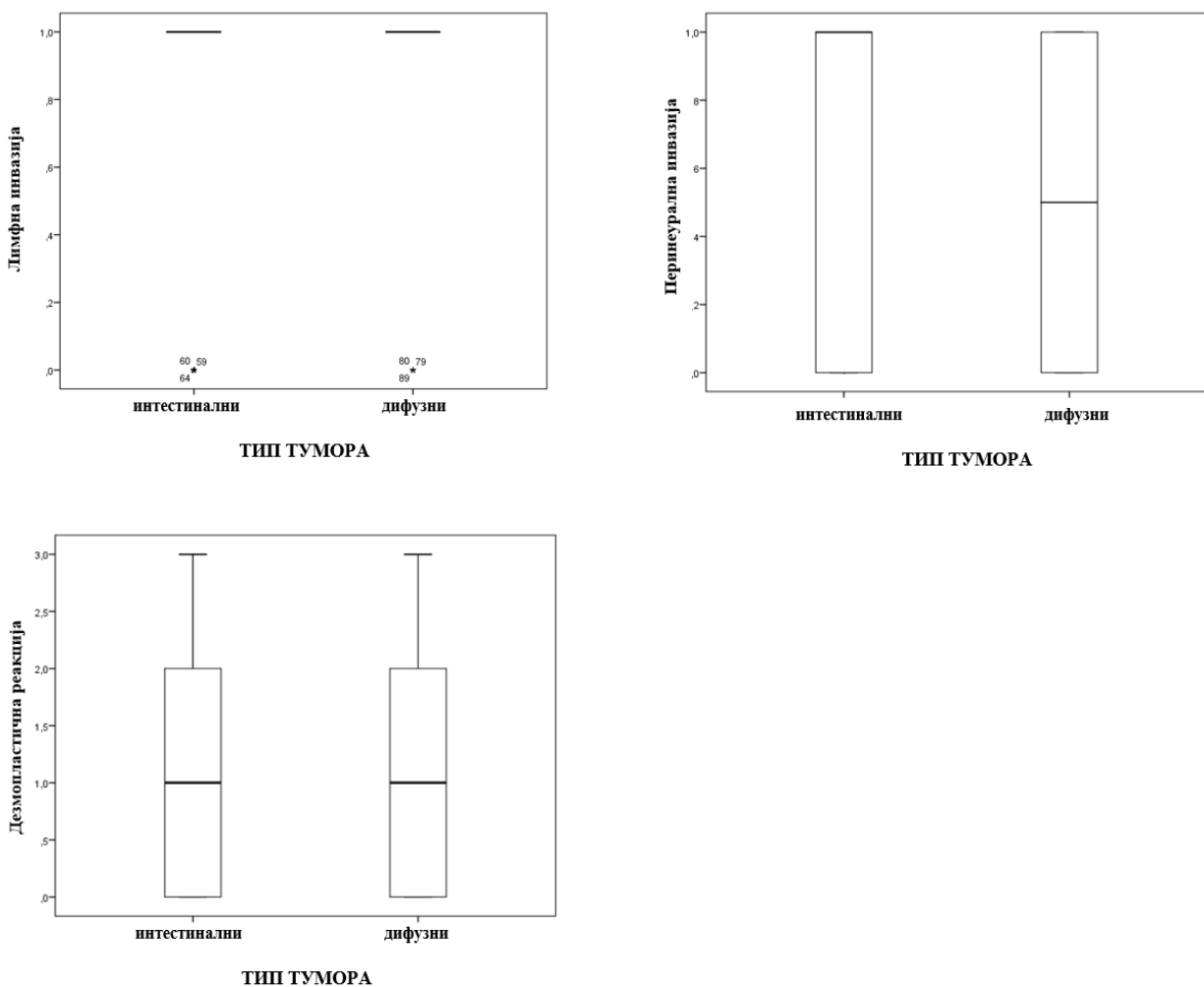
Показали смо да је инвазија крвних судова значајно израженија у ткиву дифузног типа карцинома, у поређењу са интестиналним ($p=0.011$; Фигура 2, горњи панел). Значајно већи

процент оболелих од дифузног типа тумора има детектабилну васкуларну инвазију, у односу на оболеле од интестиналног типа карцинома желуца (Фигура 2, горњи панел). Анализирано је и присуство некротичних поља у туморском ткиву, тако да су испитаници у односу на степен некрозе подељени у четири категорије: без некрозе, са слабо израженом некрозом, умереном и наглашеном некрозом. Утврђено је да испитаници са интестиналним типом тумора имају више некротичних поља у туморском ткиву у односу на оне са дифузним обликом болести ($p=0.032$; Фигура 2, доњи панел).



Фигура 2. Наглашена васкуларна инвазија и смањена некроза у туморском ткиву оболелих од дифузног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Пацијенти са карциномом желуца су разврстани у два скупа узимајући у обзир тип тумора (интестинални и дифузни). Поређење типова карцинома желуца, интестинални и дифузни тип, у односу на васкуларну инвазију и некрозу. У свим наведеним случајевима постоји статистички значајна разлика ($p<0.05$) између испитиваних категорија. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

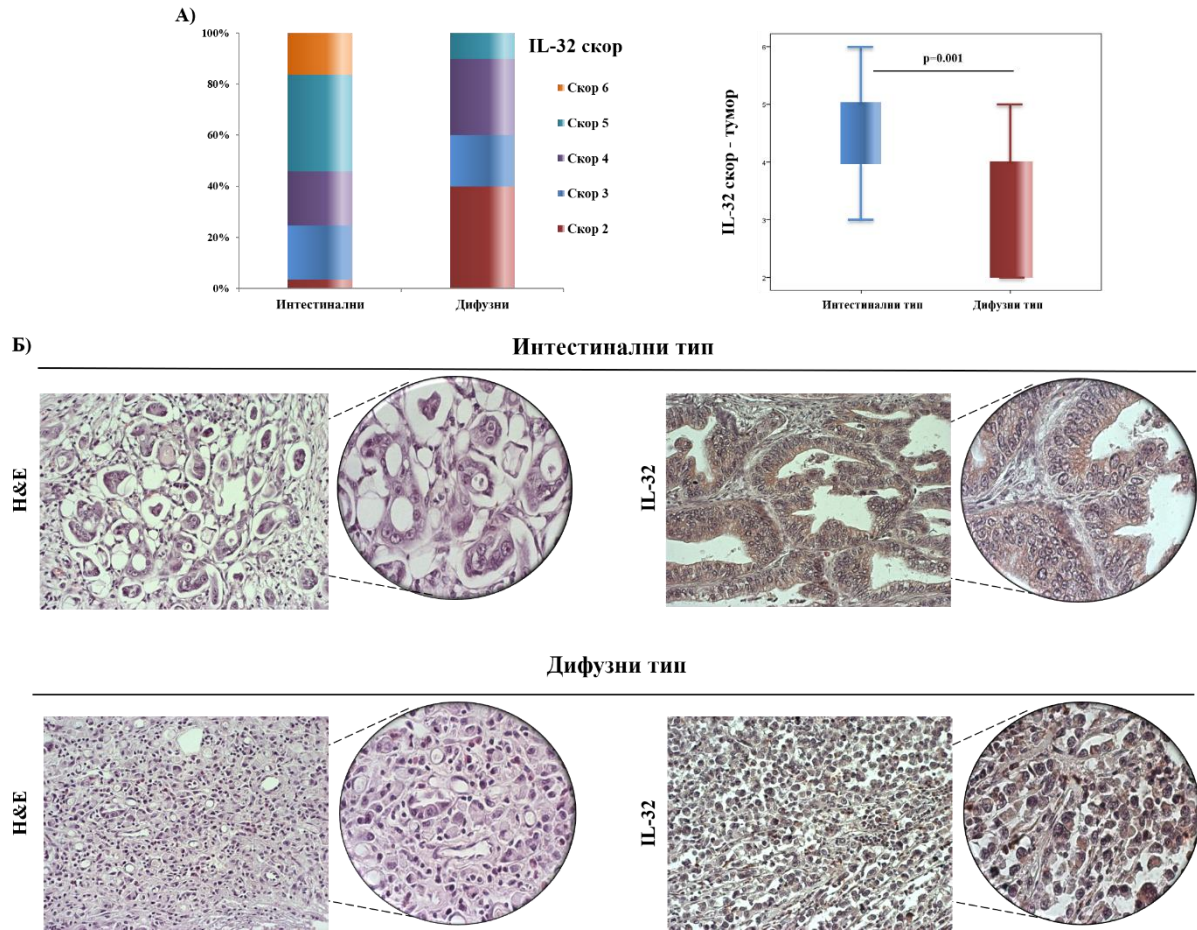
Анализиране су и лимфна и перинеурална инвазија као и присуство дезмопластичне реакције између ова два типа тумора (интестинални VS. дифузни). Није добијена статистички значајна разлика у присуству лимфне, перинеуралне инвазије и дезмопластичне реакције у туморском ткиву између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца ($p > 0.05$; Фигура 3).



Фигура 3. Нема значајне разлике у лимфној, перинеуралној инвазији и дезмопластичној реакцији у туморском ткиву између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Пацијенти са карциномом желуца су разврстани у два скупа узимајући у обзир тип тумора (интестинални и дифузни). Поређење типова карцинома желуца: интестинални и дифузни тип, у односу на присуство и/или одсуство лимфне и перинеуралне инвазије и дезмопластичну реакцију. У свим наведеним случајевима нема статистички значајне разлике ($p > 0.05$) између испитиваних категорија. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

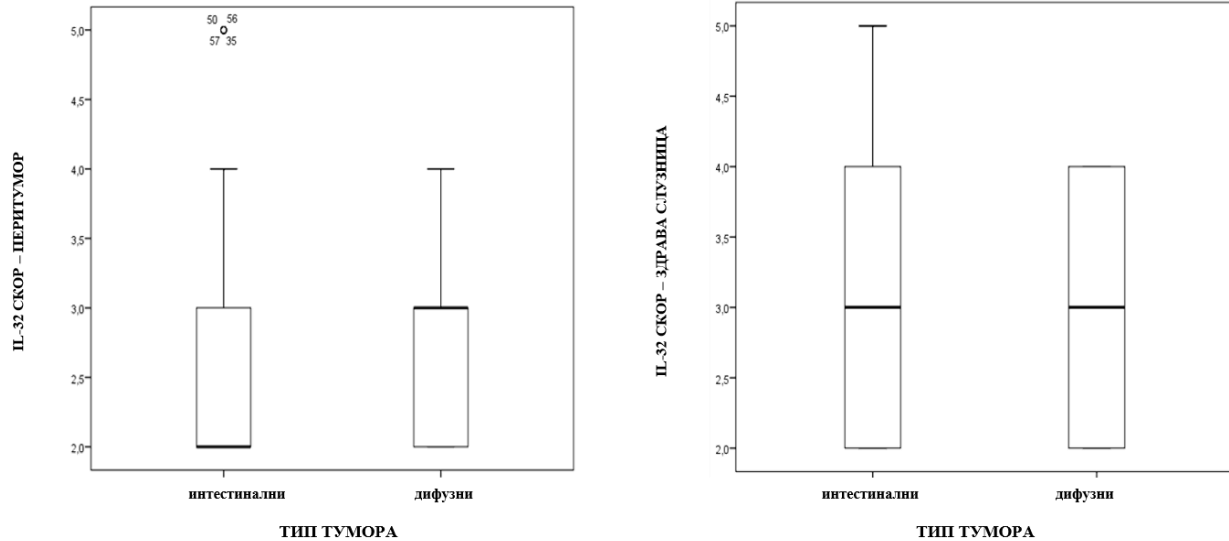
4.1.2. Мања експресија интерлеукина 32 повезана је са дифузним типом карцинома желуца

Следећи задатак је био да се анализира експресија и дистрибуција IL-32 у различитим хистолошким типовима карцинома желуца. Анализирали смо експресију IL-32 у дифузном и интестиналном облику карцинома желуца. Резултати добијени овим експериментом показали су да је већина пацијената са дифузним типом карцинома желуца имала скор експресије 4 или мање, док је већина пацијената са интестиналним облицима тумора имала скор 4 или више ($p=0.001$, Фигура 4а, десни графикон). Код пацијената са дифузним типом, за њих 40% је забележен IL-32 скор 2, док је IL-32 скор 2 забележен код 3% пацијената са интестиналним типом (Фигура 4а, графикон лево). Штавише, Spearman-ов тест корелације показао је да је већа експресија IL-32 у негативној корелацији са тежим формама дифузног типа карцинома желуца ($r=-0,367$; $p=0.002$). Како је IL-32 познат као модулатор ангиогенезе и инфламације, на даље смо се усредсредили на анализу микроваскуларне густине и проинфламацијских медијатора, у туморском ткиву.



Фигура 4. Експресија IL-32 код пацијената са интестиналним и дифузним типом карцинома желуца. А: Пацијенти са дифузним типом карцинома имају IL-32 скор експресије 4 или мање, док пацијенти са интестиналним типом имају IL-32 скор експресије 4 више. Значајно нижи скор IL-32 код пацијената са дифузним типом у поређењу са пацијентима са интестиналним типом карцинома желуца ($p = 0,001$). Вредности p су одређене Студентовим Т-тестом. **Б:** Н & Е бојење репрезентативног туморског ткива интестиналног и дифузног типа карцинома желуца. Експресија IL-32 пацијената са интестиналним и дифузним типом карцинома желуца (увећање 200 x и 400 x).

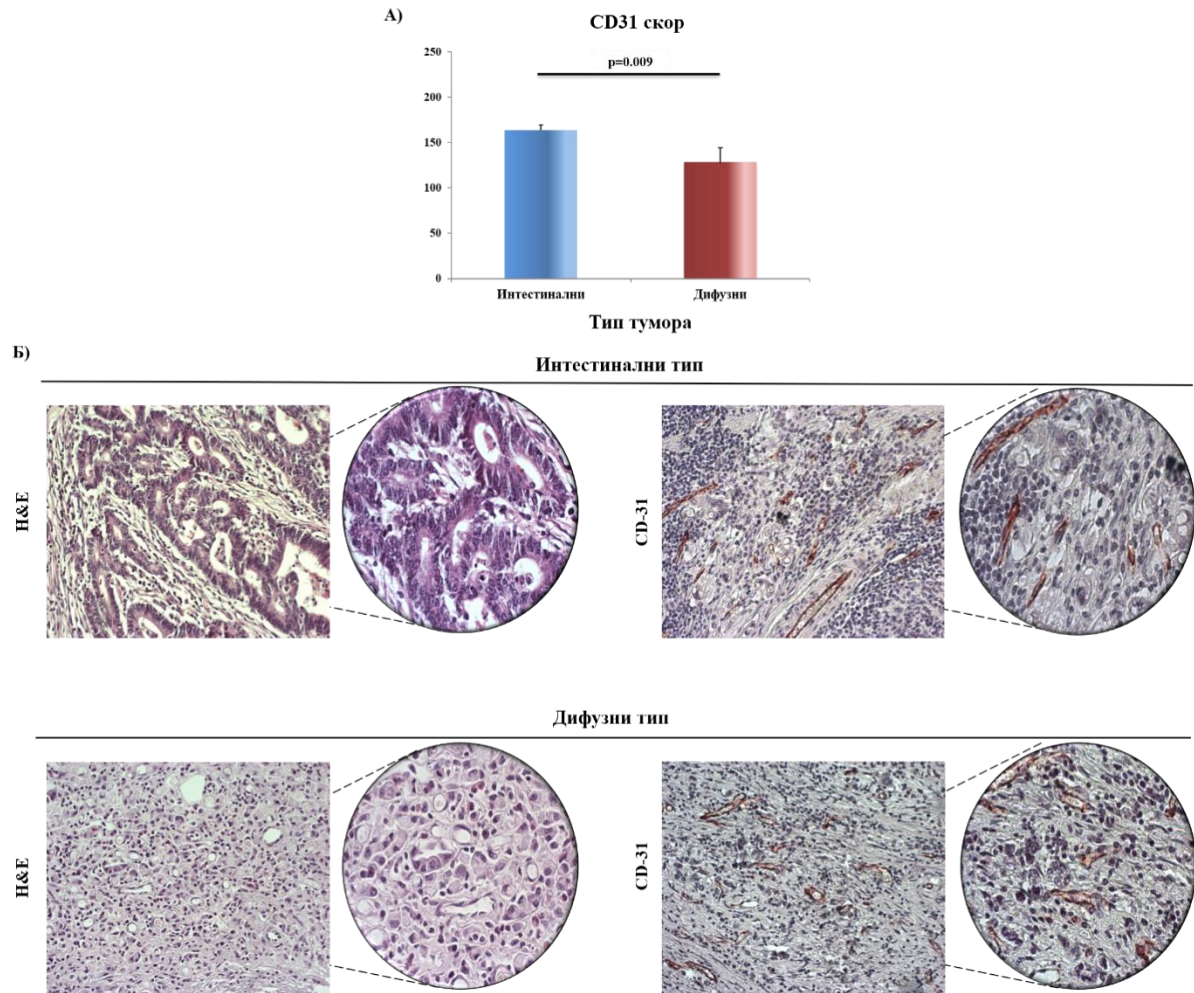
Анализирана је експресија IL-32 у перитумору и здравој слузници ова два типа тумора (интестинални VS. дифузни). Није нађена статистички значајна разлика у експресији IL-32 у перитумору и здравој слузници између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца (Фигура 5).



Фигура 5. Нема значајне разлике у експресији IL-32 између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Пацијенти са карциномом желуца су разврстани у два скупа узимајући у обзир тип тумора (интестинални и дифузни). Поређење типова карцинома желуца: интестинални и дифузни тип, у односу на експресију IL-32. У свим наведеним случајевима нема статистички значајне разлике ($p > 0.05$) између испитиваних категорија. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

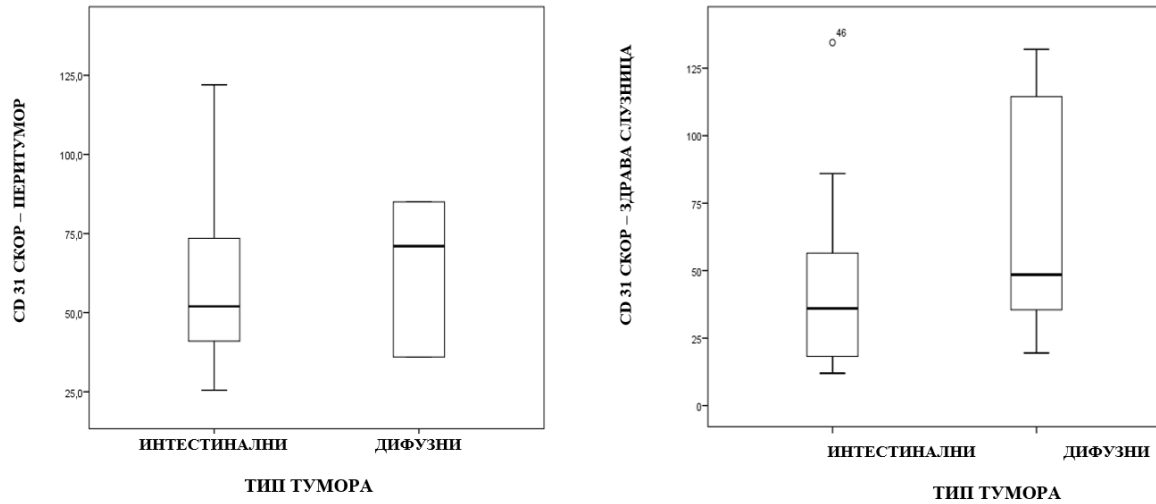
4.1.3. Мања микро-васкуларна густина у дифузном типу карцинома желуца

Да би се разјаснио узрок разлике у тежини болести између дифузног и интестиналног типа карцинома желуца, додатно смо анализирали микроваскуларну густину ових тумора. Како је CD31 један од маркера васкуларизације тумора, имунохистохемијском методом анализирана је експресија CD31 у туморском ткиву свих 70 пацијената са карциномом желуца. Наши резултати су показали да пацијенти са дифузним типом тумора имају значајно ниже вредности микроваскуларне густине (енг. MVD, *microvascular density*) у поређењу са пацијентима са интестиналним типом карцинома желуца ($p=0.009$; Фигура 6а).



Фигура 6. Микроваскуларна густина интестиналног и дифузног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Пацијенти са карциномом желуца су разврстани у два скупа узимајући у обзир тип тумора (интестинални и дифузни). **А:** MVD је знатно мања код пацијената са дифузним типом у односу на пацијенте са интестиналним типом карцинома желуца ($p = 0,009$). Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. **Б:** H & E бојење туморског ткива интестиналног и дифузног типа карцинома желуца. Репрезентативни сектори показују MVD у туморском ткиву пацијената са интестиналним и дифузним типом карцинома желуца (увећање 200 x и 400 x). Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

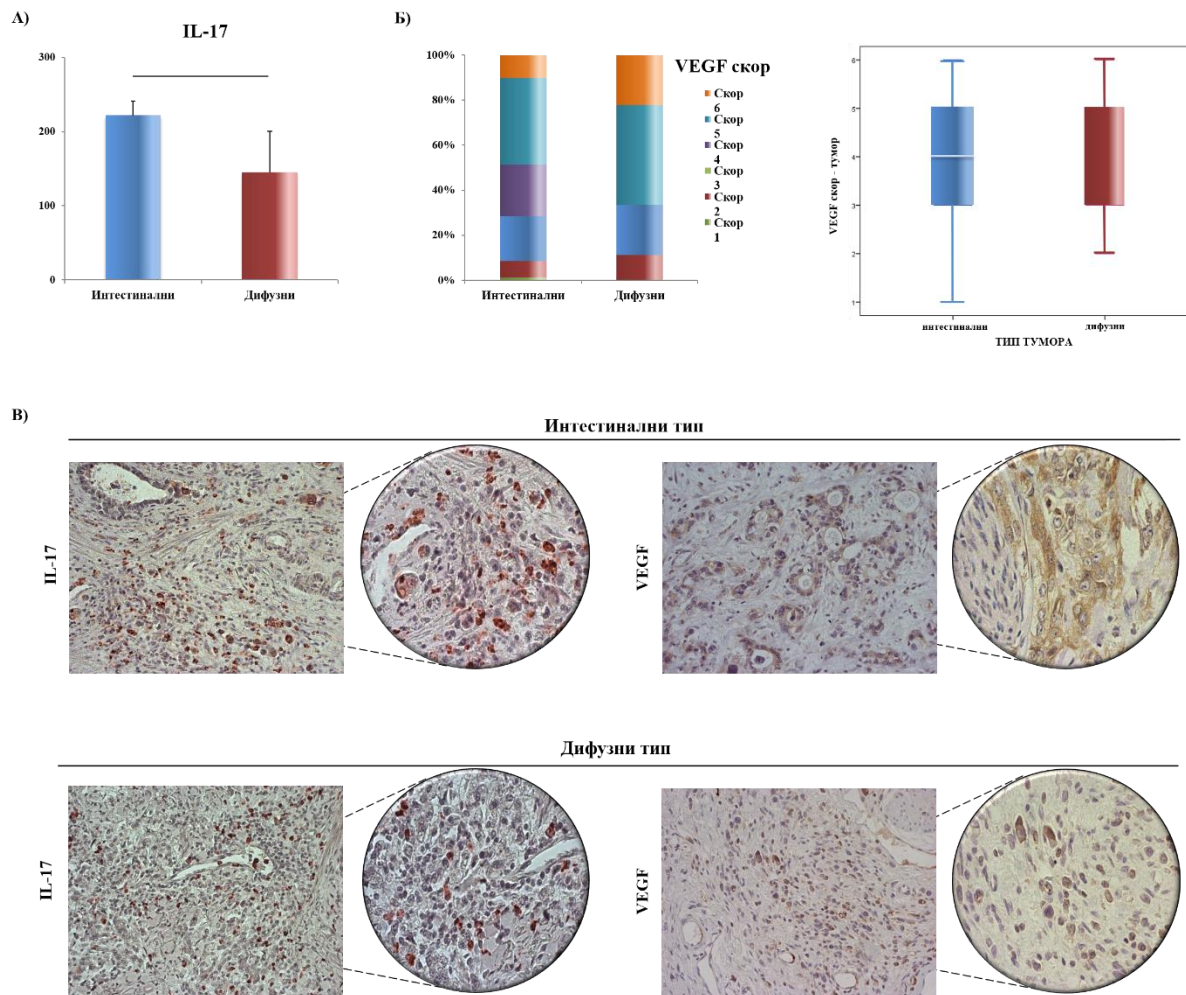
Анализирана је експресија CD31 и у перитуморском и здравом ткиву ова два типа тумора (интестинални VS. дифузни). Није нађена статистички значајна разлика у експресији CD31 у перитумору и здравој слузници између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца (Фигура 7).



Фигура 7. Нема значајне разлике у експресији CD31 у перитуморском и околном здравом ткиву између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Пацијенти са карциномом желуца су разврстани у два скупа узимајући у обзир тип тумора (интестинални и дифузни). Поређење типова карцинома желуца: интестинални и дифузни тип, у односу на експресију CD31. У свим наведеним случајевима нема статистички значајне разлике ($p > 0.05$) између испитиваних категорија. Статистичка значајност је

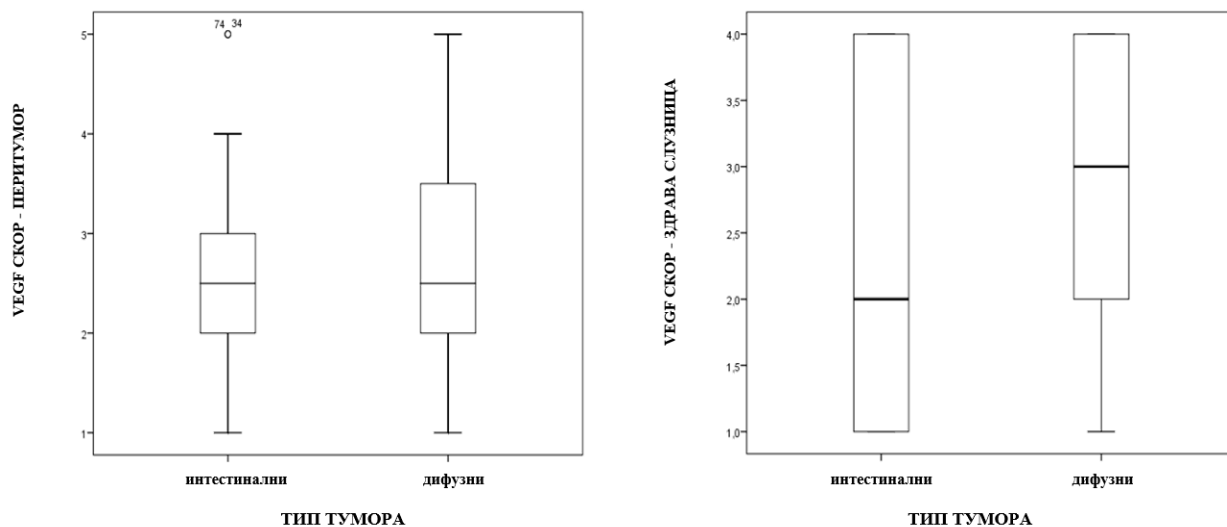
4.1.4. Мања експресија интерлеукина-17 у дифузном типу карцинома желуца

Након што смо имунохистохемијском методама показали да дифузни тип карцинома желуца има микроваскулатуру мањег интензитета у поређењу са интестиналним типом, надаље смо се фокусирали на анализу различитих проангиогених фактора. Прво, анализирали смо васкуларни ендотелијални фактор раста (VEGF), један од кључних фактора раста ендотелних ћелија. Међутим, нисмо нашли статистички значајну разлику у експресији VEGF-а између пацијената са дифузним и интестиналним типом карцинома желуца (Фигура 8б). Анализа експресије IL-17 показала је да пацијенти са дифузним типом карцинома желуца имају значајно мању експресију овог цитокина у поређењу са пацијентима са интестиналним типом тумора ($p=0.029$; Фигура 8а).



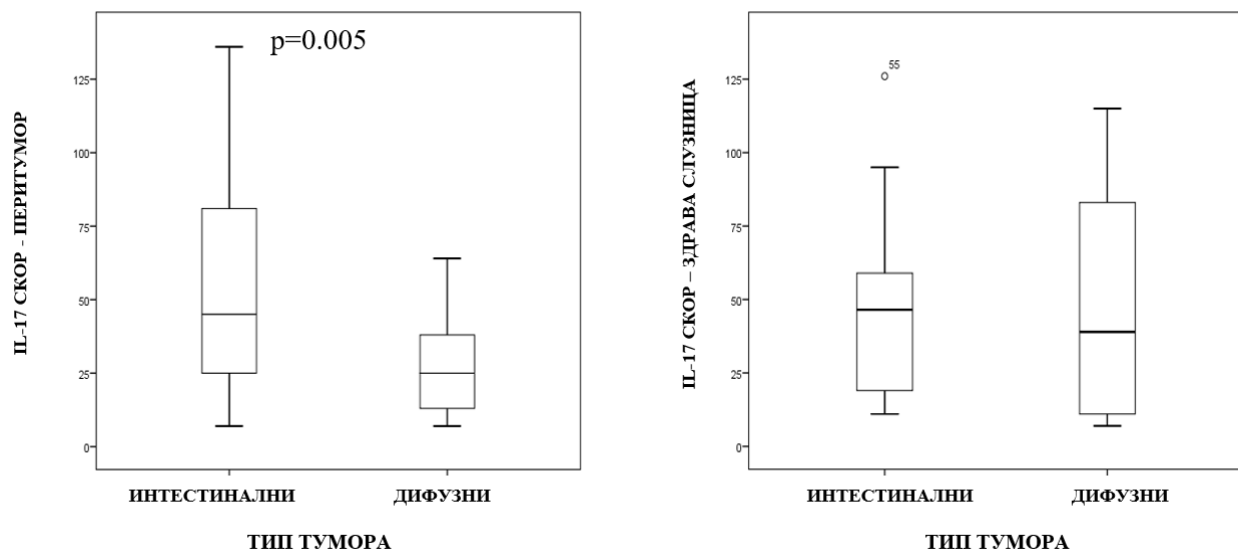
Фигура 8. Имунохистохемијска анализа експресије IL-17 и VEGF-а код пацијената са интестиналним и дифузним типом карцинома желуца. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Пацијенти са карциномом желуца су разврстани у два скупа узимајући у обзир тип тумора (интестинални и дифузни). **А:** Значајно мања експресија IL-17 у туморском ткиву пацијената са дифузним типом у поређењу са пацијентима са интестиналним типом карцинома желуца ($p=0.029$). **Б:** Нема значајне разлике у експресији VEGF-а у туморском ткиву између пацијената са дифузном формом и интестиналном формом карцинома желуца ($p > 0,05$). Вредности p су процењене Mann-Whitney-евим тестом. **В:** IL-17 и VEGF имунохистохемијско бојење у туморском ткиву пацијената са интестиналним и дифузним типом карцинома желуца (увећање 200 x и 400 x).

Испитивана је експресија проангиогеног маркера VEGF у перитуморском и здравом ткиву испитаника са интестиналним и дифузним типом карцинома желуца. Није нађена статистички значајна разлика у експресији VEGF-а у перитумору и здравој слузници између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца (Фигура 9).



Фигура 9. Нема значајне разлике у експресији VEGF-а између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Пацијенти са карциномом желуца су разврстани у два скупа узимајући у обзир тип тумора (интестинални и дифузни). Поређење типова карцинома желуца: интестинални и дифузни тип, у односу на експресију VEGF. У свим наведеним случајевима нема статистички значајне разлике ($p > 0.05$) између испитиваних категорија. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

Анализирана је експресија IL-17 у перитуморском и здравом ткиву испитаника са интестиналним и дифузним типом карцинома желуца. Овај цитокин је значајно више експримиран у перитуморском ткиву интестиналног типа у односу на исто ткиво дифузног типа карцинома ($p=0.005$; Фигура 10, леви панел). Није нађена статистички значајна разлика у експресији IL-17 у здравој слузници између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца (Фигура 10, десни панел).



Фигура 10. Експресија IL-17 у перитумору и здравом ткиву оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 70 испитаника са карциномом желуца. Пацијенти са карциномом желуца су разврстани у два скупа узимајући у обзир тип тумора (интестинални и дифузни). Поређење типова карцинома желуца: интестинални и дифузни тип, у односу на експресију IL-17 у перитумору и здравом ткиву. Експресија IL-17 је већа у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома, у односу на дифузни тип ($p=0.005$). У здравом ткиву нема статистички значајне разлике ($p>0.05$) између испитиваних категорија. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

4.2. Анализа експресије IL-32, CD31, VEGF, IL-17 и IL-8 у ткиву интестиналног типа карцинома желуца

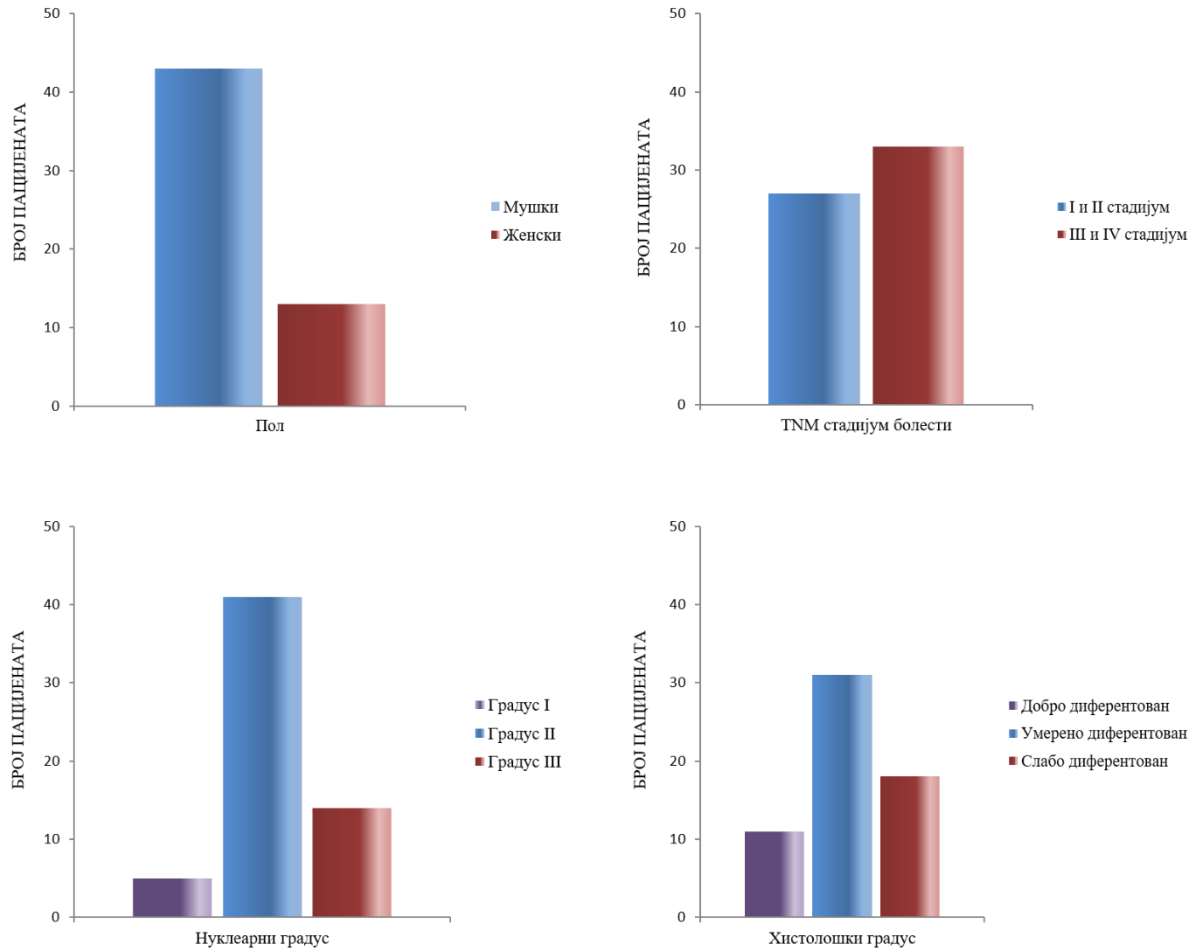
У наставку истраживања анализирали смо 60 испитаника, старости између 54 и 92 године којима је дијагностикован и патохистолошки потврђен интестинални облик карцинома желуца. Нађена је статистички значајна разлика према полу: 47 мушкараца (78,33%) и 13 жена (21,67%). Постоји и значајна разлика у дистрибуцији стадијума нуклеарног и хистолошког градуса и TNM стадијума болести унутар групе оболелих од интестиналног типа карцинома желуца. Клиничке и патолошке карактеристике ових пацијената су приказане у Табели 4. Анализирана је експресија IL-32, CD31, VEGF, IL-8 и IL-17 у тумору, перитумору и здравом ткиву карцинома желуца. Болесници са карциномом желуца су класификовани у два скупа узимајући у обзир TNM стадијум болести: I+II и III+IV. Потом су подељени према инвазији лимфних судова (+ и -). Такође, испитаници су подељени према хистолошком градусу, односно степену диферентованости тумора (добро, средње и слабо диферентовани тип), и нуклеарном градусу (градус I, II и III). Затим смо све испитанике разврстали у два скупа узимајући у обзир присуство или одсуство некрозе у туморском ткиву. Анализирали смо вредности претходно дефинисаних маркера од интереса у тумору, перитумору и здравом ткиву карцинома желуца између дефинисаних група.

Табела 4. Основне карактеристике испитаника са интестиналним типом карцинома желуца

Интестинални тип карцинома желуца	Број
Пол (мушки/женски)	47/13
Старост (средња вредност[ранг])	75 (54-92) година
TNM класификација (I и II/III и IV)	27/33
Нуклеарни градус (I/II/III)	5/41/14
Хистолошки градус диференцијација (добро/умерено/слабо)	11/31/18
Лимфна инвазија (присутна/одсутна)	10/50
Некроза (присутна/одсутна)	21/39

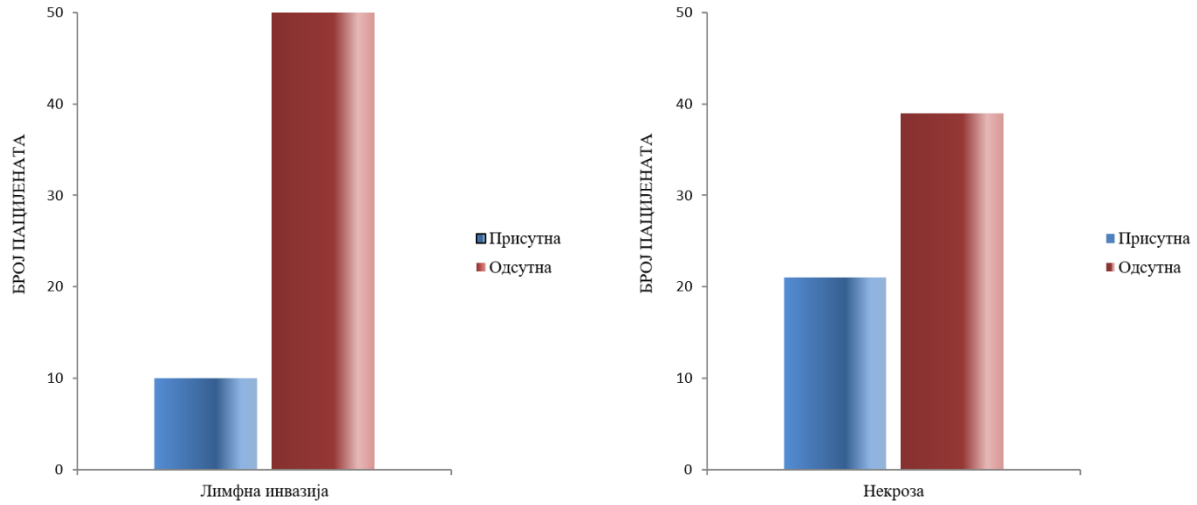
Табела 4. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Испитивана је дистрибуција пола, градуса, лимфне инвазије и некрозе. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

Анализа дистрибуције пола, TNM стадијума болести, вредности нуклеарног и хистолошког градуса показује да међу оболелима од интестиналног типа карцинома желуца доминирају мушкарци са већим TNM стадијумом као и нуклеарним и хистолошким градусом (Фигура 11).



Фигура 11. Интестинални тип карцинома желуца чешћи је код мушкараца, као и тежи облик болести. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Постоји статистички значајна разлика у полу, хистолошком и нуклеарном градусу. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

Анализа дистрибуције присуства лимфне инвазије и некрозе показује да је код већине оболелих од интестиналног типа карцинома желуца веома изражена лимфна инвазија и некроза (Фигура 12).



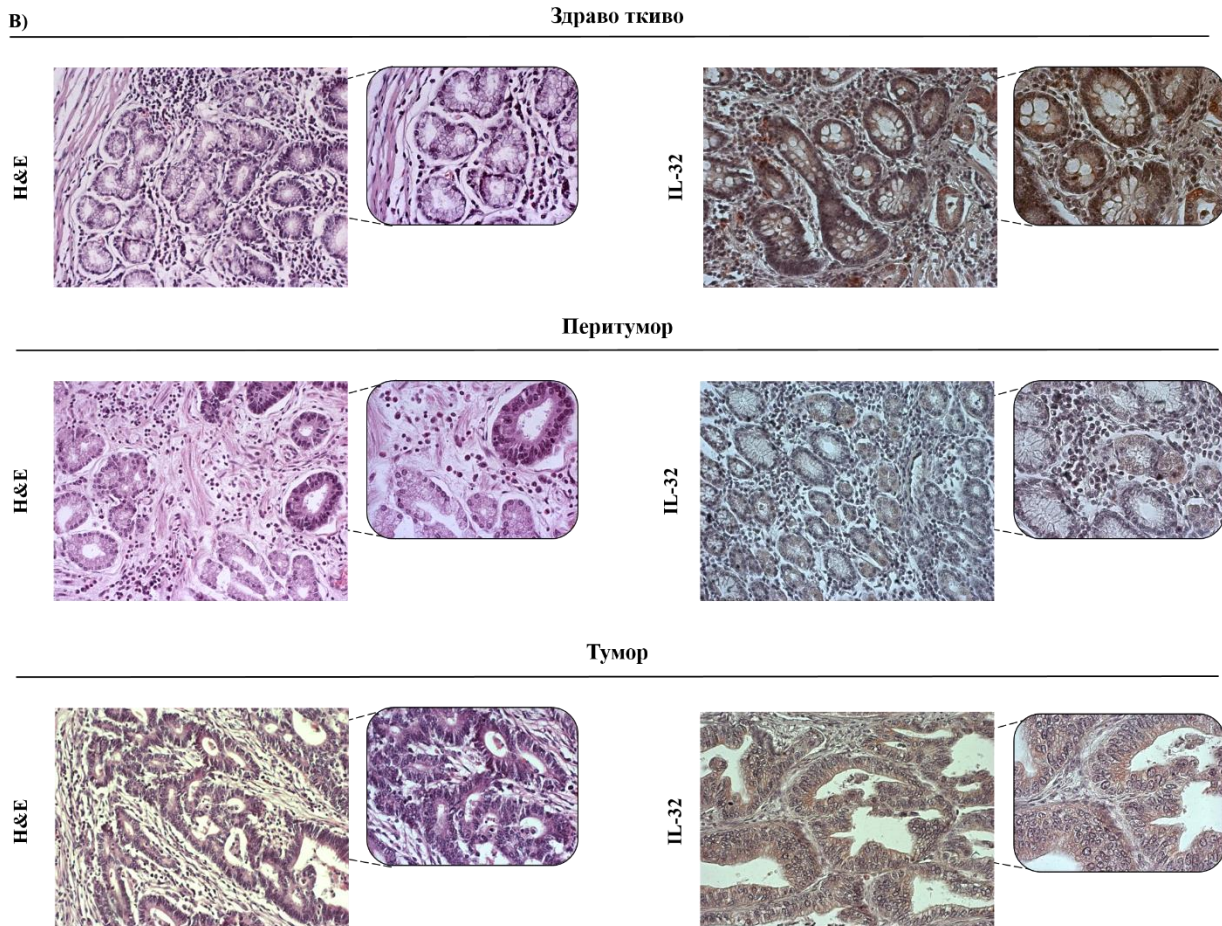
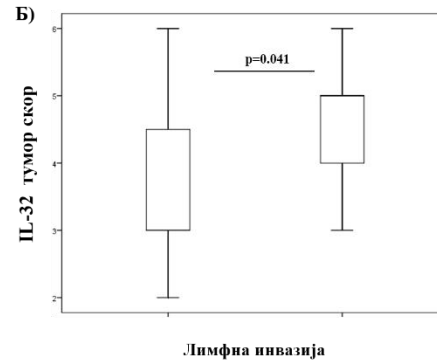
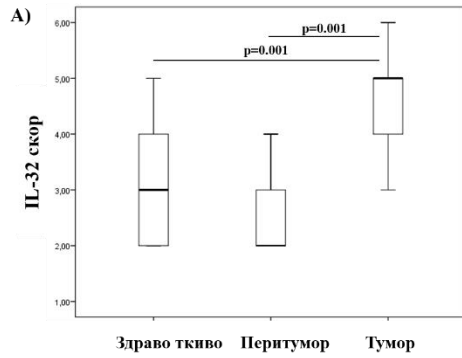
Фигура 12. Лимфна инвазија и некроза код болесника са интестиналним типом карцинома желуца. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

4.2.1. Експресија IL-32 у туморском ткиву повезана је са инвазијом лимфних судова

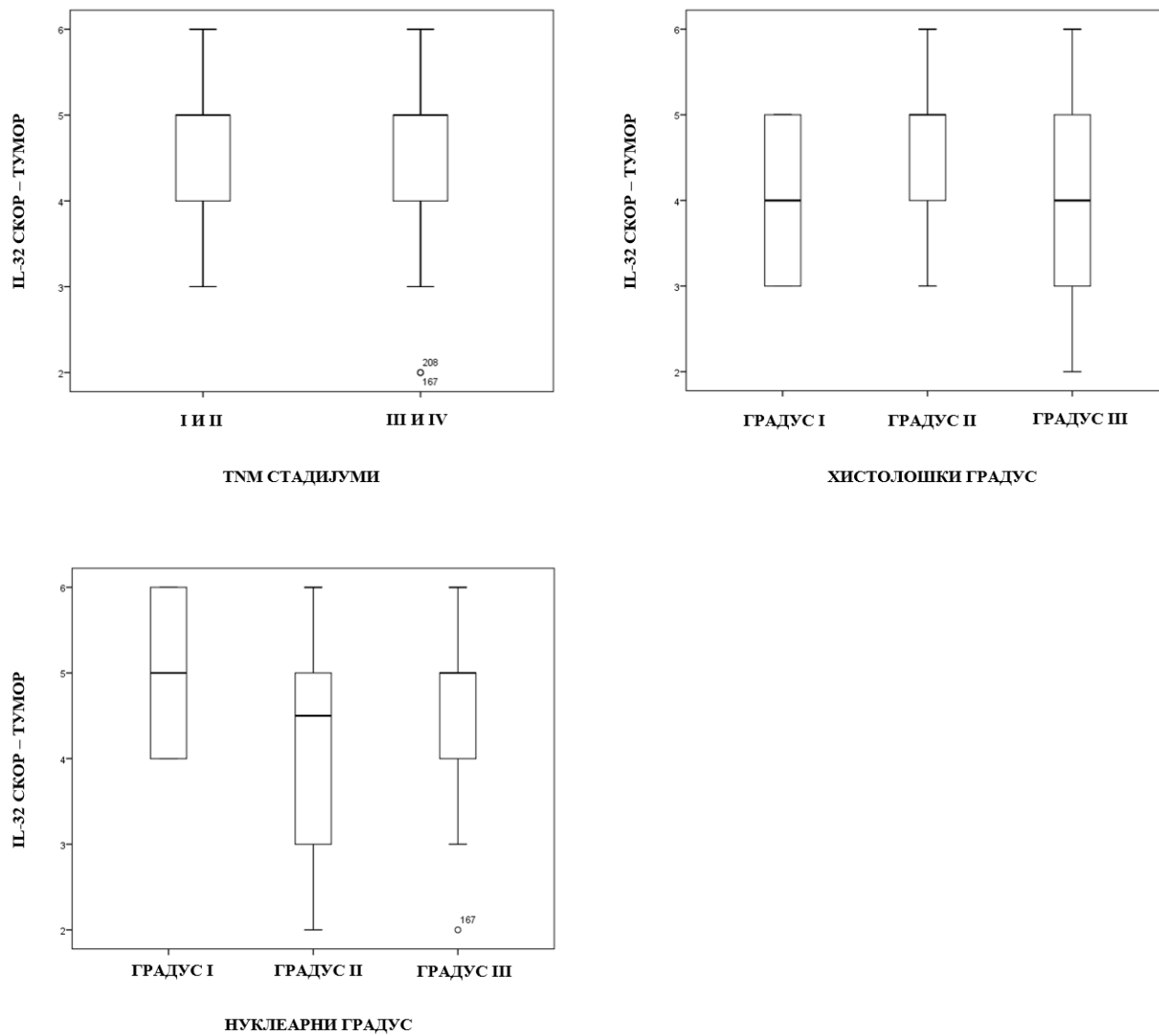
У наставку истраживања анализирана је експресија IL-32, CD31, VEGF, IL-8 и IL-17 у тумору, перитумору и здравом ткиву карцинома желуца. Испитивали смо експресију цитокина IL-32 у тумору, перитуморском и здравом ткиву карцинома желуца. Подаци о имунохистохемијској анализи су илустровани на фигури 13В. Резултати добијени овим експериментом показали су да је експресија IL-32 значајно већа у туморском ткиву у односу на перитуморско ткиво ($p=0.001$; Фигура 13А).

Затим смо пацијенте разврстали у два скупа узимајући у обзир инвазију лимфних судова (+ и -) и анализирали експресију IL-32. Експресија IL-32 је значајно већа у туморском ткиву болесника са детектованом инвазијом лимфних судова ($p=0.041$; Фигура 13Б). Постоји умерено позитивна корелација између експресије IL-32 у туморском ткиву и присуства инвазије лимфних судова ($R=0,364$; $p=0.040$).

Пацијенти са карциномом желуца су разврстани у два скупа узимајући у обзир TNM стадијум болести: I+II и III+IV. Потом су сви пацијенти са интестиналним типом тумора подељени према хистолошком и нуклеарном градусу (градуси I, II и III). Анализа експресије IL-32 показала је да нема статистички значајне разлике у експресији IL-32 у туморском ткиву, између дефинисаних група (Фигура 14).

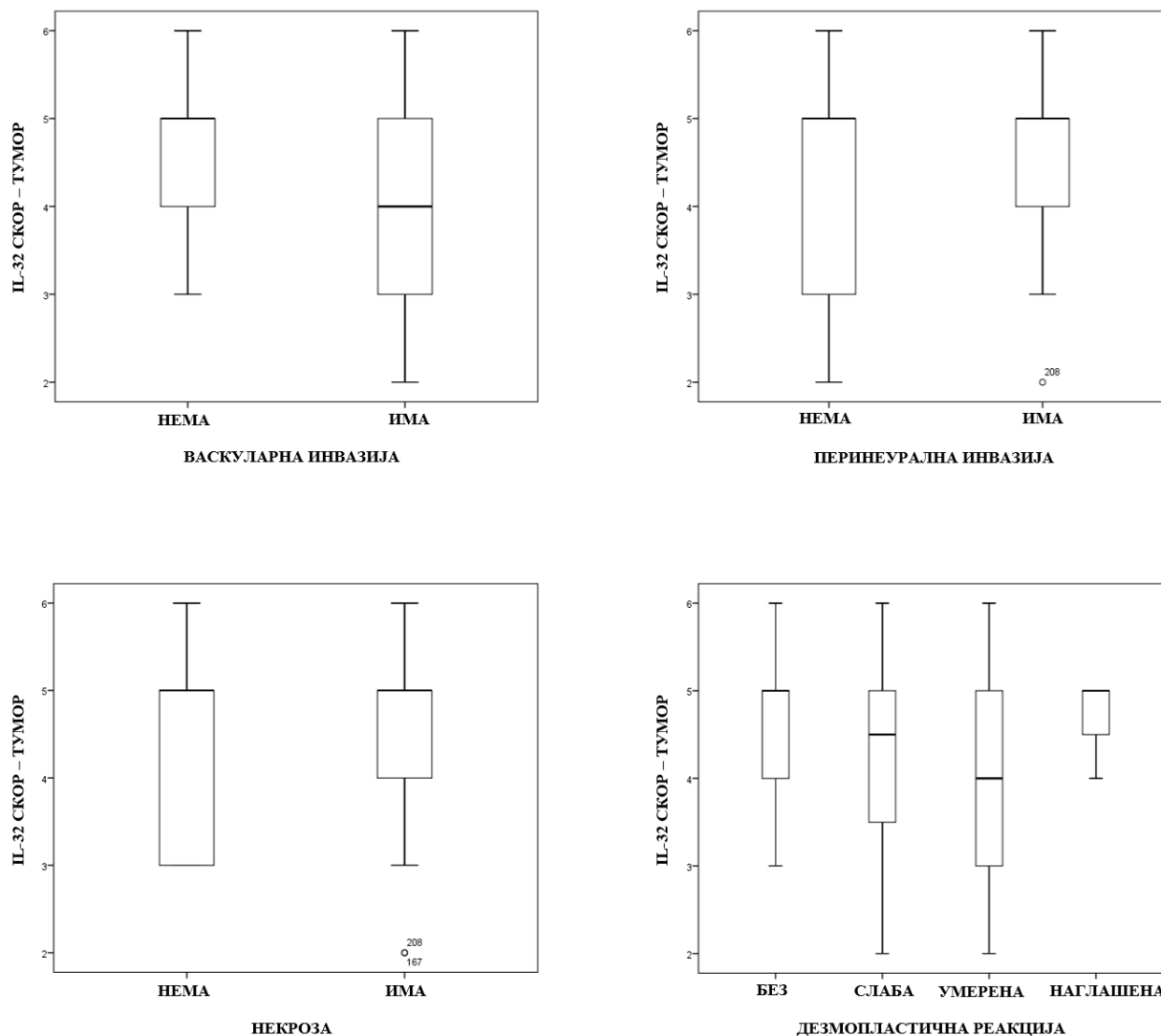


Фигура 13. Експресија IL-32 у тумору, перитумору и здравом ткиву интестиналног типа карцинома желуца. А: значајно већа експресија IL-32 у туморском ткиву у поређењу са експресијом у перитуморском ткиву код карцинома желуца ($p=0.001$). **Б:** Пацијенти са детектованом инвазијом лимфних судова имали су значајно већу експресију IL-32 у туморском ткиву у поређењу са пацијентима без инвазије лимфних судова ($p=0.041$). Статистичка значајност је тестирана Манн-Витнеу-евим тестом. **В:** H&E бојење тумора и перитумора интестиналног карцинома желуца као и околног здравог ткива. Имунохистохемијски обојен IL-32 у тумору, перитумору и здравом ткиву интестиналног карцинома желуца (увећање 200 x и 400 x).



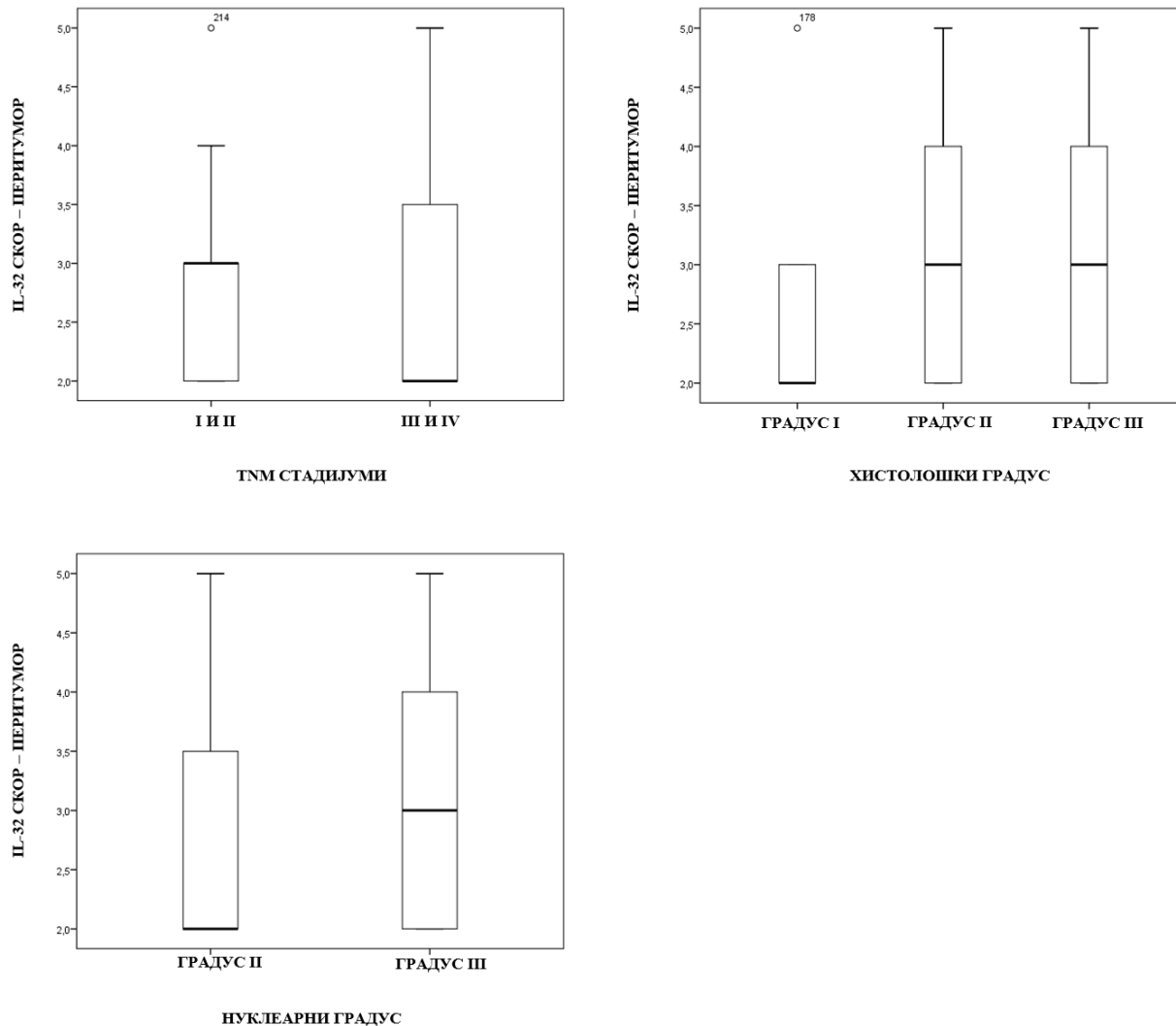
Фигура 14. Експресија IL-32 у тумору интестиналног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму болести, хистолошком и нуклеарном градусу. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

Пацијенти су затим подељени у односу на присуство васкуларне и перинеуралне инвазије (+ и -), некрози (+ и -) и дезмопластичне реакције (без, слаба, умерена и наглашена). Анализа експресије ПЛ-32 у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца показала је да нема статистички значајне разлике између испитиваних група ($p > 0.05$; Фигура 15).

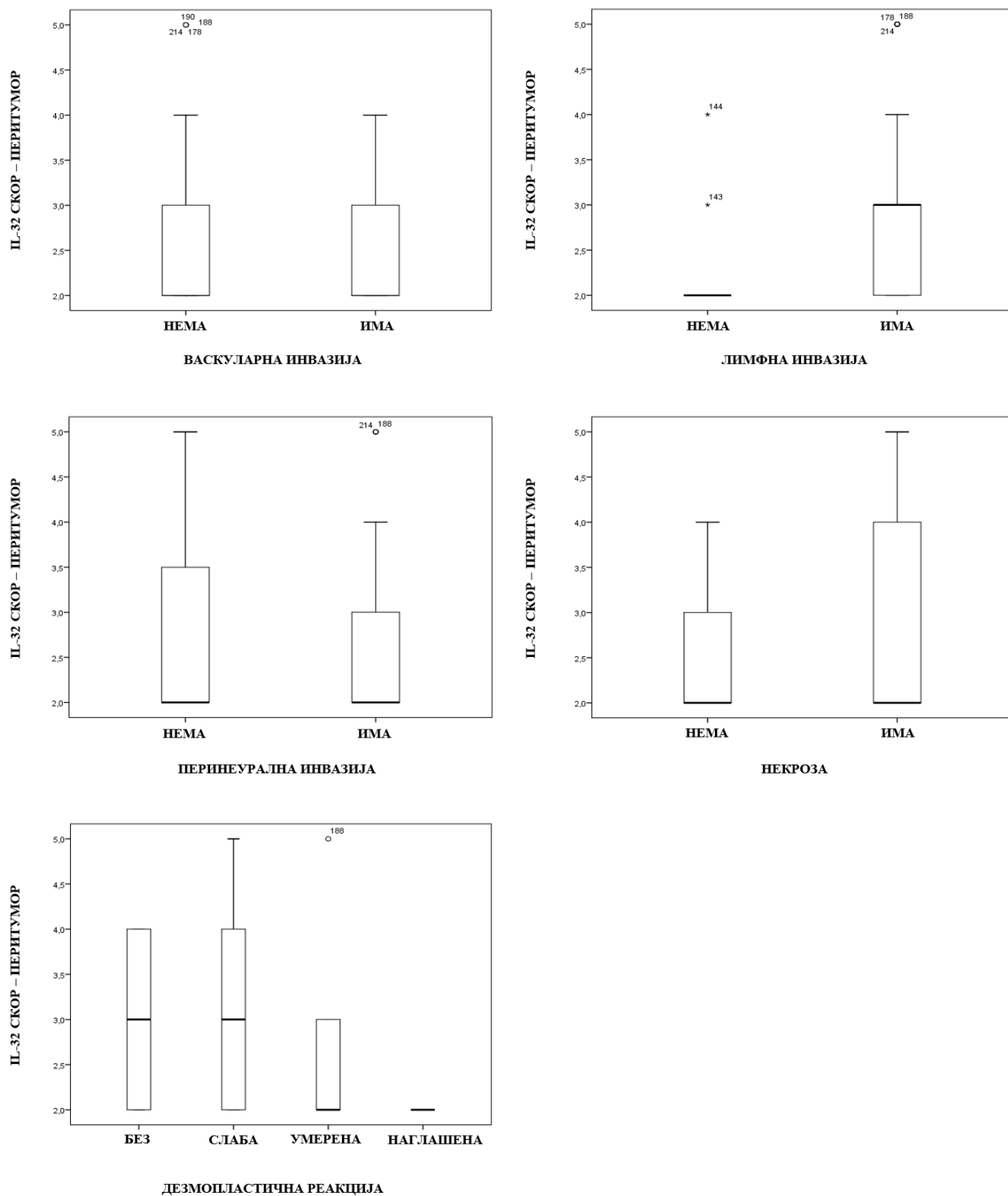


Фигура 15. Експресија ПЛ-32 у тумору интестиналног типа карцинома желуца у односу на васкуларну, перинеуралну инвазију, некрозу и дезмопластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству васкуларне и перинеуралне инвазије, некрозе и дезмопластичној реакцији у туморском ткиву интестиналног карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

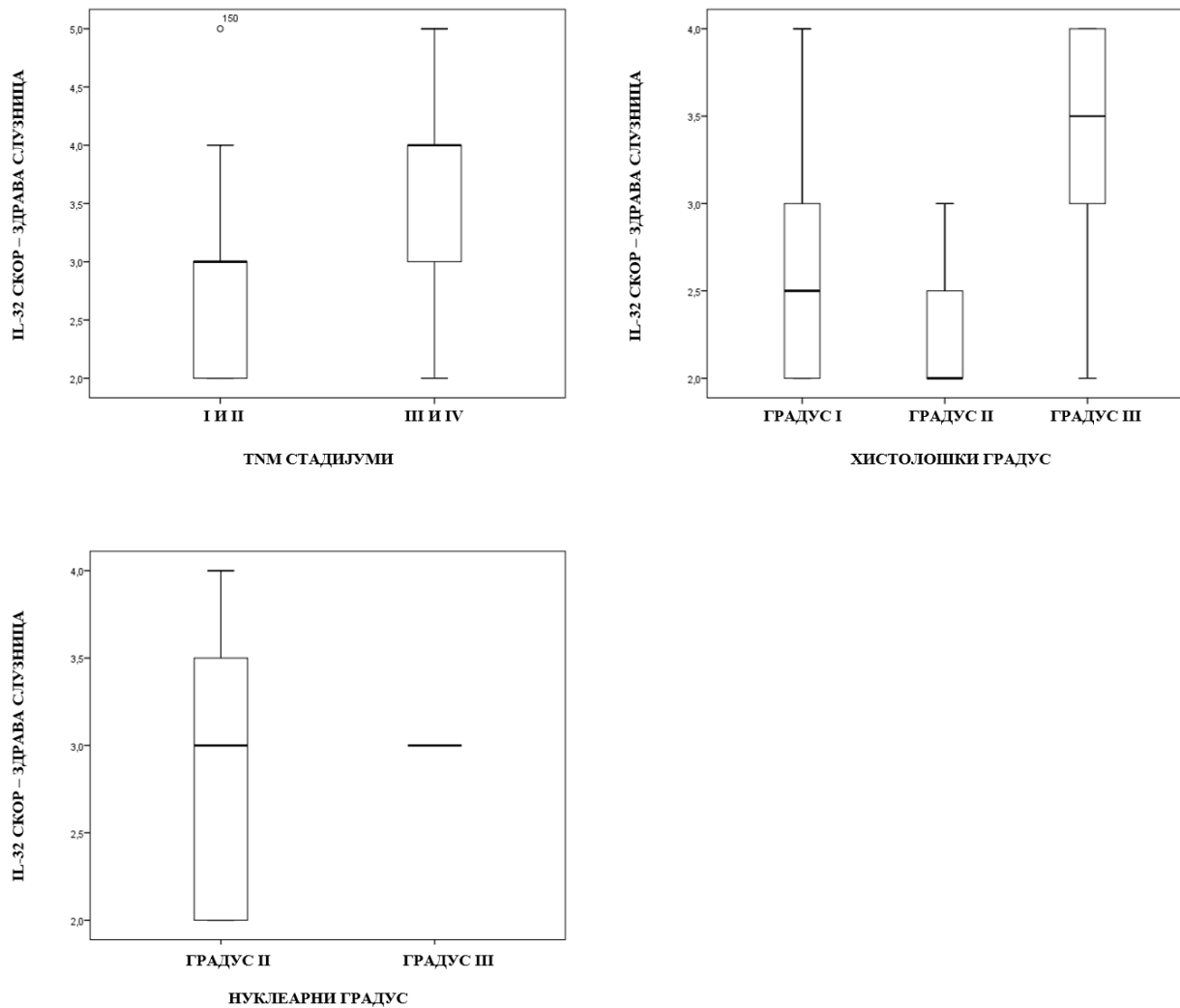
Анализа експресије IL-32 у перитумору и здравом ткиву интестиналног типа карцинома желуца у односу на TNM стадијум (I+II и III+IV), хистолошки и нуклеарни градус (градуси I, II и III) није показала статистички значајну разлику између дефинисаних група ($p > 0.05$; Фигуре 16-19).



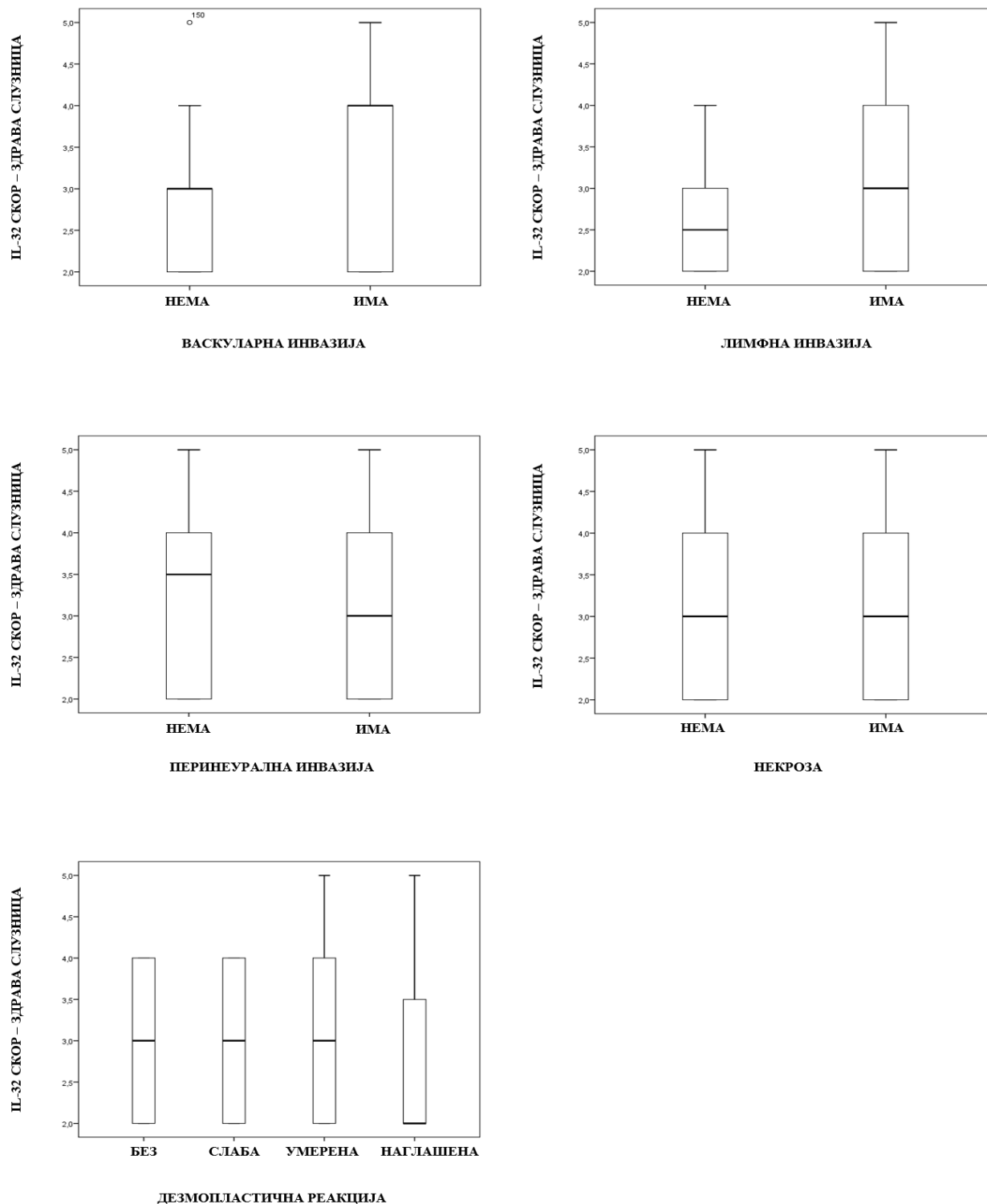
Фигура 16. Експресија IL-32 у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на TNM стадијум, хистолошки и нуклеарни градус. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму болести, хистолошком и нуклеарном градусу. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



Фигура 17. Експресија IL-32 у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на васкуларну, лимфну, перинеуралну инвазију, некрозу и дезмопластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, некрозе и дезмопластичној реакцији у перитуморском ткиву интестиналног карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



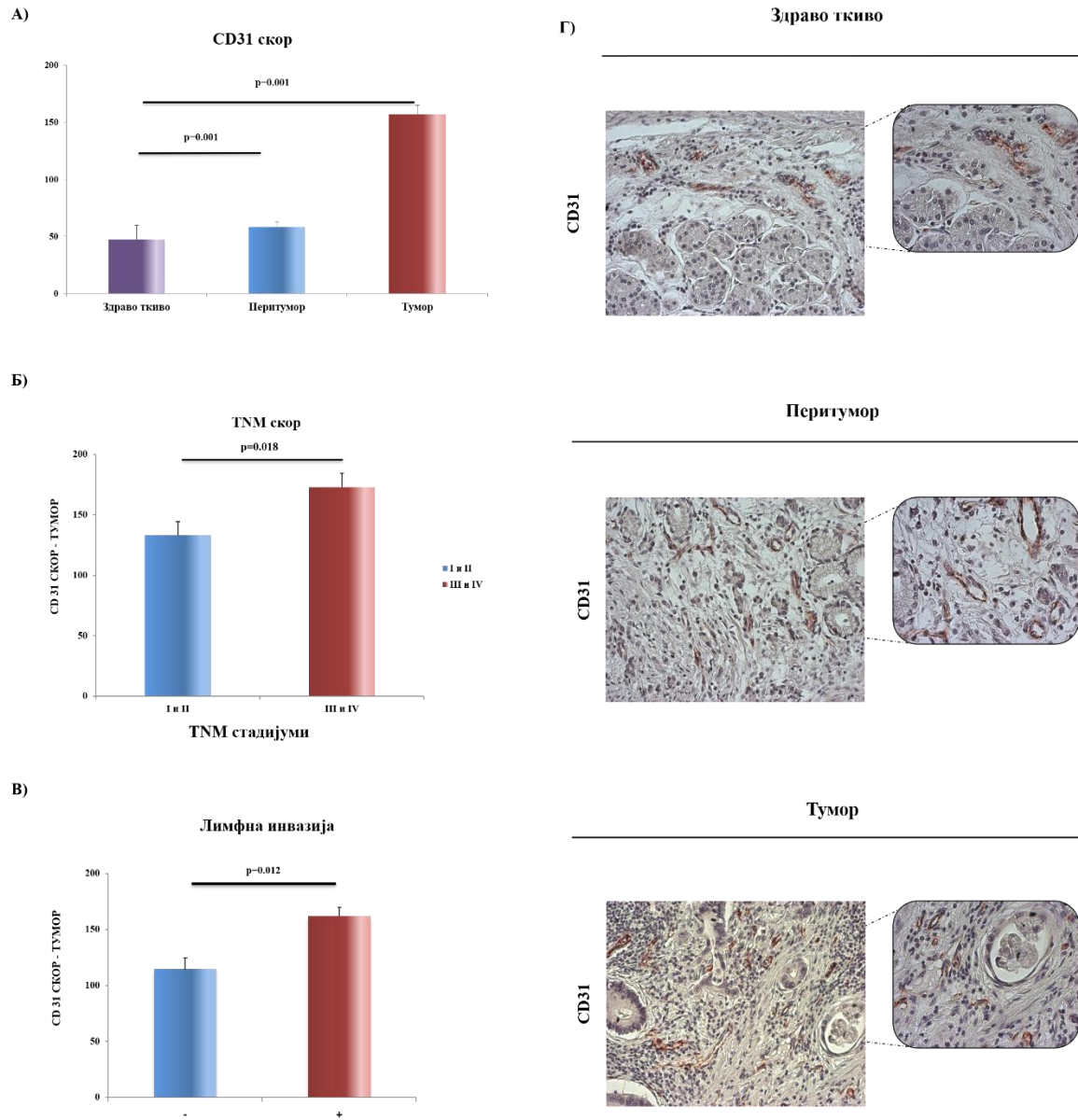
Фигура 18. Експресија IL-32 у здравом ткиву поред интестиналног типа карцинома желуца у односу на TNM стадијум, хистолошки и нуклеарни градус. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму болести, хистолошком и нуклеарном градусу у здравом ткиву интестиналног карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



Фигура 19. Експресија IL-32 у здравом ткиву поред интестиналног типа карцинома желуца у односу на васкуларну, лимфну, перинеуралну инвазију, некрозу и дезмопластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, некрозе и дезмопластичној реакцији у здоровој слузници интестиналног карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

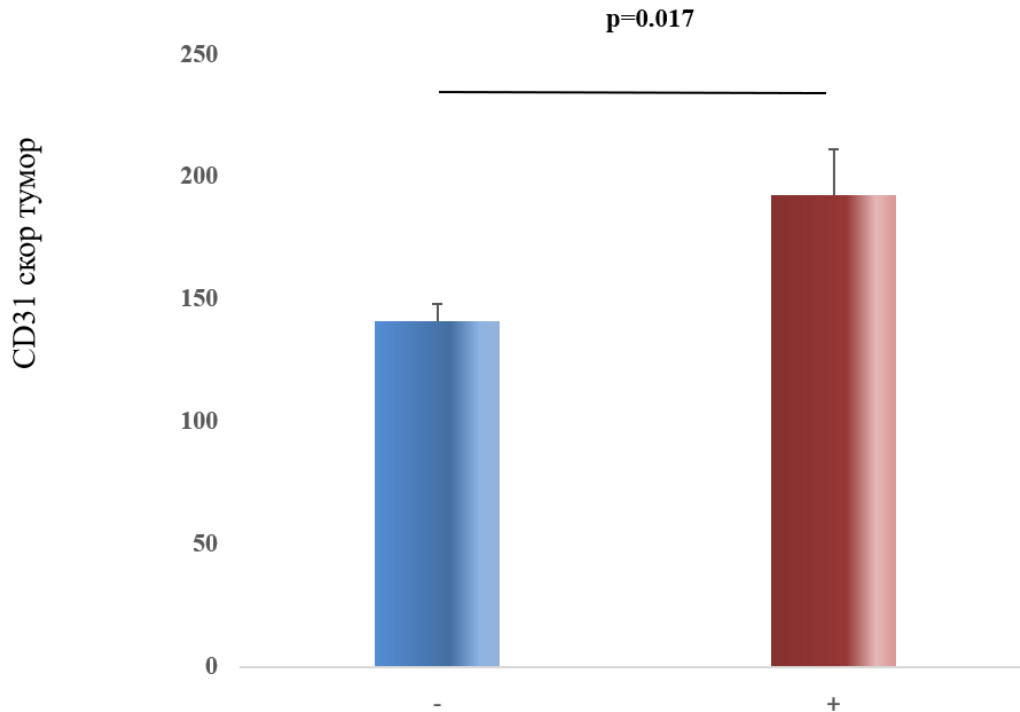
4.2.2. Микроваскуларна густина је повезана са TNM стадијумом и инвазијом крвних и лимфних судова

Анализирали смо микроваскуларну густину у тумору, перитумору и здравом ткиву карцинома желуца. Како експресија молекула CD31 (PECAM -1) указује на васкулатуру и присуство крвних судова, имунохистохемијски је анализирано туморско, перитуморско и здраво ткиво свих 60 пацијената са интестиналним типом карцинома желуца. Наши резултати су показали да је MVD значајно већа у туморском ткиву у поређењу са перитуморским и здравим ткивом карцинома желуца ($p=0.001$; Фигура 20А). Затим, болесници су разврстани у два скупа узимајући у обзир TNM стадијум болести: I+II и III+IV. Пацијенти са TNM стадијумима III+IV су имали знатно већу MVD у туморском ткиву у поређењу са пацијентима са TNM стадијумима I+II ($p=0.018$; Фигура 20Б). Затим смо поделили пацијенте на основу инвазије лимфних и крвних судова (+ и -) и анализирали MVD у туморском ткиву. Анализа експресије CD31 у туморском ткиву интестиналног карцинома желуца показала је да је MVD значајно већа у туморском ткиву пацијената са верификованом инвазијом лимфних ($p=0.012$, Фигура 20В) и крвних судова ($p=0.017$; Фигура 21).



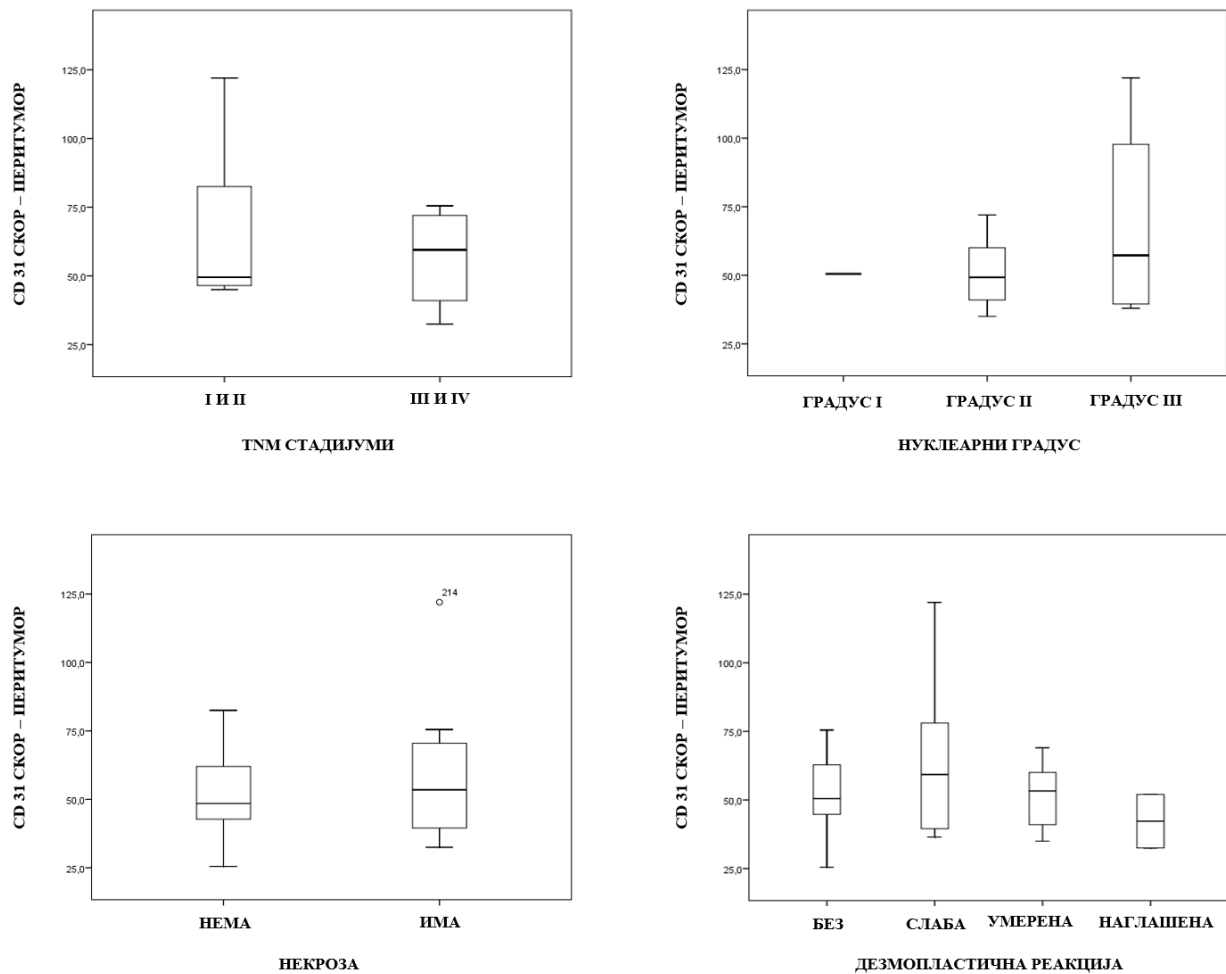
Фигура 20. MVD у тумору, перитумору и здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. **А:** Експресија CD31 је знатно већа у туморском ткиву у поређењу са експресијом у перитуморском ткиву интестиналног карцинома желуца ($p=0.001$). **Б:** Болесници са већим TNM стадијумом (стадијум III+IV) имали су значајно већу експресију CD31 у туморском ткиву у поређењу са болесницима са нижим TNM стадијумом (стадијум I+II) ($p=0.018$). **В:** Болесници са детектованом инвазијом лимфних судова имали су знатно већу експресију CD31 у туморском ткиву у поређењу са оболелима без инвазије лимфних судова ($p = 0,012$). Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney- евим тестом. **Д:** Имунохистохемијско бојење CD31 у тумору, перитумору и здравом ткиву интестиналног типа карцинома желуца (увећање 200 х и 400 х).

ВАСКУЛАРНА ИНВАЗИЈА

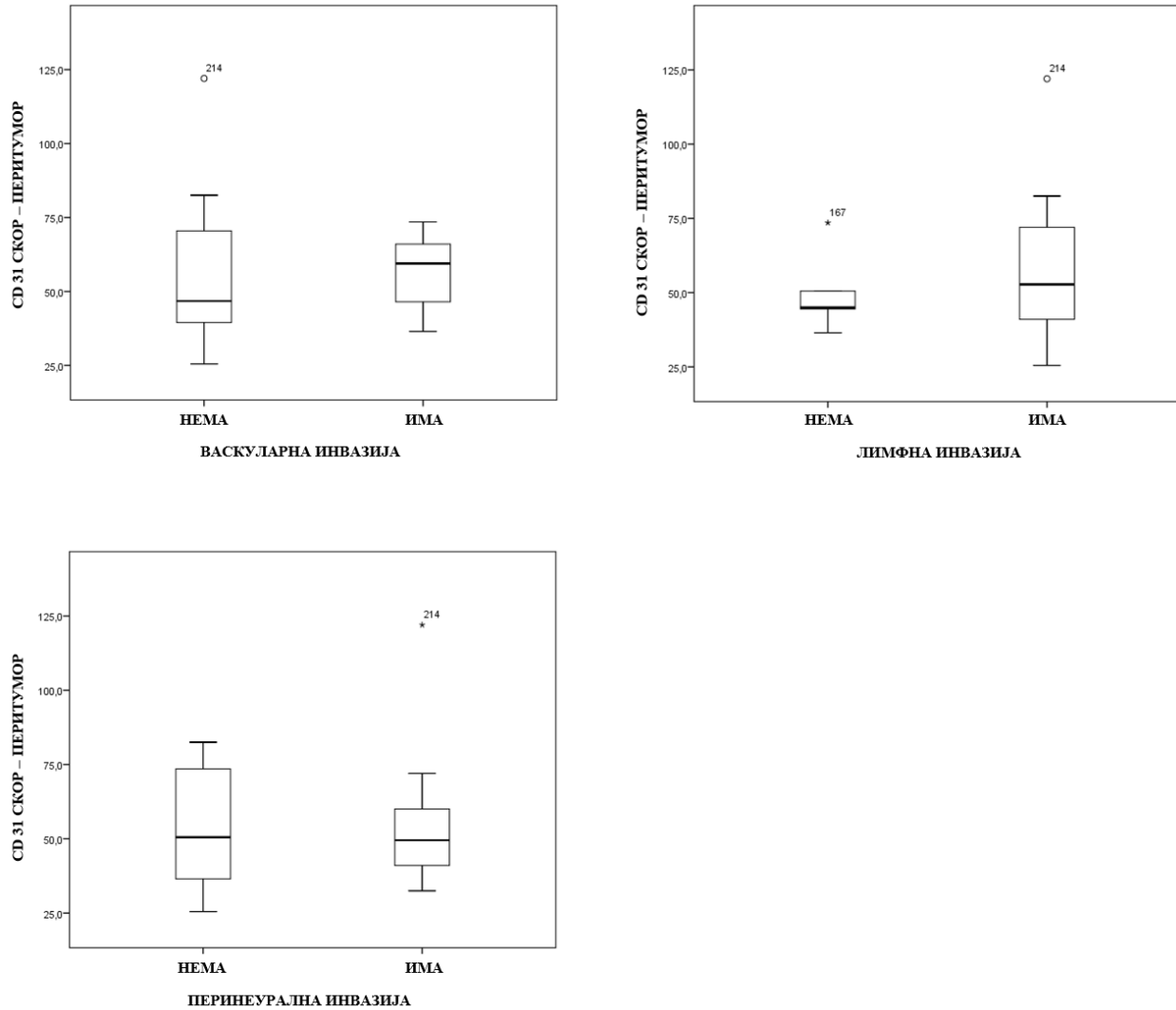


Фигура 21. MVD у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на присуство васкуларне инвазије. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству васкуларне инвазије у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца. Пацијенти са детектованом васкуларном инвазијом имали су знатно већу експресију CD31 у поређењу са пацијентима без инвазије крвних судова ($p=0.017$). Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney- евим тестом.

Анализирана је експресија CD31 у перитуморском ткиву. Пацијенти су подељени према према TNM стадијуму, хистолошком и нуклеарном градусу, такође и према васкуларној, лимфној и перинеуралној инвазији (+ и -), као и дезмопластичној реакцији (без, слаба, умерена, наглашена) и некрози (+ и -). Анализом експресије CD31 у перитумору интестиналне форме карцинома желуца није нађена статистички значајна разлика између дефинисаних група ($p>0.05$; Фигуре 22 и 23).

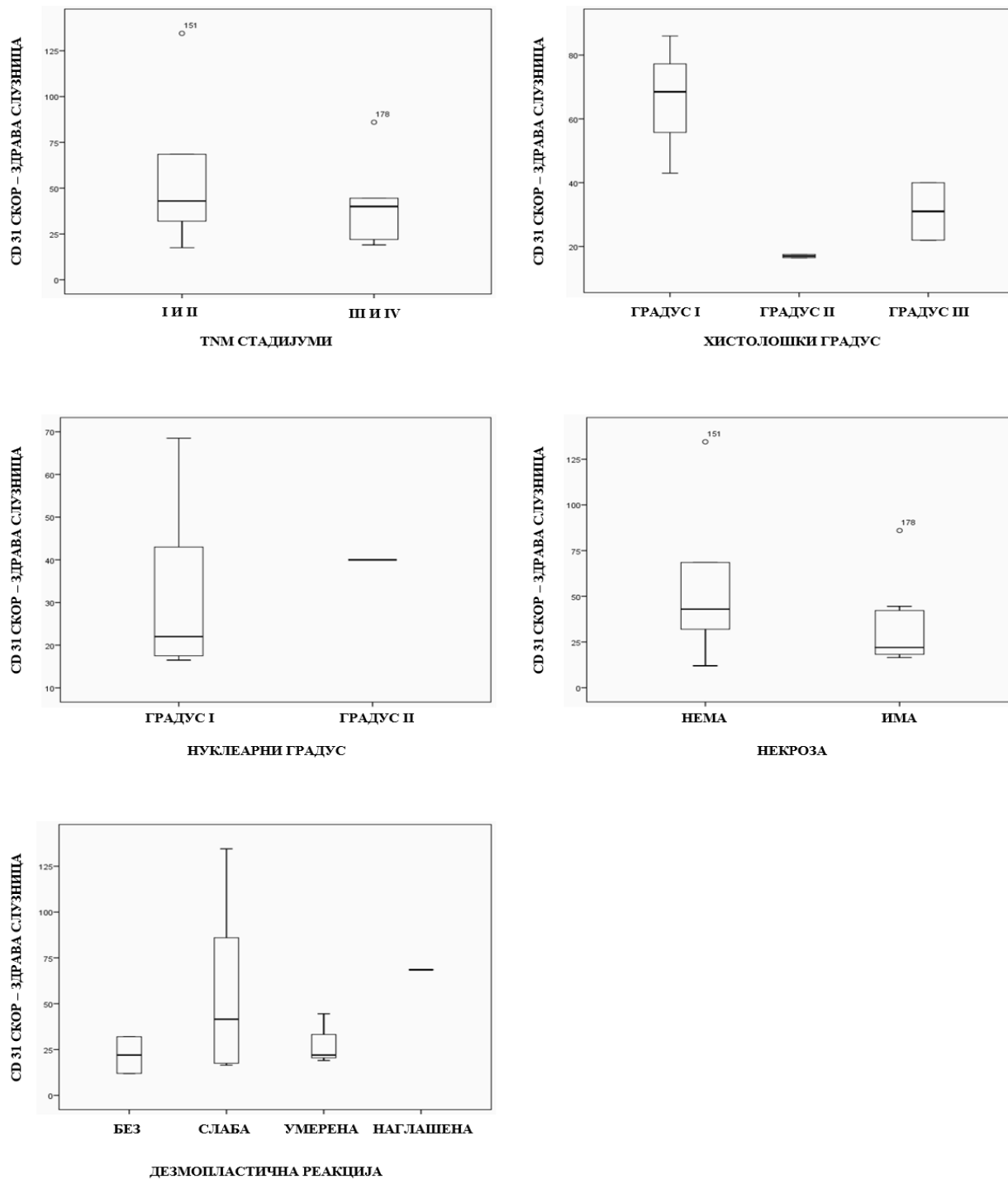


Фигура 22. MVD у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на TNM стадијум, нуклеарни градус, некрозу и дезмопластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму и нуклеарном градусу, присуству/одсуству некрозе и дезмопластичној реакцији интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

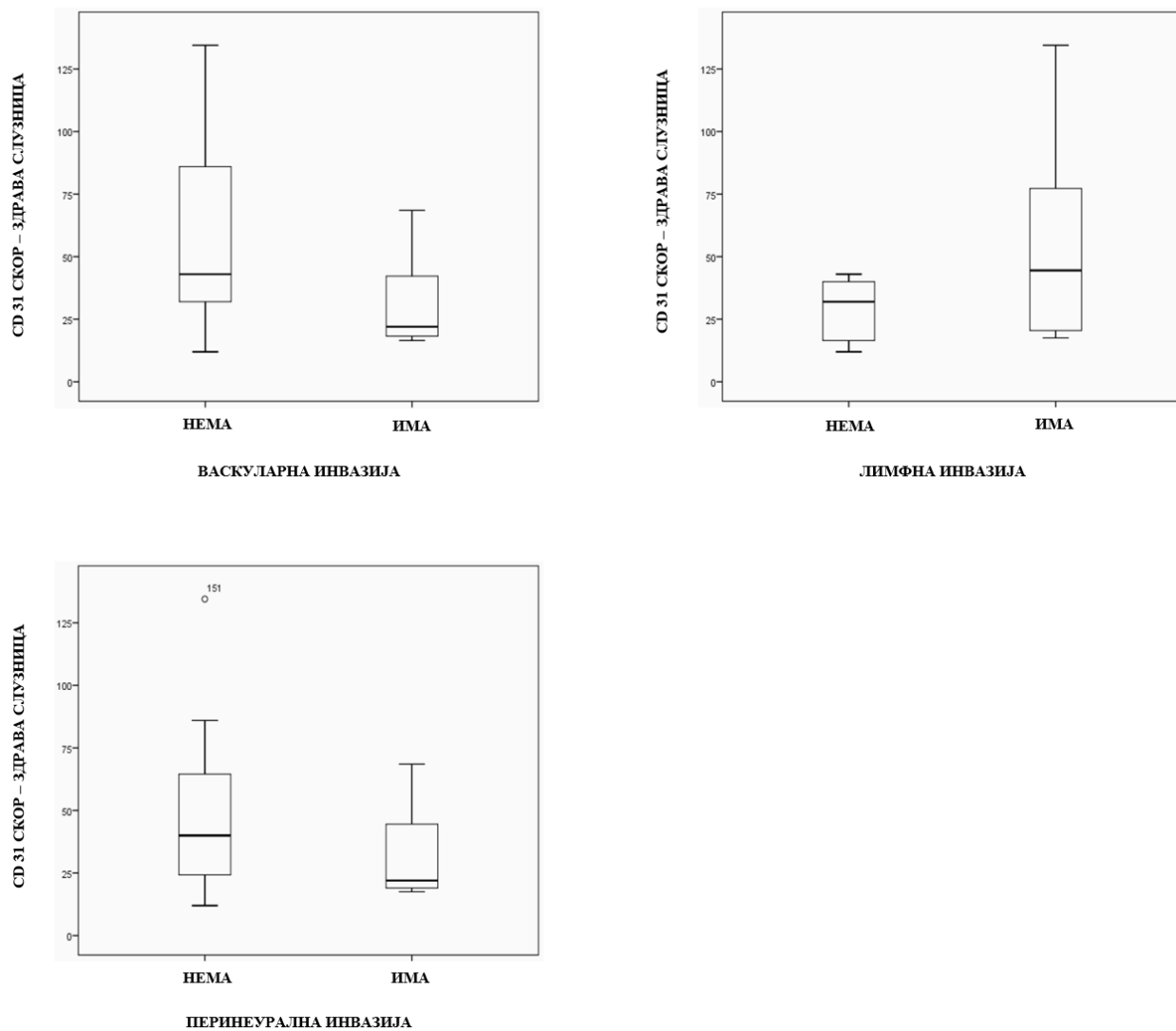


Фигура 23. MVD у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на васкуларну, лимфну и перинеуралну инвазију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству васкуларне, лимфне и перинеуралне инвазије интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

Потом је анализирана MVD у здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца, код претходно дефинисаних група. Анализа експресије CD31 није показала статистички значајну разлику испитиваних категорија ($p > 0.05$; Фигуре 24 и 25).



Фигура 24. MVD у здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца, у односу на TNM стадијум, нуклеарни градус, некрозу и дезмопластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму хистолошком и нуклеарном градусу интестиналног карцинома желуца, присуству/одсуству некрозе и дезмопластичној реакцији интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

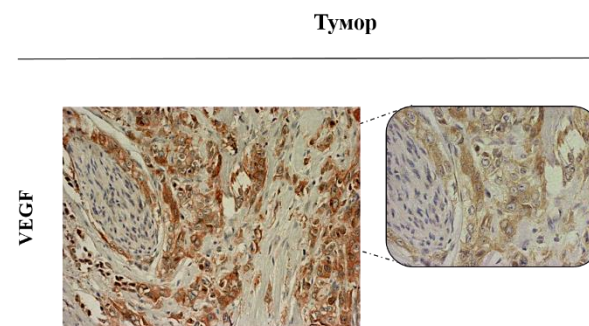
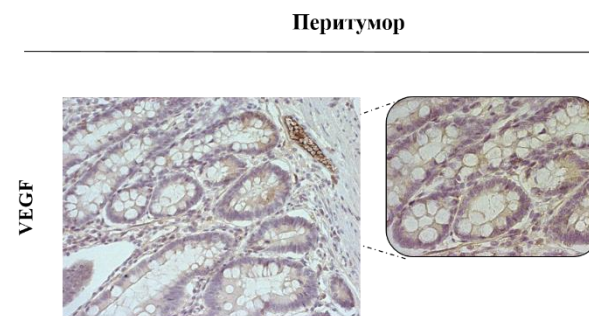
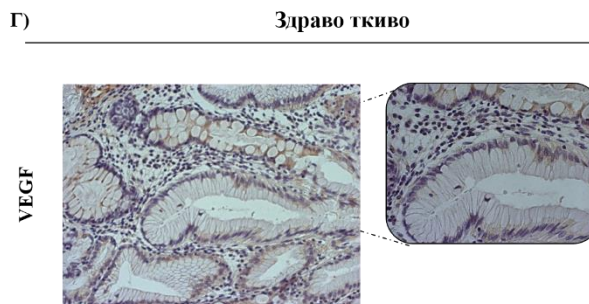
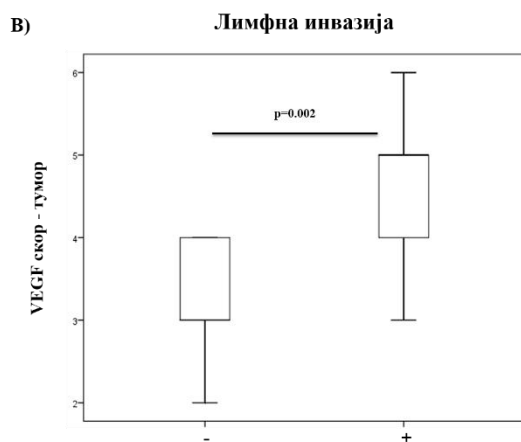
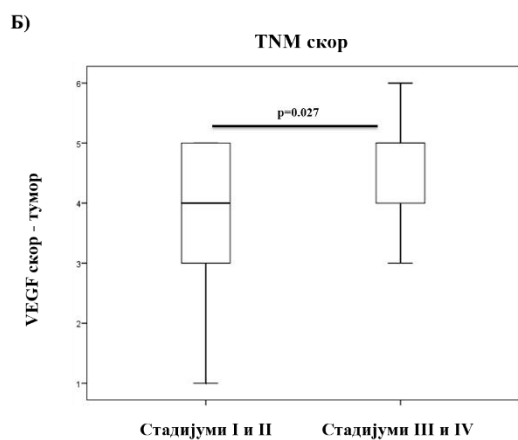
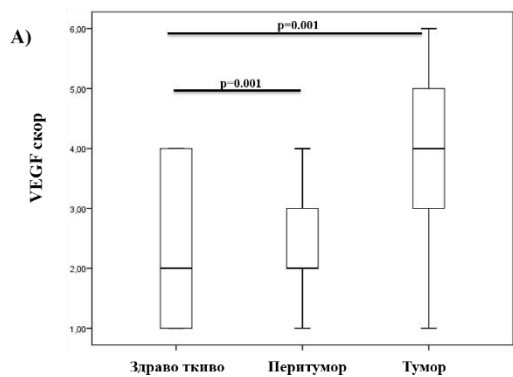


Фигура 25. MVD у здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца, у односу на васкуларну, лимфну и перинеуралну инвазију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству васкуларне, лимфне и перинеуралне инвазије карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

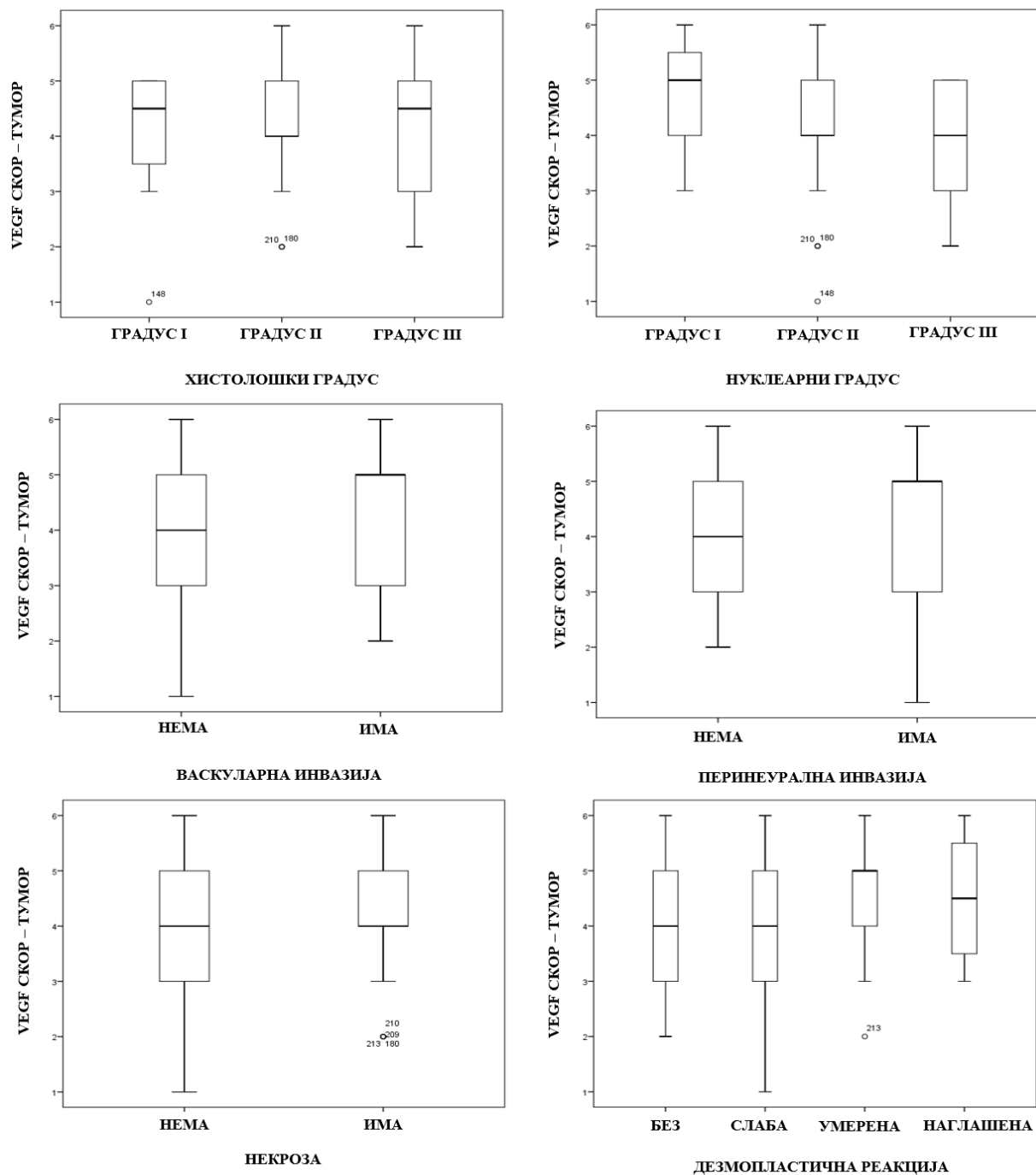
4.2.3. Експресија VEGF-а је повезана са TNM стадијумом тумора и инвазијом лимфних судова

Циљ нашег истраживања надаље заснивао се на анализи експресије различитих проангиогених фактора у туморском, перитуморском и здравом ткиву. Прво смо испитивали експресију VEGF-а, једног од главних проангиогених молекула. Резултати добијени у експерименту показали су да је експресија VEGF-а значајно израженија у туморском ткиву у поређењу са перитуморским ткивом пацијената са карциномом желуца ($p=0.001$; Фигура 26А). Потом су пацијенти разврстани у два скупа узимајући у обзир TNM стадијум болести: I+II и III+IV. Пацијенти са TNM стадијумима III+IV имају значајно већу експресију VEGF-а у туморском ткиву у поређењу са пацијентима са TNM стадијумима I+II ($p=0.018$; Фигура 26Б). Следећа расподела пацијената учињена је на основу присуства лимфне инвазије и анализирана је експресија VEGF-а. Експресија VEGF била је знатно већа у ткиву тумора са присутном лимфном инвазијом ($p=0.002$; Фигура 26В).

Имунохистохемијском анализом експресије VEGF-а у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца утврђено да не постоји статистички значајна разлика у експресији испитиваног маркера између испитиваних категорија: хистолошком и нуклеарном градусу (Фигура 27, горњи панел); присуству/одсуству васкуларне и перинеуралне инвазије, као и присуству некрозе и дезмоплазије ($p>0.05$; Фигура 27, средњи и доњи панел).

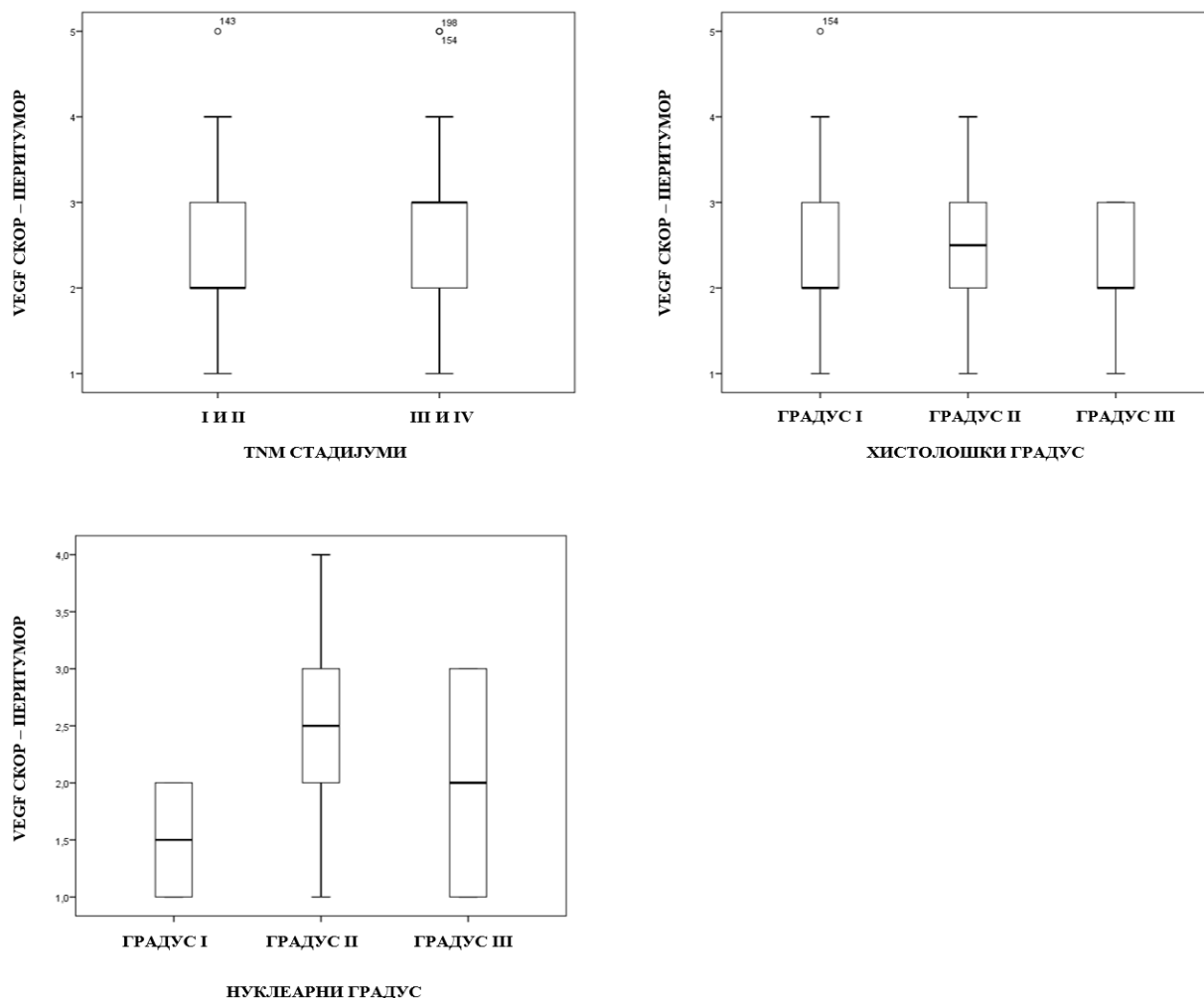


Фигура 26. Имунохистохемијска анализа експресије VEGF-a у тумору, перитумору и здравом ткиву интестиналног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. **А:** Значајно већа експресија VEGF-a у туморском ткиву у поређењу са експресијом у перитуморском и здравом ткиву карцинома желуца ($p=0.001$). **Б:** Значајно већа експресија VEGF-a у туморском ткиву пацијената са TNM стадијумима III+IV у поређењу са пацијентима са TNM стадијумима I+II ($p=0.018$). **В:** Експресија VEGF-a је значајно већа у туморском ткиву пацијената са верификованом лимфном инвазијом у односу на пацијенте без детектоване лимфне инвазије ($p=0.002$). Статистичка значајност је тестирана Mann-Whitney-евим тестом. **Г:** Имунохистохемијско бојење VEGF у тумору, перитумору и здравом ткиву интестиналног типа карцинома желуца (увећање 200 x и 400 x).

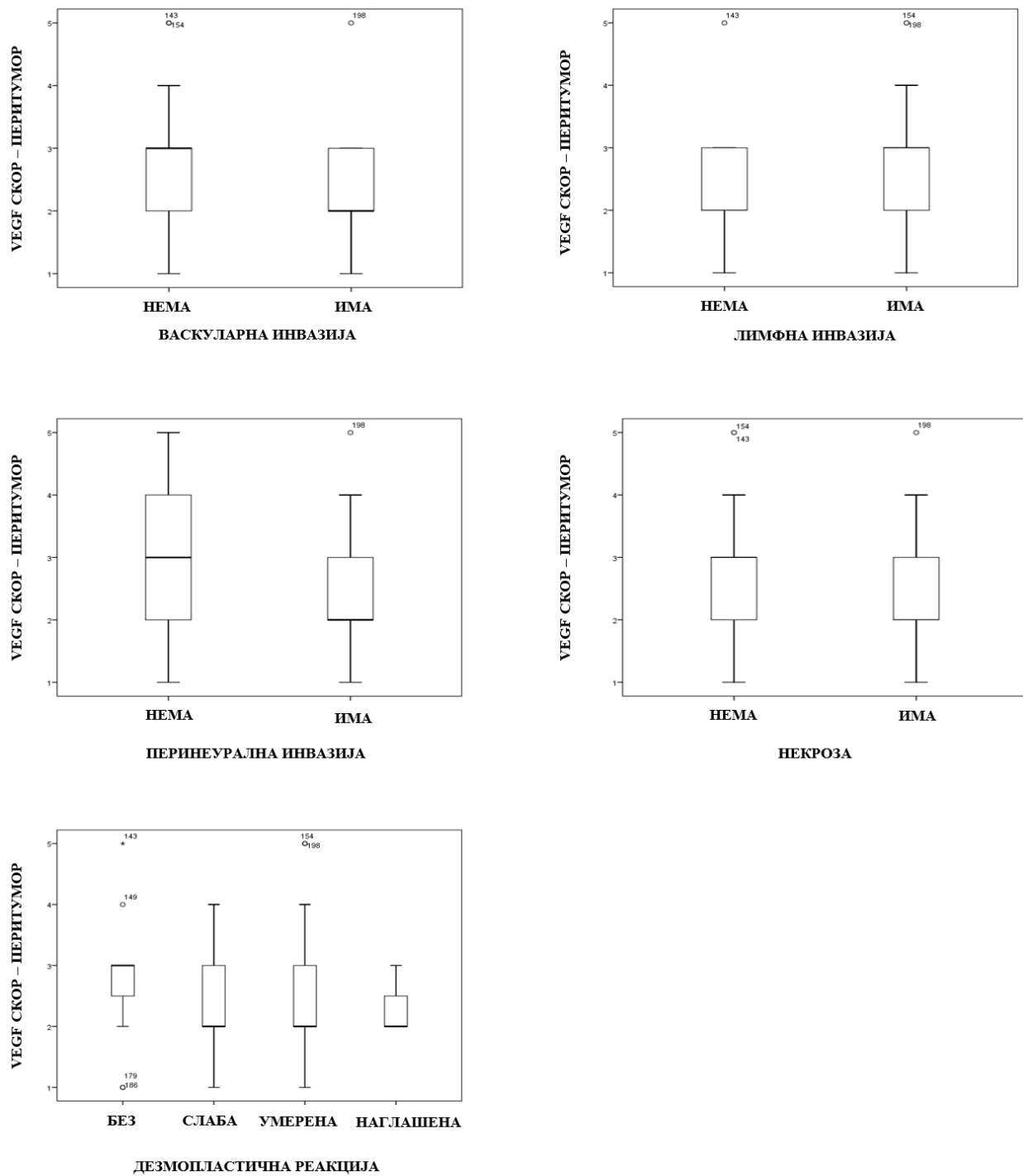


Фигура 27. Експресија VEGF-а у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на хистолошки и нуклеарни градус, васкуларну и перинеуралну инвазију, некрозу и дезмопластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству васкуларне и перинеуралне инвазије, некрозе, дезмопластичној реакцији, и хистолошком и нуклеарном градусу у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

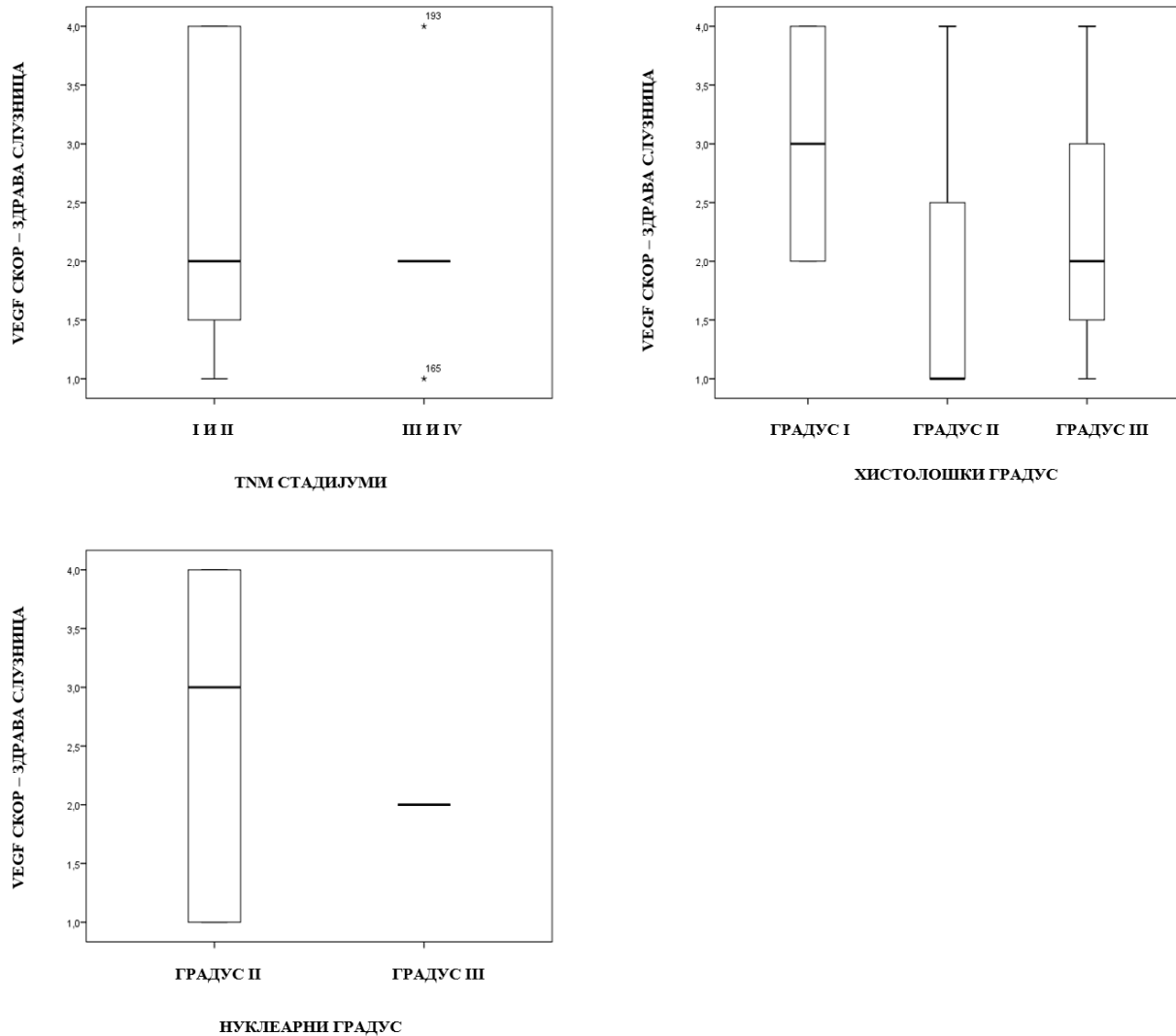
Анализирана је експресија VEGF-а у перитуморском и здравом ткиву интестиналне форме карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму болести (I+II и III+IV), хистолошком и нуклеарном градусу (I, II и III). Затим смо све пацијенте поделили према присуству/одсуству васкуларне, лимфне и перинеуралне инвазије, некрозе; као и степену дезмопластичне реакције (без, слаба, умерена и наглашена). Анализа експресије VEGF-а у перитуморском и здравом ткиву оболелих од интестиналног карцинома желуца показала је да нема статистички значајне разлике у експресији испитиваног маркера у перитуморском и здравом ткиву оболелих од интестиналног карцинома желуца између дефинисаних група ($p > 0,05$; Фигуре 28-31).



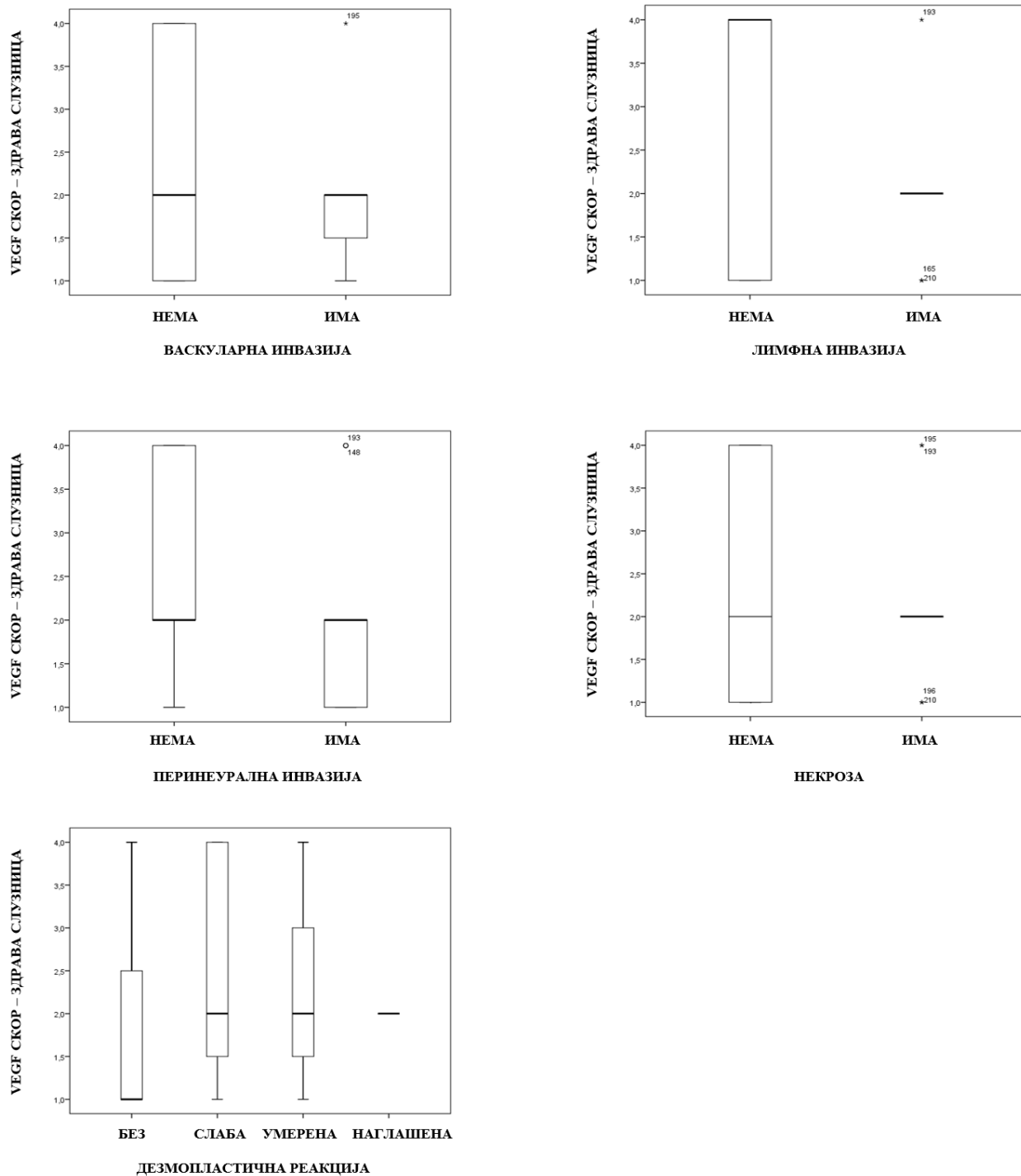
Фигура 28. Експресија VEGF-а у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на TNM стадијум, хистолошки и нуклеарни градус. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму болести, хистолошком и нуклеарном градусу. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



Фигура 29. Експресија VEGF-а у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на лимфну, васкуларну, перинеуралну инвазију, некрозу и дезмоластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, некрозе, дезмоластичне реакције интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



Фигура 30. Експресија VEGF-а у здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца, у односу на TNM стадијум, хистолошки и нуклеарни градус. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму болести, хистолошком и нуклеарном градусу интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

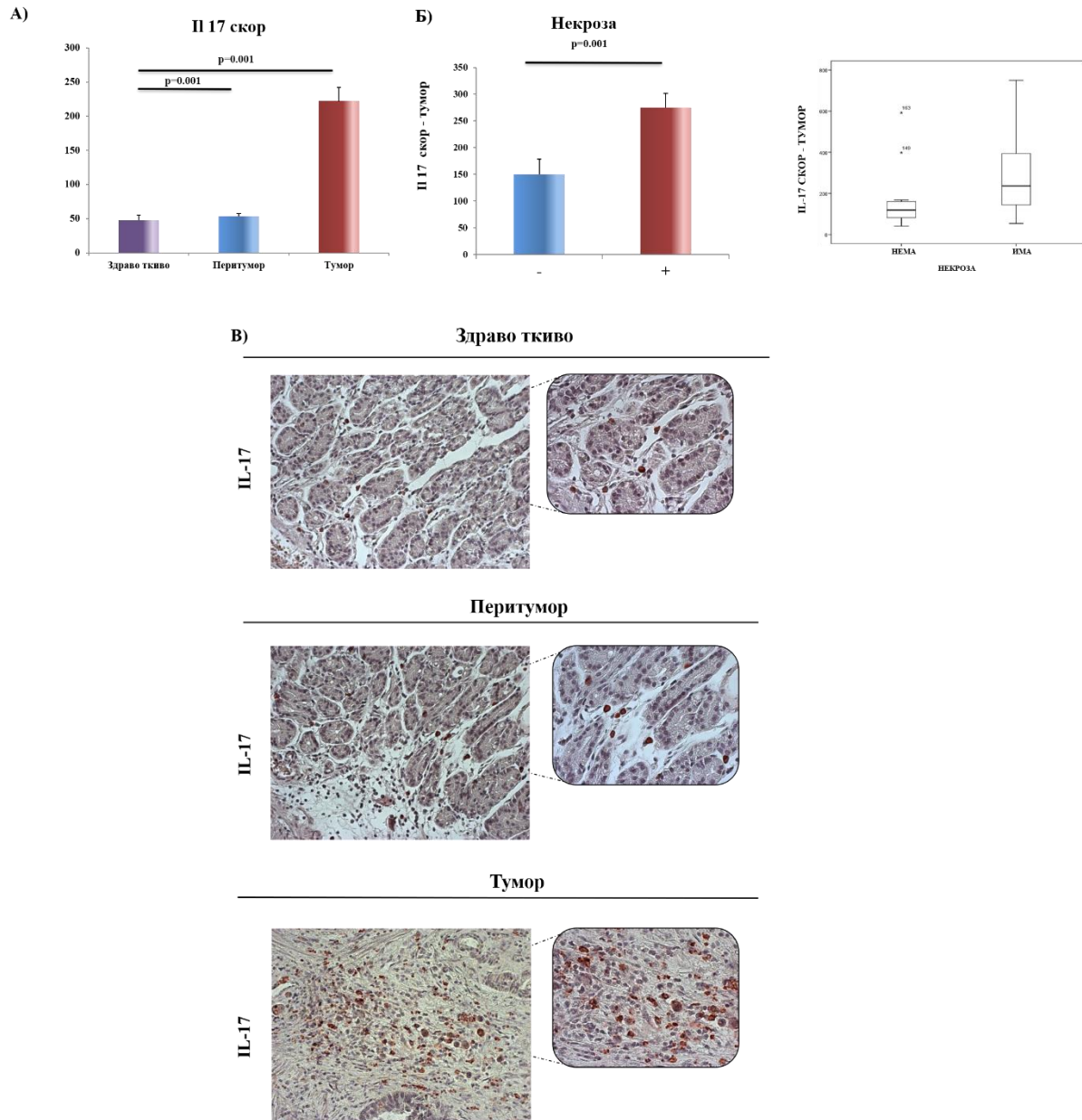


Фигура 31. Експресија VEGF-а у здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца, у односу на лимфну, васкуларну, перинеуралну инвазију, некрозу и дезмопластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, некрозе, као и дезмопластичне реакције интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

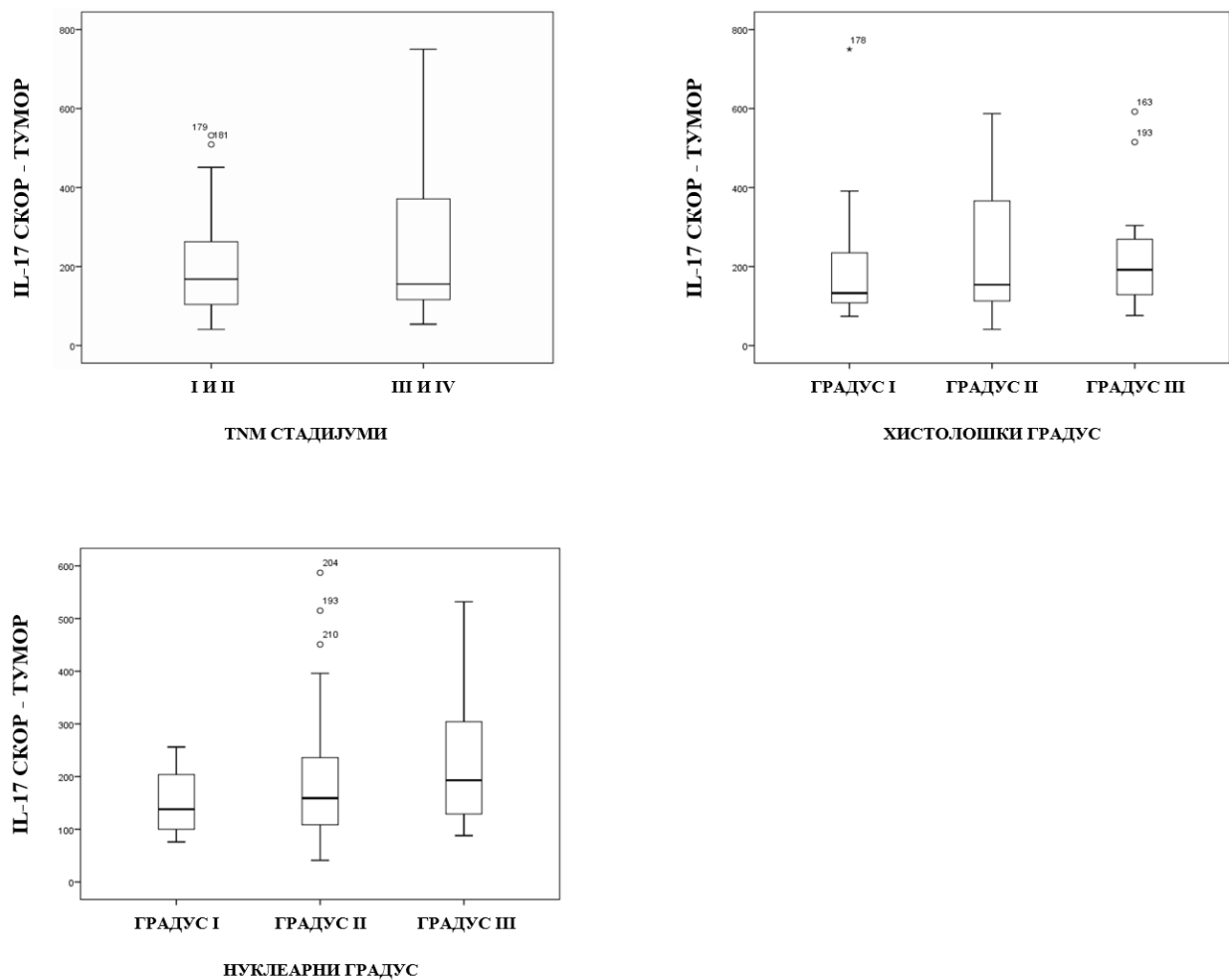
4.2.4. Експресија IL-17 повезана је са туморском некрозом

Анализа експресије IL-17 показана је значајно већа експресија IL-17 у туморском ткиву у поређењу са перитуморским ткивом ($p=0.001$; Фигура 32А). Према присуству некротичних поља у туморском ткиву, болесници су подељени у две групе (са и без присутне некрозе у тумору, тј. + и -) и анализирана је експресија IL-17. Резултати су показали да је експресија IL-17 значајно већа у туморском ткиву са верификованим некротичним пољима ($p=0.001$; Фигура 32Б).

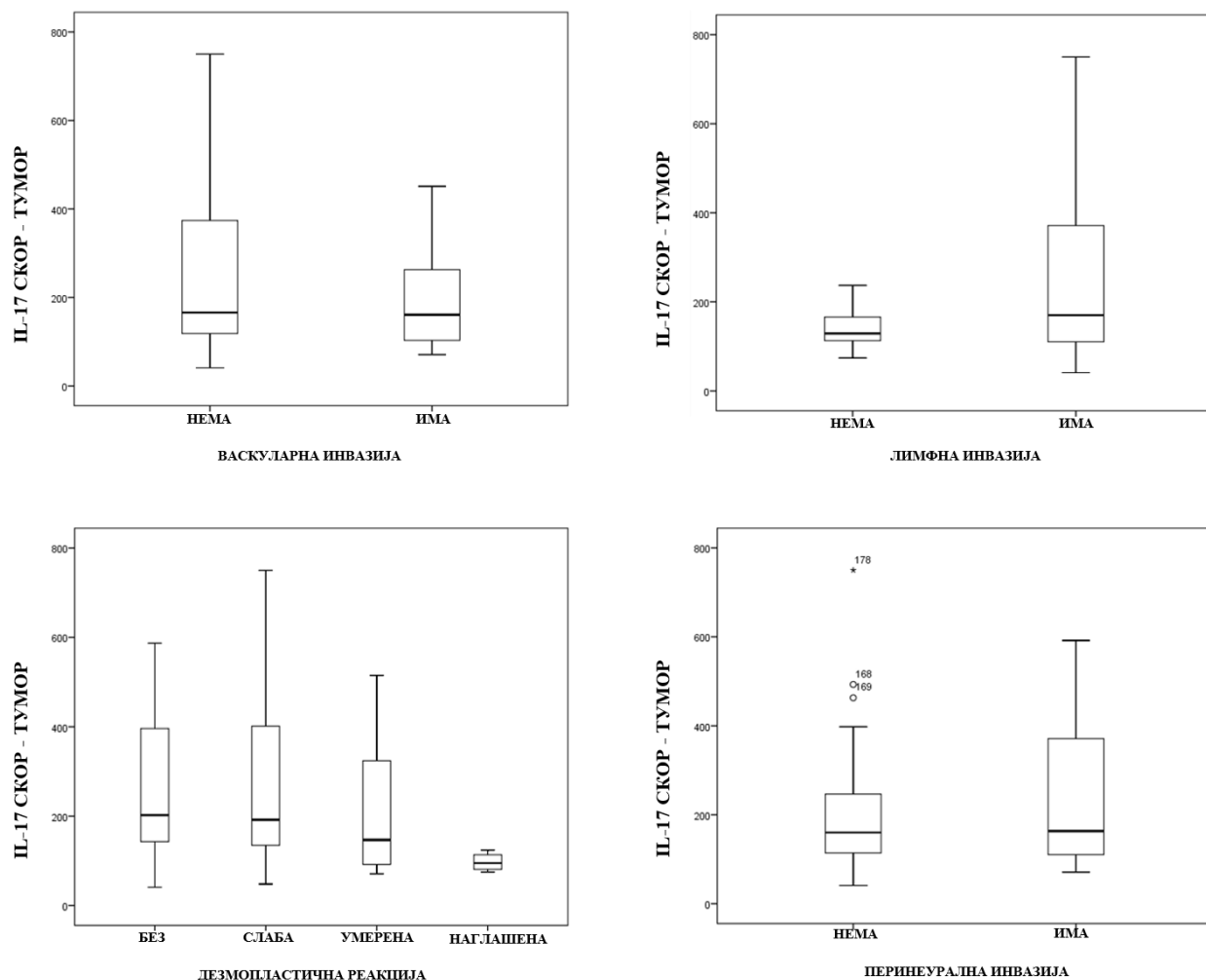
Анализирана је експресија IL-17 у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца болесника подељених на групе на основу TNM стадијума болести, хистолошког и нуклеарног градуса, присуства/одсуства лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, као и степена дезмоплазије. Анализом није нађена статистички значајна разлика у експресији IL-17 између дефинисаних група ($p>0,05$; Фигуре 33 и 34).



Фигура 32. Експресија IL-17 у тумору, перитумору и здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. **А:** значајно већа експресија IL-17 у туморском ткиву у поређењу са перитуморским ткивом ($p=0.001$). **Б:** значајно већа експресија IL-17 у туморском ткиву пацијената са детектабилним некротичним пољем у поређењу са пацијентима без детектабилне некрозе ($p=0.001$). **В:** Репрезентативно имунохистохемијско бојење IL-17 у тумору, перитумору и здравом ткиву интестиналног типа карцинома желуца (увећање 200 х и 400 х).

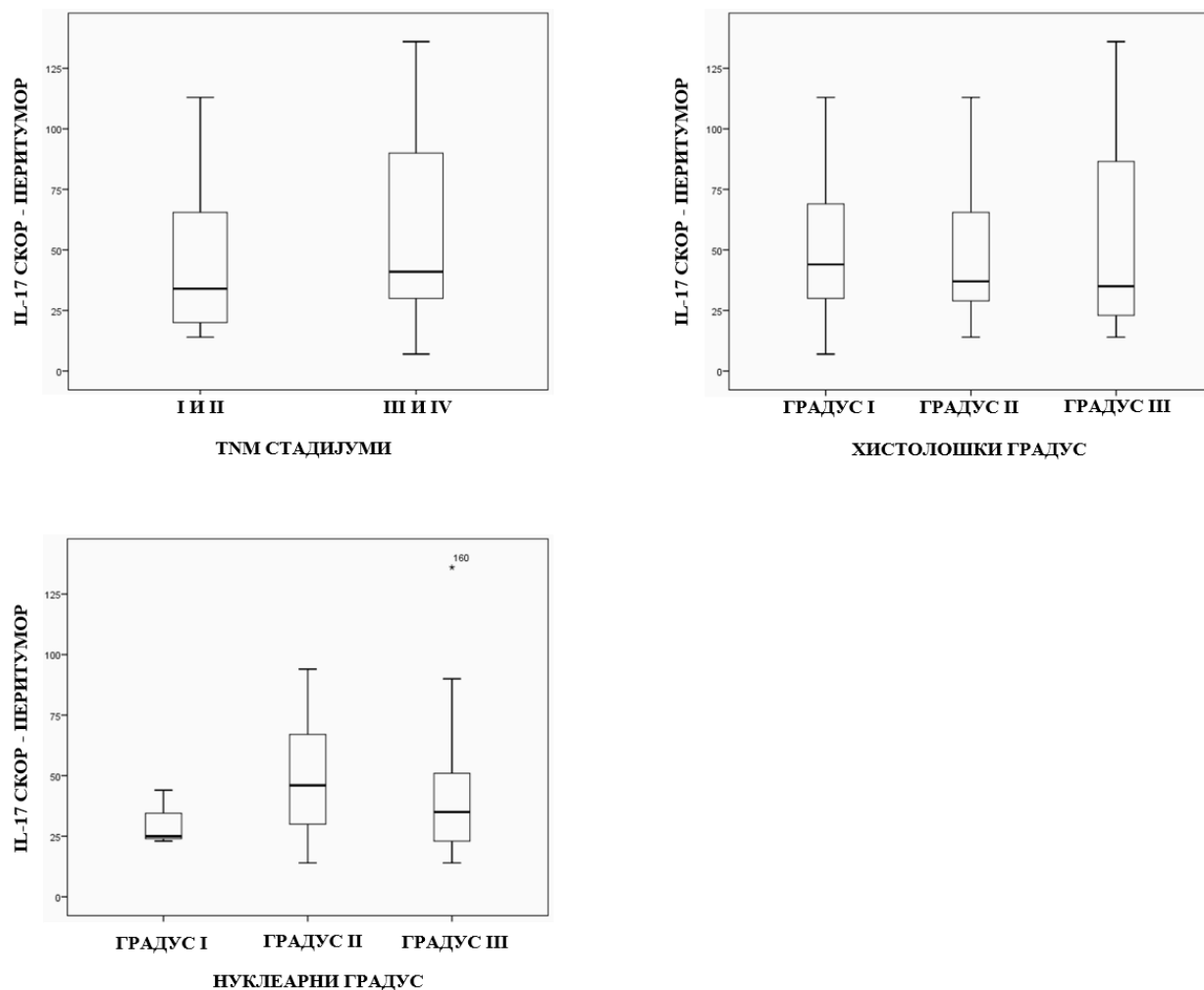


Фигура 33. Експресија ИЛ-17 у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на TNM стадијум, хистолошки и нуклеарни градус. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму болести, хистолошком и нуклеарном граду. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

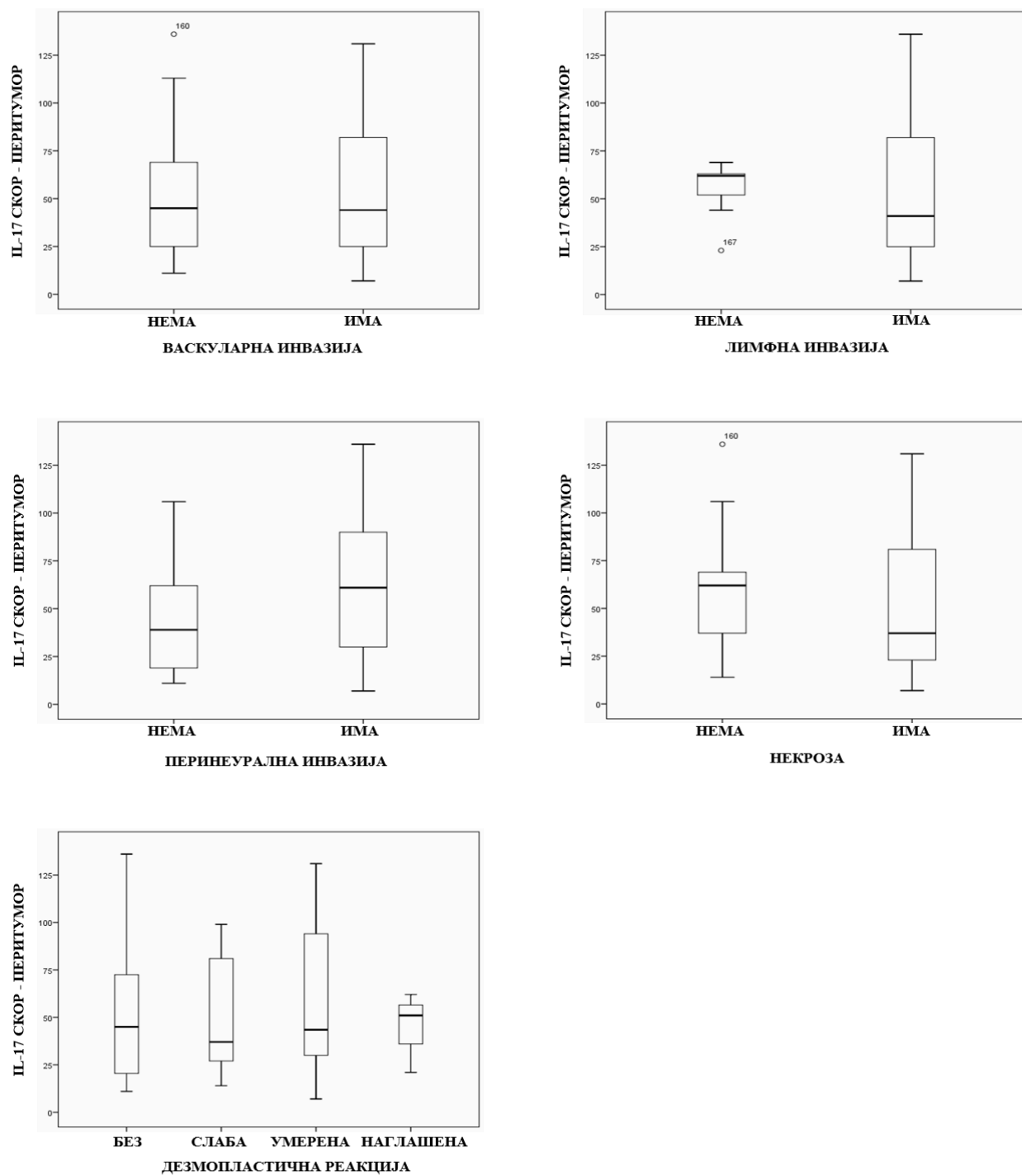


Фигура 34. Експресија IL-17 у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на лимфну, васкуларну, перинеуралну инвазију и дезмоластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, као и дезмоластичној реакцији. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

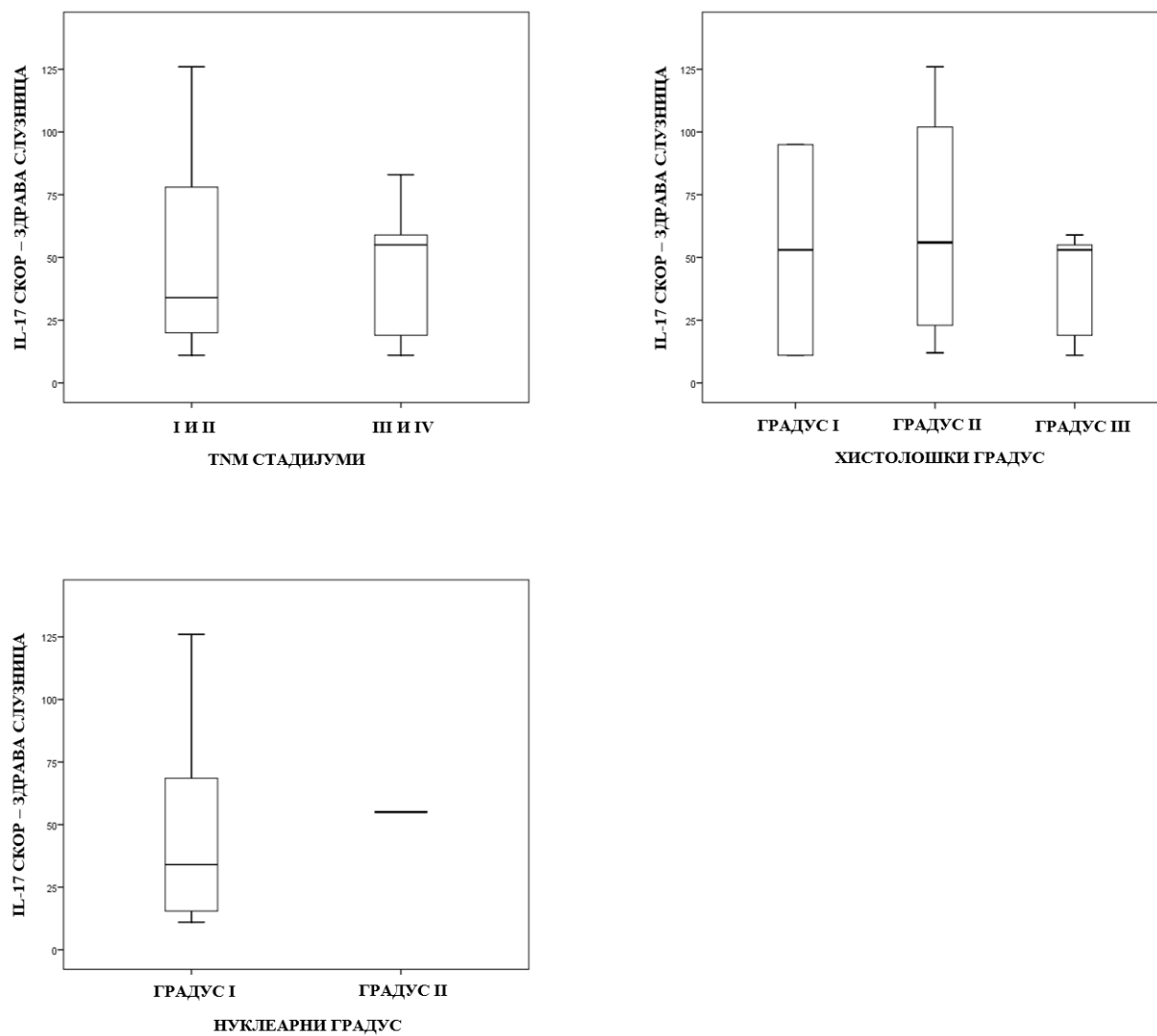
Потом је анализирана експресија IL-17 у перитуморском и здравом ткиву. Болесници са интестиналном формом болести су подељени на групе на основу: TNM стадијума болести, хистолошког и нуклеарног градуса, присуства/одсуства лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, као и степена дезмоплазије. Анализа експресије IL-17 није указала на постојање статистички значајне разлике у експресији у перитуморском, односно околном здравом ткиву, између дефинисаних група ($p > 0.05$; Фигуре 35-38).



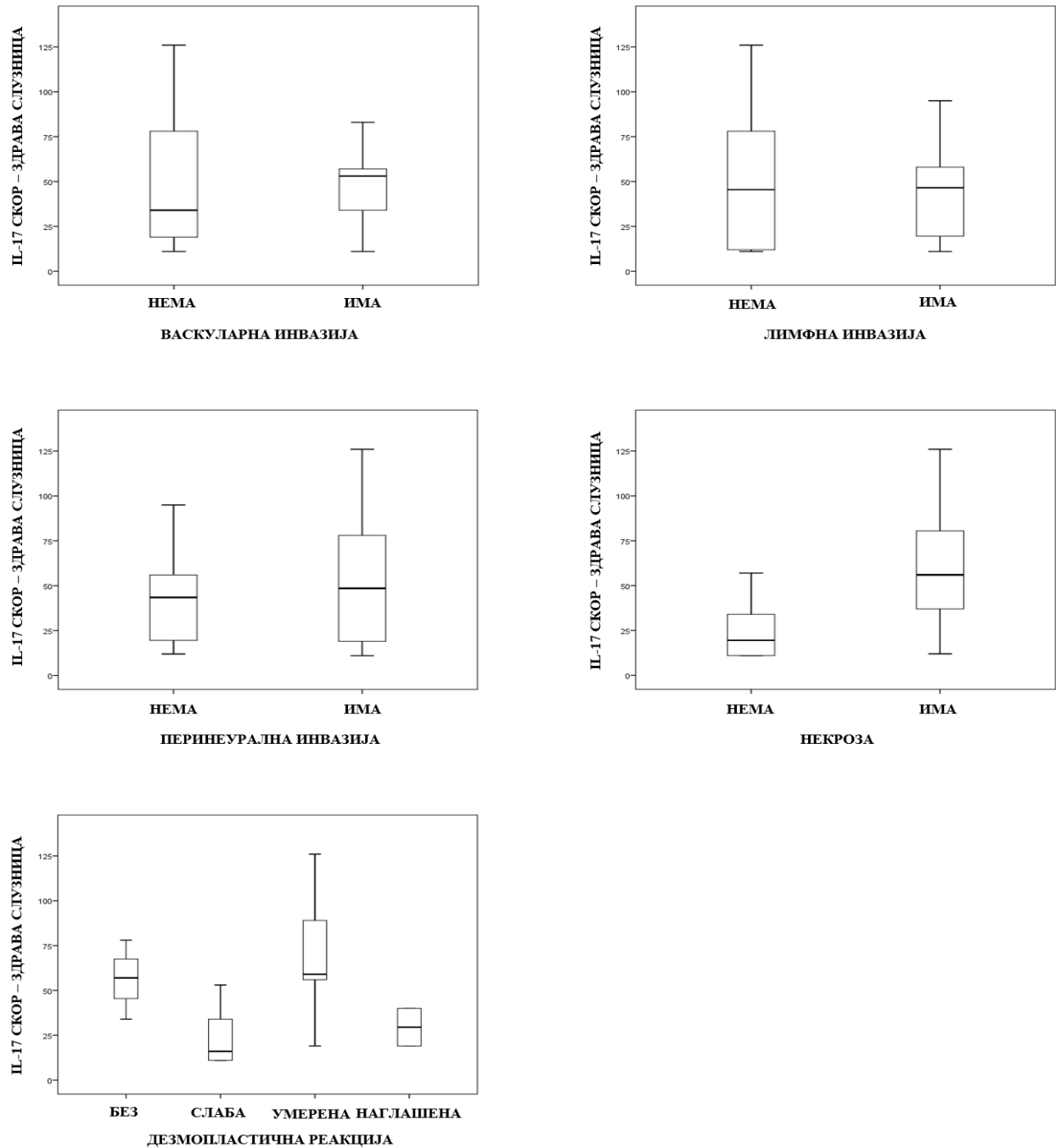
Фигура 35. Експресија IL-17 у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на TNM стадијум, хистолошки и нуклеарни градус. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму болести, хистолошком и нуклеарном градуу интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



Фигура 36. Експресија IL-17 у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на лимфну, васкуларну, перинеуралну инвазију, некрозу и дезмопластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, некрозе као и дезмопластичној реакцији у перитуморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



Фигура 37. Експресија IL-17 у здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца, у односу на TNM стадијум, хистолошки и нуклеарни градус. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према TNM стадијуму болести, хистолошком и нуклеарном градусу. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.



Фигура 38. Експресија ИЛ-17 у здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца, у односу на лимфну, васкуларну, перинеуралну инвазију, некрозу и дезмопластичну реакцију. Анализа обухвата 60 испитаника са интестиналном формом карцинома желуца. Пацијенти су подељени према присуству/одсуству лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, некрозе као и дезмопластичној реакцији здраве слузнице интестиналног типа карцинома желуца. Не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група. Статистичка значајност је тестирана χ^2 тестом.

4.3. Анализа експресије IL-8 у туморском, перитуморском и здравом ткиву око интестиналног типа карцинома желуца

Анализирана је и експресија IL-8 у туморском, перитуморском и околном здравом ткиву карцинома желуца. Није забележена статистички значајна разлика у експресији овог цитокина ($p > 0.05$; резултати нису приказани). У наставку истраживања су оболели од интестиналног типа карцинома желуца подељени на групе, на основу TNM стадијума болести, хистолошког и нуклеарног градуса, присуства/одсуства лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, некрозе, као и степена дезмоплазије. Анализа експресије IL-8 није указала на постојање статистички значајне разлике у експресији у туморском, перитуморском, односно околном здравом ткиву, између дефинисаних група ($p > 0.05$; резултати нису приказани).

5. ДИСКУСИЈА

У овој студији испитивана је повезаност вредности експресије цитокина IL-32 и IL-17 са стадијумом болести, клиничко-патолошким карактеристикама и ангиогенезом, код оболелих од карцинома желуца, као и разлике у експресији IL-32, IL-17, IL-8, VEGF-а и микроваскуларне густине у различитим патохистолошким типовима карцинома желуца.

Показали смо да постоји статистички значајна разлика у расподели према полу и узрасту испитаника, у односу на тип тумора. Болесници са дијагностикованим интестиналним типом карцинома желуца су знатно старији у односу на пацијенте код којих је дијагностикован дифузни тип тумора. Такође је утврђено да је карцином желуца чешћи код мушкараца у односу на жене, као и да се ова болест чешће јавља у старијој животној доби.

Показан је већи TNM стадијум болести, нуклеарни и хистолошки градус код оболелих од дифузног типа карцинома желуца, у односу на интестинални тип, што указује на тежу и агресивнију форму болести.

Показали смо значајно мању експресију интерлеукина 32 у ткиву дифузног типа карцином желуца, а повишена експресија овог цитокина је у негативној корелацији са тежом формом овог типа тумора. Болесници са дифузним типом карцинома желуца имају мање изражену микроваскуларну густину, као и експресију интерлеукина 17 у односу на болеснике са интестиналним типом.

Такође смо показали значајно већу експресију IL-32 у туморском ткиву, у односу на перитуморско ткиво код болесника са интестиналним типом карцинома желуца. Експресија IL-32 је значајно већа код испитаника са верификованом инвазијом лимфних судова. Микроваскуларна густина је значајно већа у туморском ткиву, код оболелих са присутном лимфном инвазијом и узнапредовалом формом болести, тј. TNM стадијумима III+IV оболелих од интестиналног типа карцинома желуца. Такође је утврђено и да је експресија фактора раста васкуларног ендотела (VEGF) значајно већа у туморском у односу на перитуморско ткиво код интестиналног типа тумора. VEGF се више експримира у туморском ткиву испитаника са узнапредовалим TNM стадијумом болести и присутном лимфном инвазијом. Значајно већа експресија IL-17 детектована је у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на перитуморско и здраво ткиво. Нарочито је то изражено у туморском ткиву у којем су верификована поља некрозе.

Карцином желуца је један од најчешће дијагностикованих малигнитета, а трећи узрок смрти услед карцинома код људи (2). Око 90% свих карцинома желуца су аденокарциноми, настали из жлезда слузнице желуца (134). Према Lauren- овој класификацији као и подели Светске здравствене организације, постоје два главна хистолошка типа карцинома желуца: интестинални и дифузни (133,136). Интестинални тип карцинома је чешћи код старијих мушкараца. Карактерише га мање агресивна болест, са нижим TNM стадијумом и мањим ризиком од метастаза у лимфним чворовима (372). Инфекција *Helicobacter-om pylori*, као и хронични гастритис индукован *Helicobacter-om pylori*, атрофија и интестинална метаплазија, стил живота и исхрана представљају главне факторе ризика за развој интестиналног типа карцинома желуца (115). Насупрот томе, дифузни тип овог тумора је чешће последица генетских мутација (373). Интестинални тип карцинома желуца се састоји од тубуларних или жлезданих формација метапластичних ћелија, док се слабо диферентовани дифузни тип тумора обично састоји од ћелија које не формирају жлездане структуре, ћелија печатног прстена и муцина (58,374). Наши

результати су показали да је дифузни облик карцинома чешћи код млађих жена, док је интестинални облик карцинома желуца био чешћи код пацијената мушког пола старије животне доби (Табела 1). Штавише, вредности TNM стадијума болести, нуклеарног и хистолошког градуса јасно указују на то да је дифузни тип карцинома тежа форма од интестиналног типа (Табела 1). Ови резултати су у складу са ранијим истраживањима која показују да се интестинални тип карцинома желуца најчешће јавља код старијих мушких пацијената и карактерише га дужи ток болести и боља прогноза, док је дифузни тип често повезан са млађим узрастом, претежно је присутан код млађих жена и има лошију прогнозу (19,375).

У наставку истраживања анализирана је потенцијална биолошка улога IL-32 у разлици у тежини болести између дифузног типа карцинома желуца и интестиналног типа. Анализирали смо експресију IL-32 у туморском ткиву. Наиме, испитивали смо да ли се и како експресија IL-32 разликује између два патохистолошка типа карцинома желуца. Добијени резултати указују на мању експресију IL-32 у туморском ткиву оболелих од дифузног типа карцинома желуца. Резултати су показали да је већина пацијената са дифузним типом карцинома желуца имала скор експресије 4 или мање, док је већина пацијената са интестиналним типом тумора имала скор експресије 4 или више (Фигура 4а). Штавише, Spearman-ов тест корелације показао је да је већа експресија IL-32 у негативној корелацији са тежим формама дифузног типа карцинома желуца. Ранија истраживања су показала да је системска концентрација IL-32 значајно повећана код оболелих од карцинома желуца у поређењу са здравом контролом (208). Ishigami и сар. показали су да су инвазивнији раст примарног тумора и присуство метастаза у лимфним чворовима, као и лимфна и венска инвазија чешћи код пацијената са IL-32-позитивним карциномом желуца (206). Раније истраживање је такође потврдило да је експресија IL-32 код болесника са карциномом желуца у позитивној корелацији са лошом прогнозом. Штавише, IL-32 промовишући производњу металопротеиназа MMP2, MMP9, цитокина IL-8 и фактора ангиогенезе VEGF олакшава инвазију као и миграцију туморских ћелија (228). Интересантно, сви наведени подаци односе се на интестинални тип карцинома желуца.

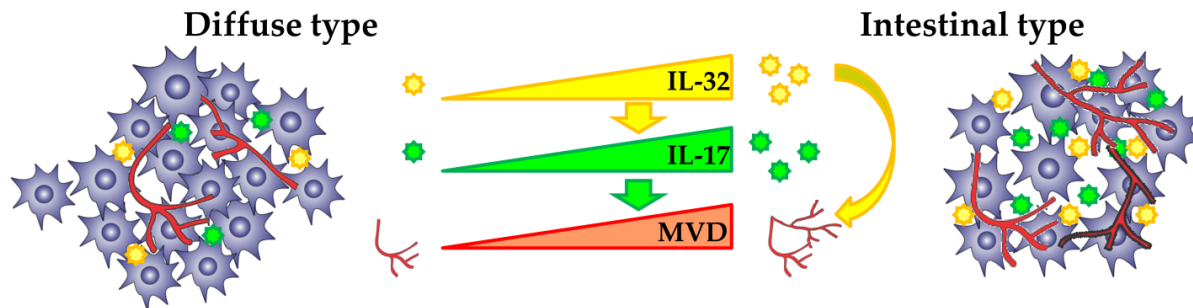
Степен микроваскуларне густине у тумору данас се процењује експресијом маркера CD31. Молекул адхезије тромбоцита/ендотелних ћелија- 1 (енгл. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1; PECAM - 1) или CD31 је мултифункционални молекул укључен у различите процесе као што су биологија тромбоцита, трансдукција сигнала, транс-ендотелна миграција леукоцита и инфламација, као и биологија ендотелних ћелија (376). Молекул CD31 игра значајну улогу у биологији тумора на неколико начина. Овај молекул представља једну од распрострањених веза лоцираних дубоко између ендотелних ћелија дајући тако интегритет ендотелној мембрани и регулишући миграцију леукоцита и васкуларну пропустљивост (377). Наши резултати показују значајно мање изражену микроваскуларну густину (енг. MVD, *microvascular density*) у туморском ткиву дифузног типа карцинома желуца у односу на интестинални тип тумора (Фигура 6а). Претходна истраживања указују да интестинални облик карцинома желуца прогредира доминантно у јетру директним хематогеним путем, док је дифузни тип тумора желуца инвазивнији и „даје“ метастатске лезије директно у перитонеум. Разлог за овај различити начин ширења тумора је чињеница да интестинални облик тумора више зависи од ангиогенезе у поређењу са дифузним облицима тумора (284). У складу с наведеним налазима наши резултати показују да мања микроваскуларна густина указује на мањи степен ангиогенезе у дифузном типу у поређењу са интестиналним типом карцинома желуца.

Како разлог за ову значајну разлику у микроваскуларној густини може бити присуство или одсуство различитих про/анти ангиогених маркера, у наставку нашег истраживања фокусирали смо се на анализу експресије ових фактора у дифузном и интестиналном типу карцинома желуца. Прво смо анализирали експресију једног од најмоћнијих проангиогених фактора- фактор раста васкуларног ендотела (VEGF). VEGF је ендотелни ћелијски специфичан митоген значајан за преживљавање, пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија (227,350). Главни извори овог фактора су различити типови ћелија, као што су туморске ћелије, макрофаги или тромбоцити (334). Значајно повећана експресија VEGF игра важну улогу у патогенези канцера, пролиферацији туморских ћелија и развоју метастатских лезија (227,378). Међутим, ми нисмо нашли статистички значајну разлику у експресији VEGF-а у дифузном и интестиналном типу карцинома желуца (Фигура 8). Овај резултат указује на то да разлика у микроваскуларној густини између дифузног и интестиналног типа карцинома желуца није узрокована VEGF-ом.

IL-17 је цитокин који превасходно продукују Th17 лимфоцити, иако други типови ћелија, као што су $\gamma\delta$ Т лимфоцити и урођене лимфоидне ћелије типа 3 могу такође бити важан извор овог цитокина (247). Ранија истраживања су показала да се IL-17 значајно експримиран у различитим типовима тумора и да његова концентрација позитивно корелира са експресијом VEGF-а у туморима (253). Штавише, Iida и сарадници су показали да испитаници код којих је у инфилтратима у карциному желуца повећан број Th17 лимфоцита са повећаном експресијом mRNA за IL-17 и IL-23, имају инвазивнији облик тумора (370). Наша анализа експресије IL-17 у ткиву карцинома желуца показала је да оболели од дифузног типа тумора имају значајно нижу експресију овог цитокина у поређењу са оболелима од интестиналног типа тумора (Фигура 8). Овај резултат је у складу са претходним студијама које сугеришу да IL-17 игра важну проангиогену улогу (251). Значајно нижа експресија IL-17 и непостојање разлике у експресији VEGF-а указују на то да смањени IL-17 може проузроковати смањење ангиогенезе и последично микроваскуларне густине, у дифузном типу карцинома желуца.

Према приказаним резултатима закључује се да смањена експресија IL-32 може да инхибира продукцију проинфламацијског и проангиогеног фактора IL-17 и на тај начин спречи стварање нових крвних судова, што за последицу има смањени хематогени метастатски потенцијал дифузног типа карцинома желуца (Фигура 39).

IL-32 је цитокин познат по својим важним биолошким функцијама. Као проинфлацијски медијатор, IL-32 индукује производњу различитих хемокина и проинфламацијских цитокина, укључујући IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 и макрофагни инфламацијски протеин-2 (енгл. Macrophage inflammatory protein 2; MIP-2) и активацију сигналних путева p38 митогеном активирани протеинске киназе (MAPK), нуклеарни фактор κ B (NF- κ B) и активациони протеин-1 (AP-1) (27). IL-32 игра улогу у настанку и прогресији карцинома желуца. У овој студији анализирали смо обрасце експресије IL-32 у тумору, перитуморском и здравом ткиву.



Фигура 39. Шематски дијаграм који описује механизам одговоран за супресију ангиогенезе посредоване ИЛ-32 код дифузног типа карцинома желуца. ИЛ-32 директно и индиректно, сузбијањем ИЛ-17, смањује ангиогенезу и последичну микроваскуларну густину, што заузврат смањује хематогене метастазе дифузног типа карцинома желуца.

Пронашли смо значајно већу експресију ИЛ-32 у туморском ткиву у поређењу са перитуморским ткивом (Фигура 13). Штавише, експресија ИЛ-32 у туморском ткиву била је значајно већа код оболелих са прогресивним карциномом желуца (детектована инвазија лимфних судова, Фигура 13). Приказани резултати су у складу са претходним истраживањима која су показала да је ниво ИЛ-32 већи у серуму болесника са карциномом желуца (210,225) и да је ИЛ-32 повезан са развојем карцинома желуца насталог на подлози инфекције *Helicobacter-om pylori* (209). Дobili смо позитивну корелацију између експресије ИЛ-32 у туморском ткиву и тежине болести (инвазија лимфних судова), што указује на про-туморогену улогу ИЛ-32.

Познато је да ИЛ-32 олакшава ангиогенезу индукцијом продукције матриксних металопротеиназа и VEGF-а, чиме се олакшава инвазија и миграција туморских ћелија (228). На основу претходно наведеног, даље истраживање је било фокусирано на анализе микроваскуларне густине, проангиогених и проинфламацијских солубилних молекула у тумору, перитуморском и околном здравом ткиву карцинома желуца. CD31 је један од најупотребљиваних маркера за детекцију микроваскуларне густине. Анализом експресије маркера крвних судова CD31 пронашли смо повећану MVD у туморском ткиву у поређењу са перитуморским ткивом (Фигура 20). Поред тога, MVD је значајно већа код пацијената са тешком (TNM стадијумима III и IV) и прогресивном болести (инвазија лимфних судова, Фигура 20). MVD може бити један од важних прогностичких фактора код пацијената са карциномом желуца и вредност MVD као и присуство метастаза у лимфним чворовима представљају независне прогностичке факторе (379).

Анализа експресије VEGF-а показала је већу експресију у туморском ткиву у поређењу са перитуморским ткивом оболелих од карцинома желуца (Фигура 26), као и интензивнију експресију код пацијената са тешком (TNM стадијумима III и IV) и прогресивнијом болести (инвазија лимфних судова, Фигура 26). У складу са овим налазом, код оболелих од аденокарцинома плућа, тумори са детектабилним метастазама у лимфним чворовима су повезани са високом експресијом mRNA за VEGF-A, VEGF-B и VEGF-C (36). Експресија VEGF-а је у позитивној корелацији са прогресијом карцинома желуца (TNM стадијумом, величином тумора, позитивним лимфним чворовима и лимфоваскуларном инвазијом) (350).

Како је познато да IL-32 промовише ангиогенезу и запаљење, наша даља испитивања била су усредсређена на анализе проангиогеног и проинфламацијског цитокина IL-17 у тумору, перитуморском и околном здравом ткиву карцинома желуца. Забележена је значајно већа експресија IL-17 у туморском ткиву у односу на перитуморско ткиво (Фигура 32). Интересантно је да смо нашли повећану експресију IL-17 у туморском ткиву оболелих са детектабилним некротичким пољима (Фигура 32). Само неколико студија је испитивало IL-17 у карциному желуца, углавном описујући IL-17 као промотор прогресије карцинома (239,242).

Селективни процес метастазирања захтева активну унакрсну повезаност између туморских ћелија и перитуморског ткива, која је посредована директним контактом туморских и стромалних ћелија или паракриним сигнаlima цитокинима и факторима раста (380). Перитуморско окружење треба у потпуности узети у обзир приликом разматрања процеса прогресије тумора. Због тога је наш циљ био да се процени експресија IL-32, VEGF, IL-17, IL-8 и MVD у перитуморском ткиву. Пронашли смо нижу експресију IL-32, VEGF и IL-17, као и смањену микроваскуларну густину у ткиву које окружује тумор у поређењу са туморским ткивом. Већина истраживања се фокусира на интратуморску средину, а потенцијална улога ангиогенезе и имуномодулације у перитуморском окружењу остаје нејасна. Према нашем сазнању, ово је прва студија која испитује експресију IL-32 у перитуморском ткиву у било којој локализацији тумора. У складу са нашим резултатима, анализа тумора и перитуморског ткива очних капака показала је значајно већу експресију VEGF-а као и већу микроваскуларну густину у туморском ткиву (347). Занимљиво је да је скорашња студија показала значајно већу експресију VEGF-а у перитуморском ткиву хепатоцелуларног карцинома (381), супротно нашим резултатима. У другој студији експресија IL-17 у перитуморском ткиву одговара значајно нижем укупном преживљавању и може представљати независан прогностички фактор код оболелих од интрахепатичног холангиокарцинома (245).

6. ЗАКЉУЧЦИ

Резултати приказани у овом раду по први пут указују да смањена локална експресија IL-32, код оболелих од дифузног типа карциномом желуца, са вишим нуклеарним градусом, слабом диферентованошћу туморског ткива и узнатредовалим TNM стадијумом болести, може представљати знак малигне прогресије тумора и, последично, лоше прогнозе за болеснике. Овај налаз са новог становишта указује на улогу IL-32 у биологији дифузног типа карцинома желуца.

Повећана локална експресија IL-32 код оболелих од интестиналног типа карцинома желуца са детектабилном инвазијом лимфних судова може се сматрати знаком малигне прогресије тумора и, сходно томе, лоше прогнозе за оболеле. Повећана експресија IL-32, као и VEGF-а и микроваскуларне густине код тешких и узнатредовалих форми карцинома желуца, могу указивати на протуморогену и проангиогену улогу IL-32 у интестиналном типу карцинома желуца. Ова запажања указују на могућу фацилитирајућу улогу IL-32 у биологији интестиналног типа карцинома желуца и његову потенцијалну употребу као терапеутске мете.

Закључак је изведен на основу следећих доказа:

1. Тежа и агресивнија форма болести (већи TNM стадијум болести, нуклеарни и хистолошки градус) детектована је код оболелих од дифузног типа карцинома желуца, у односу на интестинални тип;
2. Оболели од дифузног типа карцинома желуца имају мању експресију IL-32 у односу на оболеле од интестиналног типа, док повишена експресија овог цитокина негативно корелира са тежом формом овог типа тумора;
3. Мања микроваскуларна густина у туморском ткиву оболелих од дифузног типа карцинома желуца;
4. Мања експресија интерлеукина 17 у туморском ткиву оболелих од дифузног типа карцинома желуца;
5. Нема значајне разлике у експресији VEGF-а између оболелих од дифузног и интестиналног типа карцинома желуца;
6. Значајно већа експресију IL-32 у туморском ткиву, у односу на перитуморско ткиво код болесника са интестиналним типом карцинома желуца, која позитивно корелира са инвазијом лимфних судова;
7. Микроваскуларна густина је значајно већа у туморском ткиву, код оболелих од интестиналног типа карцинома желуца са присутном лимфном инвазијом и узнатредовалом формом болести;
8. Експресија VEGF-а значајно је већа у туморском у односу на перитуморско ткиво интестиналног типа тумора, као и у туморском ткиву оболелих са узнатредовалим TNM стадијумом болести и присутном инвазијом лимфних судова;
9. Значајно већа експресија IL-17 у туморском ткиву интестиналног типа карцинома желуца, у односу на перитумор, посебно изражено у туморском ткиву са детектованим пољима некрозе.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

GC	енгл. Gastric cancer
GERD	енгл. Gastroesophageal reflux disease
GLOBOCAN	енгл. The Global Cancer Observatory
CDH1	енгл. cadherin 1 gene
CTNNA1	енгл. catenin alpha 1 gene
TP53	енгл. tumor protein p53
APC	енгл. Adenomatous polyposis coli, фамилијарна аденоматозна полипоза
STK11	енгл. serine/threonine kinase 11
CagA	енгл. cytotoxin-associated gene A
EPIC	енгл. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
MNNG	енгл. Methylnitrosoguanidine
NSAIL	Нестероидни антиинфламацијски лекови
WHO	енгл. World Health Organisation, Светска здравствена организација
SLE	енгл. siaryl Lewis X antigen
BCA-225	енгл. human breast carcinoma associated glycoprotein
hCG	енгл. Human chorion gonadotropine, humani horionski gonadotropin
IL-32	енгл. Interleukin – 32, интерлеукин - 32
NK	енгл. Natural Killer
PBMCs	енгл. Peripheral blood mononuclear cells
HUVEC	енгл. Human umbilical vein endothelial cell
EC	енгл. Endothelial Cell
HIV	енгл. human immunodeficiency virus
TNFα	енгл. tumor necrosis factor alpha, фактор некрозе тумора алфа
Con A	енгл. Concanavalin A
LPS	енгл. Lipopolysaccharides
MAPK	енгл. mitogen-activated protein kinase
NF-κB	енгл. Nuclear Factor Kappa B
DAPK-1	енгл. Death-associated protein kinase 1
ERK1/2	енгл. extracellular signal-regulated kinases
PI3K/AKT	енгл. Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B
COPD	Енгл. Chronic obstructive pulmonary disease
GM-CSF	гранулоцитно-моноцитни фактор стимулације раста
HBE	Енгл. Human bronchial epithelial cell
JNK	енгл. c-Jun N-terminal kinase
cAMP	енгл. Cyclic adenosine monophosphate
IFN-γ	енгл. Interferon gamma
VEGF	енгл. Vascular endothelial growth factor
HNSCC	енгл. Head and neck squamous cell carcinoma
STAT3	енгл. Signal transducer and activator of transcription 3
HIF-1α	енгл. Hypoxia-inducible factor 1 α , фактор хипоксије 1 α
HCC	енгл. Hepatocellular carcinoma
EMT	енгл. epithelial–mesenchymal transition

CML	енгл. chronic myeloid leukemia
ULBP2	енгл. UL16 binding protein 2
CTL	енгл. Cytotoxic T lymphocyte, цитотоксични Т лимфоцит
SNP	Енгл. Single nucleotide polymorphysm
TAMc	енгл. макрофаги повезани са тумором
MDSC	енгл. мијелоидне супресорске ћелије
Treg	регулаторни Т лимфоцити
CCL	С-С мотивом лиганда хемокина
IL-1	енгл. Interleukin – 1, интерлеукин - 1
IL-6	енгл. Interleukin – 6, интерлеукин - 6
IL-8	енгл. Interleukin – 8, интерлеукин - 8
CXCL1	енгл. chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 1
MMP	енгл. matrix metalloproteinase
IL-17	енгл. Interleukin – 17, интерлеукин - 17
Th17	енгл. T helper, помагачки Т лимфоцити 17
ILC3	енгл. Type 3 innate lymphoid cells, урођене лимфоидне ћелије групе 3
DCs	енгл. Dendritic cells, дендритичне ћелије
G-CSF	енгл. Granulocyte colony-stimulating factor, фактора стимулације раста гранулоцита
CTLA4	енгл. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
HMVEC	енгл. Human Microvascular Endothelial Cell
bFGF	енгл. basic fibroblast growth factor, FGF- β
HGF	енгл. Hepatocyte growth factor, фактор раста хепатоцита
CXCL8	енгл. C-X-C Motif Chemokine Ligand 8
AP-1	енгл. Activator protein 1
CRC	енгл. Colorectal cancer
CAM	енгл. Chorioallantoic Membrane
mTOR	енгл. mammalian target of rapamycin
IGF-1	енгл. фактор раста сличан инсулину 1
PDGF	енгл. тромбоцитни фактор раста
EGF	енгл. епидермални фактор раста
ЕРС	енгл. ендотелне ћелије прогенитори
ECM	енгл. Extracellular Matrix
PD -ECGF	ендотелни фактор раста ендотелног порекла
MCP-1	моноцитни хемоатрактантни протеин-1
MIP-1 α	запаљенски протеин макрофага-1 α
TAM	тумор-асоцирани макрофаги
MVD	енгл. Microvessel density, микроваскуларна густина
AJCC	енгл. American Joint Committee on Cancer
UICC	енгл. The Union for International Cancer Control
UK NEQAS	енгл. UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394–424.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019 15;144(8):1941–53.
3. Khazaei Z, Jarrahi AM, Momenabadi V, Ghorat F, Adineh HA, Sohrabivafa M, et al. GLOBAL CANCER STATISTICS 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide stomach cancers and their relationship with the human development index (hdi). 2018;9.
4. Kolonel LN, Hankin JH, Nomura AM. Multiethnic studies of diet, nutrition, and cancer in Hawaii. *Princess Takamatsu Symp.* 1985;16:29–40.
5. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, Martel C de. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer.* 2015;136(2):487–90.
6. Ahn HJ, Lee DS. *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. Vol. 7. 2015. 455–65 p.
7. Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev.* 1986;8:1–27.
8. Cavatorta O, Scida S, Miraglia C, Barchi A, Nouvenne A, Leandro G, et al. Epidemiology of gastric cancer and risk factors. *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 2018 Dec;89(8-S):82–87.
9. Ang TL, Fock KM. Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore Med J.* 2014 Dec;55(12):621–8.
10. Balakrishnan M, George R, Sharma A, Graham DY. Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World. *Curr Gastroenterol Rep.* 2017 Aug;19(8):36.
11. Martel C de, Parsonnet J. *Stomach Cancer. Cancer Epidemiology and Prevention.* Oxford University Press.
12. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jan;62(1):10–29.
13. Eto K, Ida S, Watanabe M, Baba H. Treatment strategy for metastatic gastric cancer in Japan. *J Cancer Metastasis Treat.* 2018 May 16;4(5):23.
14. Hamashima C. Cancer screening guidelines and policy making: 15 years of experience in cancer screening guideline development in Japan. *Jpn J Clin Oncol.* 2018 Mar;48(3):278–286.

15. Hamashima C, Fukao A. Quality assurance manual of endoscopic screening for gastric cancer in Japanese communities. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 Nov;46(11):1053–1061.
16. Camargo MC, Anderson WF, King JB, Correa P, Thomas CC, Rosenberg PS, et al. Divergent trends for gastric cancer incidence by anatomical subsite in US adults. *Gut*. 2011 Dec;60(12):1644–9.
17. Anderson WF, Camargo MC, Fraumeni JF, Correa P, Rosenberg PS, Rabkin CS. Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults. *JAMA*. 2010 May 5;303(17):1723–8.
18. Milano AF. 20-Year Comparative Survival and Mortality of Cancer of the Stomach by Age, Sex, Race, Stage, Grade, Cohort Entry Time-Period, Disease Duration & Selected ICD-O-3 Oncologic Phenotypes: A Systematic Review of 157,258 Cases for Diagnosis Years 1973-2014: (SEER*Stat 8.3.4). *J Insur Med N Y N*. 2019;48(1):5–23.
19. Figueiredo C, Costa S, Karameris A, Machado JC. Pathogenesis of Gastric Cancer. *Helicobacter*. 2015 Sep;20:30–35.
20. Hamashima C, Ogoshi K, Okamoto M, Shabana M, Kishimoto T, Fukao A. A Community-Based, Case-Control Study Evaluating Mortality Reduction from Gastric Cancer by Endoscopic Screening in Japan. Lee J-S, editor. *PLoS ONE*. 2013 Nov;8(11):e79088.
21. Ferro A, Peleteiro B, Malvezzi M, Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, et al. Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980-2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2014 May;50(7):1330–44.
22. Hamashima C, Shabana M, Okada K, Okamoto M, Osaki Y. Mortality reduction from gastric cancer by endoscopic and radiographic screening. *Cancer Sci*. 2015 Dec;106(12):1744–1749.
23. Gaddy JA, Radin JN, Loh JT, Zhang F, Kay Washington M, Peek RM, et al. High dietary salt intake exacerbates *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis. Vol. 81. 2013. 2258–2267 p.
24. Garza-González E, Pérez-Pérez GI. Relevance of Host Factors in Gastric Cancer Associated with *Helicobacter Pylori*. *Gastric Carcinoma - New Insights Curr Manag [Internet]*. 2013 Jan 23 .
25. De Mello RA. Gastric Cancer in Southern Europe: High-Risk Disease. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2017;37:261–266.
26. Ferro A, Rosato V, Rota M, Costa AR, Morais S, Pelucchi C, et al. Meat intake and risk of gastric cancer in the Stomach cancer Pooling (StoP) project. *Int J Cancer*. 2020;147(1):45–55.
27. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2007 Aug;133(2):659–72.

28. Díaz P, Valenzuela Valderrama M, Bravo J, Quest AFG. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. Vol. 9. 2018.
29. Adamsson J, Lundin SB, Hansson L-E, Sjövall H, Svennerholm A-M. Immune Responses Against Helicobacter pylori in Gastric Cancer Patients and in Risk Groups for Gastric Cancer. Helicobacter. 2013 Feb;18(1):73–82.
30. Kivrak Salim D, Sahin M, Köksoy S, Adanir H, Süleymanlar I. Local Immune Response in Helicobacter pylori Infection: Medicine (Baltimore). 2016 May;95(20):e3713.
31. Lee Y-C, Chiang T-H, Chou C-K, Tu Y-K, Liao W-C, Wu M-S, et al. Association Between Helicobacter pylori Eradication and Gastric Cancer Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. Gastroenterology. 2016 May;150(5):1113-1124.e5.
32. Li TH, Qin Y, Sham PC, Lau KS, Chu KM, Leung WK. Alterations in Gastric Microbiota After H. Pylori Eradication and in Different Histological Stages of Gastric Carcinogenesis. Sci Rep. 2017 Mar 21;7:44935.
33. Tsukamoto T, Nakagawa M, Kiriya Y, Toyoda T, Cao X. Prevention of Gastric Cancer: Eradication of Helicobacter Pylori and Beyond. Int J Mol Sci. 2017 Aug 3;18(8):1699.
34. Chen X-Z, Chen H, Castro FA, Hu J-K, Brenner H. Epstein–Barr Virus Infection and Gastric Cancer. Medicine (Baltimore). 2015 May;94(20):e792.
35. Cho J, Kang M-S, Kim K-M. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response. J Gastric Cancer. 2016;16(1):1.
36. Jácome AA dos A, de Lima EM, Kazzi AI, Chaves GF, de Mendonça DC, Maciel MM, et al. Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: a distinct molecular subtype of the disease? Rev Soc Bras Med Trop. 2016 Apr;49(2):150–157.
37. van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, Guilford P, Huntsman D, Hoogerbrugge N, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. J Med Genet. 2015 Jun;52(6):361–374.
38. Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M, Nuorva K, Hautala E, Jarvinen HJ, et al. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. Gut. 2007 Jul;56(7):926–933.
39. Zang ZJ, Cutcutache I, Poon SL, Zhang SL, McPherson JR, Tao J, et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. Nat Genet. 2012 May;44(5):570–574.
40. Corso G, Velho S, Paredes J, Pedrazzani C, Martins D, Milanezi F, et al. Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. Eur J Cancer. 2011 Feb;47(3):443–451.

41. Lin Y, Wu Z, Guo W, Li J. Gene mutations in gastric cancer: a review of recent next-generation sequencing studies. *Tumour Biol.* 2015;36(36):7385–94.
42. Pan X, Ji X, Zhang R, Zhou Z, Zhong Y, Peng W, et al. Landscape of somatic mutations in gastric cancer assessed using next-generation sequencing analysis. *Oncol Lett.* 2018 Oct;16(4):4863–4870.
43. Harada K, Baba H, Ajani JA. Recent trend in gastric cancer treatment in the USA. *J Cancer Metastasis Treat.* 2018 Apr 26;4(4):18.
44. Kamiya S, Rouvelas I, Lindblad M, Nilsson M. Current trends in gastric cancer treatment in Europe. *J Cancer Metastasis Treat.* 2018 Jul 17;4(7):35.
45. Kohno Y, Yamamoto H, Hirahashi M, Kumagae Y, Nakamura M, Oki E, et al. Reduced MUTYH, MTH1, and OGG1 expression and TP53 mutation in diffuse-type adenocarcinoma of gastric cardia. *Hum Pathol.* 2016 Jun;52:145–152.
46. Yatagai N, Saito T, Akazawa Y, Hayashi T, Yanai Y, Tsuyama S, et al. TP53 inactivation and expression of methylation-associated proteins in gastric adenocarcinoma with enteroblastic differentiation. *Virchows Arch.* 2019 Mar;474(3):315–324.
47. Pallocca M, Goeman F, De Nicola F, Melucci E, Sperati F, Terrenato I, et al. Coexisting YAP expression and TP53 missense mutations delineates a molecular scenario unexpectedly associated with better survival outcomes in advanced gastric cancer. *J Transl Med.* 2018 Dec;16(1):247.
48. Carrasco-Garcia E, García-Puga M, Arevalo S, Matheu A. Towards precision medicine: linking genetic and cellular heterogeneity in gastric cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2018;10:1758835918794628.
49. Asada K, Ando T, Niwa T, Nanjo S, Watanabe N, Okochi-Takada E, et al. FHL1 on chromosome X is a single-hit gastrointestinal tumor-suppressor gene and contributes to the formation of an epigenetic field defect. *Oncogene.* 2013 Apr;32(17):2140–2149.
50. Guggenheim DE, Shah MA. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Surg Oncol.* 2013 Mar;107(3):230–236.
51. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 May;23(5):700–713.
52. Lahmidani N, El Yousf M, Aqodad N, Benajah DA, El Abkari M, Ibrahim A, et al. Update on Gastric Cancer Epidemiology and Risk Factors. *J Cancer Ther.* 2018;09(03):242–54.
53. Park J, Forman D, Waskito L, Yamaoka Y, Crabtree J. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-Positive Infections and Global Variations in Gastric Cancer. *Toxins.* 2018 Apr;10(4):163.

54. Ding S-Z, Zheng P-Y. Helicobacter pylori infection induced gastric cancer; advance in gastric stem cell research and the remaining challenges. *Gut Pathog.* 2012;4(1):18.
55. Maccormick TM, Carvalho CES, Bravo Neto GP, Carvalho M da G da C, Maccormick TM, Carvalho CES, et al. Análise comparativa do polimorfismo genético da glutathione transferase, do Helicobacter pylori e do vírus Epstein-Barr entre a área do tumor e as margens de ressecção proximal e distal do câncer gástrico. *Rev Colégio Bras Cir.* 2019 Jan;46(1).
56. Corso G, Seruca R, Roviello F. Gastric cancer carcinogenesis and tumor progression. *Vol. 83.* 2012. 172–176 p.
57. Ohba R, Iijima K. Pathogenesis and risk factors for gastric cancer after Helicobacter pylori eradication. *World J Gastrointest Oncol.* 2016 Sep 15;8(9):663-72.
58. Altieri F, Arcari P, Ripa E. Gastric Cancer: Molecular Pathology State. *Curr Top Gastritis - 2012.* 2013 Jan 16;
59. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Oct;23(4):713–39.
60. Fuccio L, Zagari RM, Eusebi LH, Laterza L, Cennamo V, Ceroni L, et al. Meta-analysis: can Helicobacter pylori eradication treatment reduce the risk for gastric cancer? *Ann Intern Med.* 2009 Jul 21;151(2):121–8.
61. Ford AC, Forman D, Hunt RH, Yuan Y, Moayyedi P. Helicobacter pylori eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2014 May 20;348:g3174.
62. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 2017;153(2):420–9.
63. González CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2003 Nov 20;107(4):629–34.
64. Koizumi Y, Tsubono Y, Nakaya N, Kuriyama S, Shibuya D, Matsuoka H, et al. Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Int J Cancer.* 2004 Dec 20;112(6):1049–55.
65. Minami Y, Kanemura S, Oikawa T, Suzuki S, Hasegawa Y, Miura K, et al. Associations of cigarette smoking and alcohol drinking with stomach cancer survival: A prospective patient cohort study in Japan. *Int J Cancer.* 2018 01;143(5):1072–85.
66. Hama H, Tabuchi T, Ito Y, Fukushima W, Matsunaga I, Miyashiro I, et al. [Smoking behavior and participation in screening for lung, gastric, and colorectal cancers]. *Nihon Koshu Eisei Zasshi Jpn J Public Health.* 2016;63(3):126–34.

67. Butt J, Varga MG, Wang T, Tsugane S, Shimazu T, Zheng W, et al. Smoking, Helicobacter Pylori Serology, and Gastric Cancer Risk in Prospective Studies from China, Japan, and Korea. *Cancer Prev Res Phila Pa.* 2019;12(10):667–74.
68. Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S, Japan Public Health Center Study Group. Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. *Int J Cancer.* 2002 Oct 20;101(6):560–6.
69. Camargo MC, Koriyama C, Matsuo K, Kim W-H, Herrera-Goepfert R, Liao LM, et al. Case-case comparison of smoking and alcohol risk associations with Epstein-Barr virus-positive gastric cancer. *Int J Cancer.* 2014 Feb 15;134(4):948–53.
70. Han X, Xiao L, Yu Y, Chen Y, Shu H-H. Alcohol consumption and gastric cancer risk: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget.* 2017 Oct 10;8(47):83237–45.
71. Duell EJ, Travier N, Lujan-Barroso L, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault M-C, Morois S, et al. Alcohol consumption and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Am J Clin Nutr.* 2011 Nov;94(5):1266–75.
72. Buckland G, Travier N, Huerta JM, Bueno-de-Mesquita HBA, Siersema PD, Skeie G, et al. Healthy lifestyle index and risk of gastric adenocarcinoma in the EPIC cohort study. *Int J Cancer.* 2015 Aug 1;137(3):598–606.
73. Zaridze D, Borisova E, Maximovitch D, Chkhikvadze V. Alcohol consumption, smoking and risk of gastric cancer: case-control study from Moscow, Russia. *Cancer Causes Control CCC.* 2000 Apr;11(4):363–71.
74. Sjødahl K, Lu Y, Nilsen TIL, Ye W, Hveem K, Vatten L, et al. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer.* 2007 Jan 1;120(1):128–32.
75. Kim J, Park S, Nam B-H. Gastric cancer and salt preference: a population-based cohort study in Korea. *Am J Clin Nutr.* 2010 May 1;91(5):1289–93.
76. D’Elia L, Rossi G, Ippolito R, Cappuccio FP, Strazzullo P. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 2012 Aug;31(4):489–98.
77. Ito LS, Inoue M, Tajima K, Yamamura Y, Kodaera Y, Hirose K, et al. Dietary factors and the risk of gastric cancer among Japanese women: a comparison between the differentiated and non-differentiated subtypes. *Ann Epidemiol.* 2003 Jan;13(1):24–31.
78. Tsugane S, Akabane M, Inami T, Matsushima S, Ishibashi T, Ichinowatari Y, et al. Urinary salt excretion and stomach cancer mortality among four Japanese populations. *Cancer Causes Control CCC.* 1991 May;2(3):165–8.

79. Song JH, Kim YS, Heo NJ, Lim JH, Yang SY, Chung GE, et al. High Salt Intake Is Associated with Atrophic Gastritis with Intestinal Metaplasia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2017;26(7):1133–8.
80. D'Elia L, Galletti F, Strazzullo P. Dietary salt intake and risk of gastric cancer. *Cancer Treat Res*. 2014;159:83–95.
81. Goto A, Nishikawa J, Ito S, Hideura E, Shirasawa T, Hamabe K, et al. Estimation of salt intake from spot urine may assist the risk assessment of gastric cancer. *J Clin Biochem Nutr*. 2020 Jan;66(1):74–7.
82. Tatematsu M, Takahashi M, Hananouchi M, Shirai T, Hirose M. Protective effect of mucin on experimental gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine plus sodium chloride in rats. *Gan*. 1976 Apr;67(2):223–9.
83. Takahashi M, Hasegawa R. Enhancing effects of dietary salt on both initiation and promotion stages of rat gastric carcinogenesis. *Princess Takamatsu Symp*. 1985;16:169–82.
84. Nozaki K, Tsukamoto T, Tatematsu M. [Effect of high salt diet and *Helicobacter pylori* infection on gastric carcinogenesis]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med*. 2003 Jan;61(1):36–40.
85. Nozaki K, Shimizu N, Inada K, Tsukamoto T, Inoue M, Kumagai T, et al. Synergistic promoting effects of *Helicobacter pylori* infection and high-salt diet on gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Jpn J Cancer Res Gann*. 2002 Oct;93(10):1083–9.
86. Kobayashi J. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: A review. *Nitric Oxide Biol Chem*. 2018 28;73:66–73.
87. Holtrop G, Johnstone AM, Fyfe C, Gratz SW. Diet composition is associated with endogenous formation of N-nitroso compounds in obese men. *J Nutr*. 2012 Sep;142(9):1652–8.
88. Keszei AP, Goldbohm RA, Schouten LJ, Jakszyn P, van den Brandt PA. Dietary N-nitroso compounds, endogenous nitrosation, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. *Am J Clin Nutr*. 2013 Jan;97(1):135–46.
89. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol*. 2015 Dec 1;16(16):1599–600.
90. Cascella M, Bimonte S, Barbieri A, Del Vecchio V, Caliendo D, Schiavone V, et al. Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): an overview on the current state of knowledge. *Infect Agent Cancer*. 2018 Jan 15;13(1):3.
91. Kim SR, Kim K, Lee SA, Kwon SO, Lee J-K, Keum N, et al. Effect of Red, Processed, and White Meat Consumption on the Risk of Gastric Cancer: An Overall and Dose–Response Meta-Analysis. *Nutrients*;11(4).

92. Zhao Z, Yin Z, Zhao Q. Red and processed meat consumption and gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Feb 25;8(18):30563–75.
93. Song P, Lu M, Yin Q, Wu L, Zhang D, Fu B, et al. Red meat consumption and stomach cancer risk: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014 Jun;140(6):979–92.
94. González CA, Jakszyn P, Pera G, Agudo A, Bingham S, Palli D, et al. Meat intake and risk of stomach and esophageal adenocarcinoma within the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst*. 2006 Mar 1;98(5):345–54.
95. Bertuccio P, Alicandro G, Rota M, Pelucchi C, Bonzi R, Galeone C, et al. Citrus fruit intake and gastric cancer: The stomach cancer pooling (StoP) project consortium. *Int J Cancer*. 2019 15;144(12):2936–44.
96. González CA, Pera G, Agudo A, Bueno-de-Mesquita HB, Ceroti M, Boeing H, et al. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Int J Cancer*. 2006 May 15;118(10):2559–66.
97. Lunet N, Lacerda-Vieira A, Barros H. Fruit and vegetables consumption and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Nutr Cancer*. 2005;53(1):1–10.
98. Morrison MEW, Joseph JM, McCann SE, Tang L, Almohanna HM, Moysich KB. Cruciferous Vegetable Consumption and Stomach Cancer: A Case-Control Study. *Nutr Cancer*. 2020;72(1):52–61.
99. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Processed meat consumption and stomach cancer risk: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Aug 2;98(15):1078–87.
100. Ma J-L, Zhang L, Brown LM, Li J-Y, Shen L, Pan K-F, et al. Fifteen-year effects of *Helicobacter pylori*, garlic, and vitamin treatments on gastric cancer incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Mar 21;104(6):488–92.
101. Aditi A, Graham DY. Vitamin C, gastritis, and gastric disease: a historical review and update. *Dig Dis Sci*. 2012 Oct;57(10):2504–15.
102. Ferro A, Morais S, Rota M, Pelucchi C, Bertuccio P, Bonzi R, et al. Tobacco smoking and gastric cancer: meta-analyses of published data versus pooled analyses of individual participant data (StoP Project). *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 2018;27(3):197–204.
103. Chen S, Liu H, Li J, Yang G. Risk of Gastric and Colorectal Cancer After Tamoxifen Use for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Gastroenterol*. 2015 Sep;49(8):666–74.
104. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet Lond Engl*. 2015 Oct 3;386(10001):1341–52.

105. Moon CM, Kim S-H, Lee SK, Hyeon J, Koo JS, Lee S, et al. Chronic tamoxifen use is associated with a decreased risk of intestinal metaplasia in human gastric epithelium. *Dig Dis Sci*. 2014 Jun;59(6):1244–54.
106. Camargo MC, Goto Y, Zabaleta J, Morgan DR, Correa P, Rabkin CS. Sex hormones, hormonal interventions, and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2012 Jan;21(1):20–38.
107. Frise S, Kreiger N, Gallinger S, Tomlinson G, Cotterchio M. Menstrual and reproductive risk factors and risk for gastric adenocarcinoma in women: findings from the canadian national enhanced cancer surveillance system. *Ann Epidemiol*. 2006 Dec;16(12):908–16.
108. Nd F, Wh C, Yt G, Xo S, Bt J, G Y, et al. Menstrual and reproductive factors and gastric cancer risk in a large prospective study of women. Vol. 56, *Gut*. Gut; 2007
109. Brusselaers N, Lagergren J. Maintenance use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastrointestinal cancer in a nationwide population-based cohort study in Sweden. *BMJ Open*. 2018 07;8(7):e021869.
110. Ito H, Matsui H, Hirayama A, Indo HP, Majima HJ, Hyodo I. Reactive oxygen species induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs enhance the effects of photodynamic therapy in gastric cancer cells. *J Clin Biochem Nutr*. 2016 May;58(3):180–5.
111. Huang X-Z, Chen Y, Wu J, Zhang X, Wu C-C, Zhang C-Y, et al. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs use reduce gastric cancer risk: A dose-response meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Jan 17;8(3):4781–95.
112. Niikura R, Hirata Y, Hayakawa Y, Kawahara T, Yamada A, Koike K. Effect of aspirin use on gastric cancer incidence and survival: A systematic review and meta-analysis. *JGH Open Open Access J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Apr;4(2):117–25.
113. Qiao Y, Yang T, Gan Y, Li W, Wang C, Gong Y, et al. Associations between aspirin use and the risk of cancers: a meta-analysis of observational studies. *BMC Cancer*. 2018 13;18(1):288.
114. Joharatnam-Hogan N, Cafferty F, Hubner R, Swinson D, Sothi S, Gupta K, et al. Aspirin as an adjuvant treatment for cancer: feasibility results from the Add-Aspirin randomised trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(11):854–62.
115. Yusefi AR, Lankarani KB, Bastani P, Radinmanesh M, Kavosi Z. Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2018;19(3):591–603.
116. Abdi E, Latifi-Navid S, Zahri S, Yazdanbod A, Pourfarzi F. Risk factors predisposing to cardia gastric adenocarcinoma: Insights and new perspectives. *Cancer Med*. 2019;8(13):6114–26.

117. Anderson WF, Rabkin CS, Turner N, Fraumeni JF, Rosenberg PS, Camargo MC. The Changing Face of Noncardia Gastric Cancer Incidence Among US Non-Hispanic Whites. *J Natl Cancer Inst.* 2018 01;110(6):608–15.
118. Kim Y-J, Chung WC, Cho IH, Kim J, Kim S. Prognostic effect of different etiologies in patients with gastric cardia cancer. *Medicine (Baltimore).* 2019 Dec;98(50):e18397.
119. Brusselaers N, Wahlin K, Engstrand L, Lagergren J. Maintenance therapy with proton pump inhibitors and risk of gastric cancer: a nationwide population-based cohort study in Sweden. *BMJ Open.* 2017 Oct 30;7(10):e017739.
120. Lott PC, Carvajal-Carmona LG. Resolving of gastric cancer aetiology: an update in genetic predisposition. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018 Dec;3(12):874–83.
121. Daum O, Kokošková B, Švajdler M. [Morphology of the gastroesophageal reflux disease]. *Cesk Patol.* 2016;52(1):15–22.
122. Berger H, Marques MS, Zietlow R, Meyer TF, Machado JC, Figueiredo C. Gastric cancer pathogenesis. *Helicobacter.* 2016 Sep;21 Suppl 1:34–8.
123. Kim J-J. Epidemiology of Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma in Korea. *J Gastric Cancer.* 2018 Dec 1;18(4):328–38.
124. Chevally M, Bollschweiler E, Chandramohan SM, Schmidt T, Koch O, Demanzoni G, et al. Cancer of the gastroesophageal junction: a diagnosis, classification, and management review. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1434(1):132–8.
125. Colquhoun A, Arnold M, Ferlay J, Goodman KJ, Forman D, Soerjomataram I. Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. *Gut.* 2015 Dec;64(12):1881–8.
126. Holowatyj AN, Ulrich CM, Lewis MA. Racial/Ethnic Patterns of Young-Onset Noncardia Gastric Cancer. *Cancer Prev Res Phila Pa.* 2019;12(11):771–80.
127. Azer SA, Akhondi H. Gastritis. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020
128. Carabotti M, Esposito G, Lahner E, Pillozzi E, Conti L, Ranazzi G, et al. Gastroesophageal reflux symptoms and microscopic esophagitis in a cohort of consecutive patients affected by atrophic body gastritis: a pilot study. *Scand J Gastroenterol.* 2019 Jan;54(1):35–40.
129. Goodman MT, Mabuchi K, Morita M, Soda M, Ochikubo S, Fukuhara T, et al. Cancer incidence in Hiroshima and Nagasaki, Japan, 1958–1987. *Eur J Cancer.* 1994 Jan 1;30(6):801–7.
130. Gilbert ES, Curtis RE, Hauptmann M, Kleinerman RA, Lynch CF, Stovall M, et al. Stomach Cancer Following Hodgkin Lymphoma, Testicular Cancer and Cervical Cancer: A

Pooled Analysis of Three International Studies with a Focus on Radiation Effects. *Radiat Res.* 2017;187(2):186–95.

131. Rigter LS, Schaapveld M, Janus CPM, Krol ADG, van der Maazen RWM, Roesink J, et al. Overall and disease-specific survival of Hodgkin lymphoma survivors who subsequently developed gastrointestinal cancer. *Cancer Med.* 2019;8(1):190–9.
132. Ekmektzoglou KA, Apostolopoulos P, Samelis G, Alexandrakis G. Gastroesophageal junction and gastroesophageal junction carcinoma : a short update. *Acta Gastro-Enterol Belg.* 2016 Dec;79(4):471–9.
133. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31–49.
134. Son T, Sun J, Choi S, Cho M, Kwon IG, Kim H-I, et al. Multi-institutional validation of the 8th AJCC TNM staging system for gastric cancer: Analysis of survival data from high-volume Eastern centers and the SEER database. *J Surg Oncol.* 2019 Sep;120(4):676–84.
135. Kim YH, Kim J-H, Kim H, Kim H, Lee YC, Lee SK, et al. Is the recent WHO histological classification for gastric cancer helpful for application to endoscopic resection? *Gastric Cancer.* 2016 Jul;19(3):869–875.
136. Cimerman M, Repse S, Jelenc F, Omejc M, Bitenc M, Lamovec J. Comparison of Lauren’s, Ming’s and WHO histological classifications of gastric cancer as a prognostic factor for operated patients. *Int Surg.* 79(1):27–32.
137. Calik M, Calik I, Demirci E, Altun E, Gundogdu B, Sipal S, et al. Goseki Grade and Tumour Location Influence Survival of Patients with Gastric Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014 Feb;15(3):1429–1434.
138. Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut.* 1992 May;33(5):606–612.
139. Dixon MF, Martin IG, Sue-Ling HM, Wyatt JI, Quirke P, Johnston D. Goseki grading in gastric cancer: comparison with existing systems of grading and its reproducibility. *Histopathology.* 1994 Oct;25(4):309–316.
140. Mönig S, Baldus SE, Collet PH, Zirbes TK, Bollschweiler E, Thiele J, et al. Histological grading in gastric cancer by Goseki classification: correlation with histopathological subtypes and prognosis. *Anticancer Res.* 21(1B):617–20.
141. de Manzoni G, Verlato G. Classification of gastric carcinoma using the goseki system provides prognostic information additional to TNM staging. *Cancer.* 2000 May;88(10):2426–2427.

142. McLaren KM, Burnett RA, Goodlad JR, Howatson SR, Lang S, Lee FD, et al. Observer variability in the Goseki grouping of gastric adenocarcinoma in resection and biopsy specimens. *Histopathology*. 2003 May;42(5):472–475.
143. Chen J, Zhou C, He M, Zhen Z, Wang J, Hu X. A Meta-Analysis And Systematic Review Of Accuracy Of Endoscopic Ultrasound For N Staging Of Gastric Cancers. *Cancer Manag Res*. 2019;11:8755–64.
144. Luo M, Li L. Clinical utility of miniprobe endoscopic ultrasonography for prediction of invasion depth of early gastric cancer: A meta-analysis of diagnostic test from PRISMA guideline. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Feb;98(6):e14430.
145. Nie R-C, Yuan S-Q, Chen X-J, Chen S, Xu L-P, Chen Y-M, et al. Endoscopic ultrasonography compared with multidetector computed tomography for the preoperative staging of gastric cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2017 Jun 2;15(1):113.
146. Małkowski B, Staniuk T, Srutek E, Gorycki T, Zegarski W, Studniarek M. (18)F-FLT PET/CT in Patients with Gastric Carcinoma. *Gastroenterol Res Pract*. 2013;2013:696423.
147. Cayvarlı H, Bekiş R, Akman T, Altun D. The Role of 18F-FDG PET/CT in the Evaluation of Gastric Cancer Recurrence. *Mol Imaging Radionucl Ther*. 2014 Oct 5;23(3):76–83.
148. Kwee RM, Kwee TC. Modern imaging techniques for preoperative detection of distant metastases in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2015 Oct 7;21(37):10502–9.
149. Choi J-I, Joo I, Lee JM. State-of-the-art preoperative staging of gastric cancer by MDCT and magnetic resonance imaging. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 28;20(16):4546–57.
150. Ghanadi K, Mahmoudvand H, Bakhtiari A, Gorji M, Moradi-Kor N, Tarahi MJ, et al. Pre-operative laparoscopic staging of gastric cancer in patients who are candidates for neo-adjuvant chemotherapy: A Cross Sectional Study. *Biomol Concepts*. 2019 Apr 16;10(1):68–72.
151. Brenkman HJF, Gertsen EC, Vegt E, van Hillegersberg R, van Berge Henegouwen MI, Gisbertz SS, et al. Evaluation of PET and laparoscopy in STagIng advanced gastric cancer: a multicenter prospective study (PLASTIC-study). *BMC Cancer*. 2018 20;18(1):450.
152. Best LMJ, Mughal M, Gurusamy KS. Laparoscopic versus open gastrectomy for gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Mar 31;3:CD011389.
153. Jamel S, Markar SR, Malietzis G, Acharya A, Athanasiou T, Hanna GB. Prognostic significance of peritoneal lavage cytology in staging gastric cancer: systematic review and meta-analysis. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc*. 2018 Jan;21(1):10–8.
154. Bae SJ, Shin US, Ki YJ, Cho SS, Moon SM, Park SH. Role of peritoneal lavage cytology and prediction of prognosis and peritoneal recurrence after curative surgery for colorectal cancer. *Ann Coloproctology*. 2014;

155. Olesiński T. Surgical treatment of gastric cancer: then and now. *Nowotw J Oncol*. 2017 Mar;66(5):408–414.
156. Ramos MFKP, Pereira MA, Yagi OK, Dias AR, Charruf AZ, Oliveira RJ, Zaidan EP, Zilberstein B, Ribeiro-Júnior U, Ceconello I. Surgical treatment of gastric cancer: a 10-year experience in a high-volume university hospital. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018 Dec 10;73(suppl 1):e543s.
157. Hasuike N, Ono H, Boku N, Mizusawa J, Takizawa K, Fukuda H, et al. A non-randomized confirmatory trial of an expanded indication for endoscopic submucosal dissection for intestinal-type gastric cancer (cT1a): the Japan Clinical Oncology Group study (JCOG0607). *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc*. 2018 Jan;21(1):114–23.
158. Karpińska-Kaczmarczyk K, Białek A, Lewandowska M, Dobak E, Ławniczak M, Urańska E. Histomorphologic features of early gastric carcinoma treated by endoscopic submucosal dissection: relation to efficiency of endoscopic resection. *Scand J Gastroenterol*. 2016 Dec;51(12):1495–501.
159. Kim S-H, Han S-Y, Azam T, Yoon D-Y, Dinarello CA. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. *Immunity*. 2005 Jan;22(1):131–42.
160. Dahl CA, Schall RP, He HL, Cairns JS. Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1992 Jan;148(2):597–603.
161. Choi J-D, Bae S-Y, Hong J-W, Azam T, Dinarello CA, Her E, et al. Identification of the most active interleukin-32 isoform. *Immunology*. 2009 Apr;126(4):535–42.
162. Bae S, Kang D, Hong J, Chung B, Choi J, Jhun H, et al. Characterizing antiviral mechanism of interleukin-32 and a circulating soluble isoform in viral infection. *Cytokine*. 2012 Apr;58(1):79–86.
163. El-Far M, Kouassi P, Sylla M, Zhang Y, Fouda A, Fabre T, et al. Proinflammatory isoforms of IL-32 as novel and robust biomarkers for control failure in HIV-infected slow progressors. *Sci Rep*. 2016;6:22902.
164. Heinhuis B, Plantinga TS, Semango G, Kusters B, Netea MG, Dinarello CA, et al. Alternatively spliced isoforms of IL-32 differentially influence cell death pathways in cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 2016 Feb;37(2):197–205.
165. Galdino HJ, Maldaner AE, Pessoni LL, Soriani FM, Pereira LI de A, Pinto SA, et al. Interleukin 32gamma (IL-32gamma) is highly expressed in cutaneous and mucosal lesions of American Tegumentary Leishmaniasis patients: association with tumor necrosis factor (TNF) and IL-10. *BMC Infect Dis*. 2014;14:249.
166. Bai X, Kinney WH, Su W-L, Bai A, Ovrutsky AR, Honda JR, et al. Caspase-3-independent apoptotic pathways contribute to interleukin-32gamma-mediated control of Mycobacterium tuberculosis infection in THP-1 cells. *BMC Microbiol*. 2015;15:39.

167. Chen J, Wang S, Su J, Chu G, You H, Chen Z, et al. Interleukin-32alpha inactivates JAK2/STAT3 signaling and reverses interleukin-6-induced epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastasis in pancreatic cancer cells. *OncoTargets Ther.* 2016;9:4225–4237.
168. Nicholl MB, Chen X, Qin C, Bai Q, Zhu Z, Davis MR, et al. IL-32alpha has differential effects on proliferation and apoptosis of human melanoma cell lines. *J Surg Oncol.* 2016 Mar;113(4):364–369.
169. Yagi Y, Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Ohsaki R, Inatomi O, et al. Interleukin-32 α expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med.* 2011 Feb;27(2):263–8.
170. Meyer N, Zimmermann M, Bürgler S, Bassin C, Woehrl S, Moritz K, et al. IL-32 is expressed by human primary keratinocytes and modulates keratinocyte apoptosis in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(4).
171. Alboni S, Montanari C, Benatti C, Blom JMC, Simone ML, Brunello N, et al. Constitutive and LPS-regulated expression of interleukin-18 receptor beta variants in the mouse brain. *Brain Behav Immun.* 2011 Mar;25(3):483–93.
172. Alsaleh G, Sparsa L, Chatelus E, Ehlinger M, Gottenberg J-E, Wachsmann D, et al. Innate immunity triggers IL-32 expression by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):R135.
173. Mun SH, Kim JW, Nah SS, Ko NY, Lee JH, Kim JD, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-32 is positively regulated via the Syk/protein kinase Cdelta/JNK pathway in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2009 Mar;60(3):678–85.
174. Monteleone K, Di Maio P, Cacciotti G, Falasca F, Fraulo M, Falciano M, et al. Interleukin-32 isoforms: expression, interaction with interferon-regulated genes and clinical significance in chronically HIV-1-infected patients. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2014 Jun;203(3):207–216.
175. Kobayashi H, Lin PC. Molecular characterization of IL-32 in human endothelial cells. *Cytokine.* 2009 Jun;46(3):351-8.
176. Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, et al. Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(6):R166.
177. Goda C, Kanaji T, Kanaji S, Tanaka G, Arima K, Ohno S, et al. Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells. *Int Immunol.* 2006;18(2):233–240.
178. Kang J-W, Park YS, Lee DH, Kim MS, Bak Y, Ham SY, et al. Interaction network mapping among IL-32 isoforms. *Biochimie.* 2014 Jun;101:248–251.

179. Moschen AR, Fritz T, Clouston AD, Rebhan I, Bauhofer O, Barrie HD, et al. Interleukin-32: A new proinflammatory cytokine involved in hepatitis C virus-related liver inflammation and fibrosis. *Hepatology*. 2011;53(6):1819–1829.
180. Netea MG, Azam T, Lewis EC, Joosten LAB, Wang M, Langenberg D, et al. Mycobacterium tuberculosis induces interleukin-32 production through a caspase-1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism. *PLoS Med*. 2006 Aug;3(8):e277.
181. Kang J-W, Park YS, Lee DH, Kim MS, Bak Y, Park SH, et al. Interleukin-32delta interacts with IL-32beta and inhibits IL-32beta-mediated IL-10 production. *FEBS Lett*. 2013 Oct;
182. Radom-Aizik S, Zaldivar F, Leu S-Y, Cooper DM. A brief bout of exercise alters gene expression and distinct gene pathways in peripheral blood mononuclear cells of early- and late-pubertal females. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2009 Jul;107(1):168–75.
183. Bak Y, Kang J-W, Kim MS, Park YS, Kwon T, Kim S, et al. IL-32theta downregulates CCL5 expression through its interaction with PKCdelta and STAT3. *Cell Signal*. 2014 Dec;26(12):3007–3015.
184. Mabileau G, Sabokbar A. Interleukin-32 Promotes Osteoclast Differentiation but Not Osteoclast Activation. Hartl D, editor. *PLoS ONE*. 2009 Jan;4(1):e4173.
185. Yun H-M, Park K-R, Kim E-C, Han SB, Yoon DY, Hong JT. IL-32 α suppresses colorectal cancer development via TNFR1-mediated death signaling. *Oncotarget*. 2015 Apr;6(11):9061–72.
186. Kim MS, Kang JW, Jeon JS, Kim JK, Kim JW, Hong J, Yoon DY. IL-32 θ gene expression in acute myeloid leukemia suppresses TNF- α production. *Oncotarget*. 2015 Dec 1;6(38):40747-61.
187. Heinhuis B, Netea MG, van den Berg WB, Dinarello CA, Joosten LAB. Interleukin-32: a predominantly intracellular proinflammatory mediator that controls cell activation and cell death. *Cytokine*. 2012 Nov;60(2):321–327.
188. Joosten LAB, Netea MG, Kim S-H, Yoon D-Y, Oppers-Walgreen B, Radstake TRD, et al. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3298–303.
189. Heinhuis B, Koenders MI, van de Loo FA, Netea MG, van den Berg WB, Joosten LAB. Inflammation-dependent secretion and splicing of IL-32{gamma} in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar;108(12):4962–4967.
190. Keswani A, Kern RC, Schleimer RP, Kato A. Role of interleukin-32 in chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013;13(1):13–8.
191. Calabrese F, Baraldo S, Bazzan E, Lunardi F, Rea F, Maestrelli P, et al. IL-32, a novel proinflammatory cytokine in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Nov;178(9):894–901.

192. Du Y, Wang W, Yang W, He B. Interleukin-32, not reduced by salmeterol/fluticasone propionate in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(9):1613–1618.
193. Zhou Y, Zhu Y. Important Role of the IL-32 Inflammatory Network in the Host Response against Viral Infection. *Viruses*. 2015 Jun;7(6):3116–3129.
194. Zepp J a, Nold-Petry C a, Dinarello C a, Nold MF. Protection from RNA and DNA viruses by IL-32. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;186(7):4110–8.
195. Bai X, Kim S-H, Azam T, McGibney MT, Huang H, Dinarello C a, et al. IL-32 is a host protective cytokine against Mycobacterium tuberculosis in differentiated THP-1 human macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010;184(7):3830–3840.
196. Konno H, Ohta M, Baba M, Suzuki S, Nakamura S. The role of circulating IL-8 and VEGF protein in the progression of gastric cancer. *Cancer Sci*. 2003 Aug;94(8):735–40.
197. Ishigami S, Arigami T, Uchikado Y, Setoyama T, Kita Y, Sasaki K, et al. IL-32 expression is an independent prognostic marker for gastric cancer. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2013 Jun;30(2):472.
198. Gorvel L, Korenfeld D, Tung T, Klechevsky E. Dendritic Cell–Derived IL-32 α : A Novel Inhibitory Cytokine of NK Cell Function. *J Immunol*. 2017 Aug 15;199(4):1290–300.
199. Hu L-J, Li L, Fitzpatrick JE, Francis SO, Fujita M, Takashi MK, et al. The Proinflammatory Cytokine Interleukin-32 is expressed in Keratinocytes and Dendritic Cells Obtained from Patients with Chronic Plaque Psoriasis (CPPs). *J Immunol*. 2007;178(Meeting Abstracts):S165.
200. Schetter AJ, Heegaard NHH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):37–49.
201. Seo EH, Kang J, Kim KH, Cho MC, Lee S, Kim HJ, et al. Detection of expressed IL-32 in human stomach cancer using ELISA and immunostaining. *J Microbiol Biotechnol*. 2008;18(9):1606–12.
202. Kang YH, Park M-Y, Yoon D-Y, Han SR, Lee CI, Ji NY, et al. Dysregulation of overexpressed IL-32 α in hepatocellular carcinoma suppresses cell growth and induces apoptosis through inactivation of NF-kappaB and Bcl-2. *Cancer Lett*. 2012 May;318(2):226–233.
203. Yousif NG, Al-Amran FG, Hadi N, Lee J, Adrienne J. Expression of IL-32 modulates NF-kappaB and p38 MAP kinase pathways in human esophageal cancer. *Cytokine*. 2013 Jan;61(1):223–227.
204. Yun J, Park MH, Son DJ, Nam KT, Moon DB, Ju JH, et al. IL-32 gamma reduces lung tumor development through upregulation of TIMP-3 overexpression and hypomethylation. *Cell Death Dis*. 2018;9(3):306.

205. Zeng Q, Li S, Zhou Y, Ou W, Cai X, Zhang L, Huang W, Huang L, Wang Q. Interleukin-32 contributes to invasion and metastasis of primary lung adenocarcinoma via NF-kappaB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *Cytokine*. 2014 Jan;65(1):24-32.
206. Ishigami S, Arigami T, Uchikado Y, Setoyama T, Kita Y, Sasaki K, Okumura H, Kurahara H, Kijima Y, Harada A, Ueno S, Natsugoe S. IL-32 expression is an independent prognostic marker for gastric cancer. *Med Oncol*. 2013 Jun;30(2):472.
207. Wang S, Chen F, Tang L. IL-32 promotes breast cancer cell growth and invasiveness. *Oncol Lett*. 2015 Jan;9(1):305-307.
208. Tsai C-Y, Wang C-S, Tsai M-M, Chi H-C, Cheng W-L, Tseng Y-H, et al. Interleukin-32 increases human gastric cancer cell invasion associated with tumor progression and metastasis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 May;20(9):2276-88.
209. Khawar MB, Abbasi MH, Sheikh N. IL-32: A Novel Pluripotent Inflammatory Interleukin, towards Gastric Inflammation, Gastric Cancer, and Chronic Rhino Sinusitis. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:8413768.
210. Cui Y, Sun Z, Li X, Leng C, Zhang L, Fu X, et al. Expression and clinical significance of cyclooxygenase-2 and interleukin-32 in primary gastric B-cell lymphoma. *Oncol Lett*. 2016 Jan;11(1):693-8.
211. Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Kawaguchi M, Fujita H, Asano Y, et al. The Role of IL-32 in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2014;134(5):1428-35.
212. Guenin S, Mouallif M, Hubert P, Jacobs N, Krusy N, Duray A, et al. Interleukin-32 expression is associated with a poorer prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog*. 2014 Aug;53(8):667-73.
213. Bak Y, Kwon T, Bak I seon, Hong J, Yu D-Y, Yoon D-Y. IL-32 θ inhibits stemness and epithelial-mesenchymal transition of cancer stem cells *via* the STAT3 pathway in colon cancer. *Oncotarget*. 2016 Feb 9;7(6):7307-17.
214. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Ortega VA, Hernández-Lizoain JL, et al. IL-32 α -induced inflammation constitutes a link between obesity and colon cancer. *OncoImmunology*. 2017 May 16;e1328338.
215. Lee H-J, Liang Zhel, Huang Smei, Lim J-S, Yoon D-Y, Lee H-J, et al. Overexpression of IL-32 is a novel prognostic factor in patients with localized clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2012 Feb;3(2):490-496.
216. Hong JT, Son DJ, Lee CK, Yoon DY, Lee DH, Park MH. Interleukin 32, inflammation and cancer. *Pharmacol Ther*. 2017 Jun;174:127-137.
217. Kim MS, Kang J-W, Jeon J-S, Kim JK, Kim JW, Hong J, et al. IL-32 θ gene expression in acute myeloid leukemia suppresses TNF- α production. *Oncotarget*. 2015 Dec 1;6(38):40747-61.

218. Herrmann A, Lahtz C, Nagao T, Song JY, Chan WC, Lee H, et al. CTLA4 Promotes Tyk2-STAT3-Dependent B-cell Oncogenicity. *Cancer Res.* 2017 15;77(18):5118–28.
219. Balic JJ, Garama DJ, Saad MI, Yu L, West AC, West AJ, et al. Serine-Phosphorylated STAT3 Promotes Tumorigenesis via Modulation of RNA Polymerase Transcriptional Activity. *Cancer Res.* 2019 15;79(20):5272–87.
220. Hill DG, Yu L, Gao H, Balic JJ, West A, Oshima H, et al. Hyperactive gp130/STAT3-driven gastric tumorigenesis promotes submucosal tertiary lymphoid structure development. *Int J Cancer.* 2018 01;143(1):167–78.
221. Han S, Yang Y. Interleukin-32: Frenemy in cancer? *BMB Rep.* 2019 Mar 31;52(3):165–74.
222. Beck PL, Cotton JA, Platnich JM, Muruve DA, Buret AG, Jijon H. Interleukin-8 in gastrointestinal inflammation and malignancy: induction and clinical consequences. *Int J Interferon Cytokine Mediat Res.* 2016 May;13.
223. Wang Y-M, Li Z-X, Tang F-B, Zhang Y, Zhou T, Zhang L, et al. Association of genetic polymorphisms of interleukins with gastric cancer and precancerous gastric lesions in a high-risk Chinese population. *Tumor Biol.* 2016 Feb;37(2):2233–2242.
224. Yun H-M, Oh JH, Shim J-H, Ban JO, Park K-R, Kim J-H, et al. Antitumor activity of IL-32beta through the activation of lymphocytes, and the inactivation of NF-kappaB and STAT3 signals. *Cell Death Dis.* 2013;4:e640.
225. Seo EH, Kang J, Kim KH, Cho MC, Lee S, Kim HJ, et al. Detection of expressed IL-32 in human stomach cancer using ELISA and immunostaining. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(9):1606–1612.
226. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep;407(6801):249–57.
227. Bałan, Barbara & Słotwiński, R. (2014). VEGF and tumor angiogenesis. *Central-European Journal of Immunology.* Vol 33. 2008. 232–236 p.
228. Nold-Petry CA, Rudloff I, Baumer Y, Ruvo M, Marasco D, Botti P, et al. IL-32 promotes angiogenesis. *J Immunol.* 2014;192(2):589–602.
229. Kobayashi H, Lin PC. Molecular characterization of IL-32 in human endothelial cells. *Cytokine.* 2009 Jun;46(3):351–8.
230. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5445–56.
231. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology.* 2010 Mar;129(3):311–21.

232. Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 2017 May;38(5):310–22.
233. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity.* 2019 Apr;50(4):892–906.
234. Chen XW, Zhou SF. Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF- κ B axis, and tumorigenesis. *Vol. 9.* 2015. 2941–2946 p.
235. Tamassia N, Arruda-Silva F, Calzetti F, Lonardi S, Gasperini S, Gardiman E, et al. A Reappraisal on the Potential Ability of Human Neutrophils to Express and Produce IL-17 Family Members In Vitro: Failure to Reproducibly Detect It. *Front Immunol.* 2018 Apr 17;9.
236. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine.* 2013 Nov;64(2):477–85.
237. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000.* 2015 Oct;69(1):142–59.
238. Monin L, Gaffen SL. IL-17 family cytokines: signaling mechanisms, biological activities and therapeutic implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Apr 2;10(4).
239. Li T-J, Jiang Y-M, Hu Y-F, Huang L, Yu J, Zhao L-Y, et al. Interleukin-17–Producing Neutrophils Link Inflammatory Stimuli to Disease Progression by Promoting Angiogenesis in Gastric Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017 Mar;23(6):1575–1585.
240. Chang SH. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer. *Arch Pharm Res.* 2019 Jul;42(7):549–59.
241. Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. *Cancer Cell.* 2018 Apr 9;33(4):570–80.
242. Jiang YX, Yang SW, Li PA, Luo X, Li ZY, Hao YX, Yu PW. The promotion of the transformation of quiescent gastric cancer stem cells by IL-17 and the underlying mechanisms. *Oncogene.* 2017 Mar 2;36(9):1256–1264.
243. Dejea CM, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science.* 2018 Feb 2;359(6375):592–7.
244. Fabre J, Giustiniani J, Garbar C, Antonicelli F, Merrouche Y, Bensussan A, Bagot M, Al-Dacak R. Targeting the Tumor Microenvironment: The Protumor Effects of IL-17 Related to Cancer Type. *Int J Mol Sci.* 2016 Aug 30;17(9):1433.
245. Asukai K, Kawamoto K, Eguchi H, Konno M, Nishida N, Koseki J, et al. Prognostic Impact of Peritumoral IL-17-Positive Cells and IL-17 Axis in Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2015 Dec;22 Suppl 3(S3):S1524–31.

246. Wang S, Li Z, Hu G. Prognostic role of intratumoral IL-17A expression by immunohistochemistry in solid tumors: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Sep 12;8(39):66382–91.
247. Gulubova M, Ananiev J, Ignatova M, Halacheva K. Pro-Tumor and Anti-Tumor Functions of IL-17 and of TH17 Cells in Tumor Microenvironment. *Acta Medica Bulg*. 2016 Oct 1;43(2):68–79.
248. Liu Y, Wang K, Liang X, Li Y, Zhang Y, Zhang C, et al. Complement C3 Produced by Macrophages Promotes Renal Fibrosis via IL-17A Secretion. *Front Immunol*. 2018 Oct 22;9.
249. Adamsson J, Ottsjö LS, Lundin SB, Svennerholm A-M, Raghavan S. Gastric expression of IL-17A and IFN γ in *Helicobacter pylori* infected individuals is related to symptoms. *Cytokine*. 2017 Nov;99:30–4.
250. Dai Z-M, Zhang T-S, Lin S, Zhang W-G, Liu J, Cao X-M, et al. Role of IL-17A rs2275913 and IL-17F rs763780 polymorphisms in risk of cancer development: an updated meta-analysis. *Sci Rep*. 2016 Apr;6(1):20439.
251. Liu L, Sun H, Wu S, Tan H, Sun Y, Liu X, et al. IL-17A promotes CXCR2-dependent angiogenesis in a mouse model of liver cancer. *Mol Med Rep*. 2019 May 29;
252. Akbay EA, Koyama S, Liu Y, Dries R, Bufe LE, Silkes M, et al. Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade. *J Thorac Oncol*. 2017 Aug;12(8):1268–79.
253. Huang Q, Duan limin, Qian X, Fan J, Lv Z, Zhang X, et al. IL-17 Promotes Angiogenic Factors IL-6, IL-8, and Vegf Production via Stat1 in Lung Adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2016 Dec;6(1):36551.
254. Pickens SR, Volin MV, Mandelin AM, Kolls JK, Pope RM, Shahrara S. IL-17 Contributes to Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):3233–41.
255. Witowski J, Kamhieh-Milz J, Kawka E, Catar R, Jörres A. IL-17 in Peritoneal Dialysis-Associated Inflammation and Angiogenesis: Conclusions and Perspectives. *Front Physiol*. 2018 Nov 26;9:1694.
256. Wang X, Yang L, Huang F, Zhang Q, Liu S, Ma L, et al. Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- α up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells. *Immunol Lett*. 2017 Apr;184:7–14.
257. Meng X, Zhu S, Dong Q, Zhang S, Ma J, Zhou C. Expression of Th17/Treg related molecules in gastric cancer tissues. *Turk J Gastroenterol*. 2018 Jan;29(1):45-51.
258. Amara S, Alotaibi D, Tiriveedhi V. NFAT5/STAT3 interaction mediates synergism of high salt with IL-17 towards induction of VEGF-A expression in breast cancer cells. *Oncol Lett*. 2016 Aug;12(2):933–43.

259. Ibrahim S, Girault A, Ohresser M, Lereclus E, Paintaud G, Lecomte T, et al. Monoclonal Antibodies Targeting the IL-17/IL-17RA Axis: An Opportunity to Improve the Efficiency of Anti-VEGF Therapy in Fighting Metastatic Colorectal Cancer? *Clin Colorectal Cancer*. 2018 Mar;17(1):e109–13.
260. Semeran K, Pawłowski P, Lisowski Ł, Szczepaniak I, Wójtowicz J, Ławicki S, et al. Plasma Levels of IL-17, VEGF, and Adrenomedullin and S-Cone Dysfunction of the Retina in Children and Adolescents without Signs of Retinopathy and with Varied Duration of Diabetes. *Mediators Inflamm*. 2013;2013.
261. You T, Bi Y, li J, Zhang M, Chen X, Zhang K, et al. IL-17 induces reactive astrocytes and up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) through JAK/STAT signaling. *Sci Rep*. 2017 Mar 10;7.
262. Chen J, Xia J, Liang X, Pan K, Wang W, Lv L, et al. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. *Int J Biol Sci*. 2011 Jan;7(1):53–60.
263. Chan L-P, Liu C, Chiang F-Y, Wang L-F, Lee K-W, Chen W-T, et al. IL-8 promotes inflammatory mediators and stimulates activation of p38 MAPK/ERK-NF-κB pathway and reduction of JNK in HNSCC. *Oncotarget*. 2017 Aug 22;8(34):56375–88.
264. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 May;10(5):593–619.
265. Crespo J, Wu K, Li W, Kryczek I, Maj T, Vatan L, et al. Human Naive T Cells Express Functional CXCL8 and Promote Tumorigenesis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2018 Jul;201(2):814–820.
266. Hasan T, Caragher SP, Shireman JM, Park CH, Atashi F, Baisiwala S, et al. Interleukin-8/CXCR2 signaling regulates therapy-induced plasticity and enhances tumorigenicity in glioblastoma. *Cell Death Dis*. 2019 Mar 29;10(4):292.
267. Khan MN, Wang B, Wei J, Zhang Y, Li Q, Luan X, et al. CXCR1/2 antagonism with CXCL8/Interleukin-8 analogue CXCL8(3-72)K11R/G31P restricts lung cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and suppressing angiogenesis. *Oncotarget*. 2015 Aug 28;6(25):21315–27.
268. Jenkins GJS, Mikhail J, Alhamdani A, Brown TH, Caplin S, Manson JM, et al. Immunohistochemical study of nuclear factor- B activity and interleukin-8 abundance in oesophageal adenocarcinoma; a useful strategy for monitoring these biomarkers. *J Clin Pathol*. 2007 Nov 1;60(11):1232–7.
269. Gonzalez-Aparicio M, Alfaro C. Influence of Interleukin-8 and Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation in the Tumor Microenvironment: Is There a Pathogenic Role? *J Immunol Res*. 2019 Apr 10;2019:1–7.

270. Eucker TP, Samuelson DR, Hunzicker-Dunn M, Konkel ME. The focal complex of epithelial cells provides a signaling platform for interleukin-8 induction in response to bacterial pathogens. *Cell Microbiol.* 2014 Sep;16(9):1441–55.
271. Kim SJ, Uehara H, Karashima T, Mccarty M, Shih N, Fidler IJ. Expression of Interleukin-8 Correlates with Angiogenesis, Tumorigenicity, and Metastasis of Human Prostate Cancer Cells Implanted Orthotopically in Nude Mice. *Neoplasia.* 2001 Jan;3(1):33–42.
272. Roumeguère T, Legrand F, Rassy EE, Kaitouni MI, Albisinni S, Rousseau A, et al. A prospective clinical study of the implications of IL-8 in the diagnosis, aggressiveness and prognosis of prostate cancer. Vol. 4. 2018. FSO266 p.
273. Srivastava SK, Bhardwaj A, Arora S, Tyagi N, Singh AP, Carter JE, et al. Interleukin-8 is a key mediator of FKBP51-induced melanoma growth, angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer.* 2015 May 26;112(11):1772–81.
274. Gatla HR, Zou Y, Uddin MM, Vancurova I. Epigenetic regulation of interleukin-8 expression by class I HDAC and CBP in ovarian cancer cells. *Oncotarget.* 2017 Sep 19;8(41):70798–810.
275. Carleton M, Zhou M, De Henau O, Phillips P, Chen T, Feng Y, et al. Serum interleukin 8 (IL-8) may serve as a biomarker of response to immuno-oncology (I-O) therapy. *J Clin Oncol.* 2018 May 20;36(15_suppl):3025–3025.
276. Yao P-L, Lin Y-C, Wang C-H, Huang Y-C, Liao W-Y, Wang S-S, et al. Autocrine and Paracrine Regulation of Interleukin-8 Expression in Lung Cancer Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Jun;32(6):540–7.
277. Huang C-Y, Chang W-S, Tsai C-W, Hsia T-C, Shen T-C, Bau D-T, et al. The contribution of interleukin-8 genotypes and expression to nasopharyngeal cancer susceptibility in Taiwan. *Medicine (Baltimore).* 2018 Sep 7;97(36).
278. Sharma I, Singh A, Siraj F, Saxena S. IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma. *J Biomed Sci.* 2018 Dec;25(1):62.
279. Al-Khalaf HH, Al-Harbi B, Al-Sayed A, Arafah M, Tulbah A, Jarman A, et al. Interleukin-8 Activates Breast Cancer-Associated Adipocytes and Promotes Their Angiogenesis- and Tumorigenesis-Promoting Effects. *Mol Cell Biol.* 2019 Jan 3;39(2).
280. Srivastava SK, Bhardwaj A, Arora S, Tyagi N, Singh AP, Carter JE, et al. Interleukin-8 is a key mediator of FKBP51-induced melanoma growth, angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer.* 2015 May 26;112(11):1772–81.
281. Li M, Zhang Y, Feurino LW, Wang H, Fisher WE, Brunicardi FC, et al. Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 2008 Apr;99(4):733–7.

282. Chen Y, Shi M, Yu G-Z, Qin X-R, Jin G, Chen P, et al. Interleukin-8, a promising predictor for prognosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2012 Mar;18(10):1123–9.
283. Sun Q, Sun F, Wang B, Liu S, Niu W, Liu E, et al. Interleukin-8 promotes cell migration through integrin $\alpha\beta6$ upregulation in colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2014 Nov;354(2):245–253.
284. Kitadai Y. Angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer. *J Oncol*. 2010 Mar;2010:468725.
285. Chang YW, Oh CH, Kim J-W, Lee JW, Park MJ, Shim J-J, et al. Combination of *Helicobacter pylori* infection and the interleukin 8 -251 T polymorphism, but not the mannose-binding lectin 2 codon 54 G polymorphism, might be a risk factor of gastric cancer. *BMC Cancer*. 2017;17(1):388.
286. Zhao Y-R, Zhou Y, Lin G, Hu W-J, Du J-M. Association Between IL-17, IL-8 and IL-18 Expression in Peripheral Blood and *Helicobacter Pylori* Infection in Mongolian Gerbils. *Jundishapur J Microbiol*. 2015 Aug 1;8(8).
287. Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec;19(45):8192–202.
288. Crabtree JE, Wyatt JI, Peichl P, Trejdosiewicz LK, Ramsay N, Nichols PH, et al. Interleukin-8 Expression in Gastric Cancer. In: Lindley IJD, Westwick J, Kunkel S, editors. *The Chemokines: Biology of the Inflammatory Peptide Supergene Family II*. Boston, MA: Springer US; 1993. p. 188–188. (Advances in Experimental Medicine and Biology).
289. Khan MN, Wang B, Wei J, Zhang Y, Li Q, Luan X, et al. CXCR1/2 antagonism with CXCL8/Interleukin-8 analogue CXCL8(3–72)K11R/G31P restricts lung cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and suppressing angiogenesis. *Oncotarget*. 2015 Jun 10;6(25):21315–27.
290. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Mar;170(6):3369–76.
291. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncol*. 2005 Apr;7(2):122–133.
292. Aalinkeel R, Nair B, Chen C, Mahajan SD, Reynolds JL, Zhang H, et al. Nanotherapy silencing the interleukin-8 gene produces regression of prostate cancer by inhibition of angiogenesis. *Immunology*. 2016 Aug;148(4):387–406.
293. Ulukus M, Ulukus EC, Tavmergen Goker EN, Tavmergen E, Zheng W, Arici A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2009 Mar;91(3):687–93.

294. Kitadai Y, Takahashi Y, Haruma K, Naka K, Sumii K, Yokozaki H, et al. Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. *Br J Cancer*. 1999 Oct;81(4):647–53.
295. A T-M, C C, F G-V, Lf M, E R-H. IL-8 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition through pERK1/2 in AGS Cells. *J Gastroenterol Its Complicat*. 2016 Nov;1(1).
296. Virchow R. *Cellular Pathology as Based Upon Physiological and Pathological Histology ...* J. B. Lippincott; 1863. 566 p.
297. Goldmann E. The growth of malignant disease in man and the lower animals, with special reference to the vascular system. *The Lancet*. 1907 Nov 2;170(4392):1236–40.
298. Murphy JB. Transplantability of tissues to the embryo of foreign species. *J Exp Med*. 1913 Apr 1;17(4):482–93.
299. Boyd EM. The rôle of the placenta in the fat metabolism of the rabbit foetus. *Biochem J*. 1935 May;29(5):985–93.
300. Lucké B, Schlumberger H. The manner of growth of frog carcinoma, studied by direct microscopic examination of living intraocular transplants. *J Exp Med*. 1939 Aug 31;70(3):257–68.
301. Furth J. A neoplasm of monocytes of mice and its relation to similar neoplasms of man. *J Exp Med*. 1939 Jan 1;69(1):13–30.
302. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182–6.
303. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):983–5.
304. Dvorak HF, Senger DR, Dvorak AM. Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance. *Cancer Metastasis Rev*. 1983;2(1):41–73.
305. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*. 1989 Nov;84(5):1470–8.
306. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Jun 15;161(2):851–8.
307. Sedding DG, Boyle EC, Demandt JAF, Sluimer JC, Dutzmann J, Haverich A, et al. Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Front Immunol*. 2018;9:706.

308. Adighibe O, Leek RD, Fernandez-Mercado M, Hu J, Snell C, Gatter KC, et al. Why some tumours trigger neovascularisation and others don't: the story thus far. *Chin J Cancer*. 2016 Dec;35(1):18.
309. Potente M, Carmeliet P. The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb;79(1):43–66.
310. Bikfalvi A. History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. *Angiogenesis*. 2017 Nov;20(4):463–78.
311. Befani C, Liakos P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *J Cell Physiol*. 2018;233(12):9087–98.
312. Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, Figg WD, Sarli G, Oliveira JT de, et al. Angiogenesis in Spontaneous Tumors and Implications for Comparative Tumor Biology. *Sci World J*. 2014;2014:1–16.
313. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 May;473(7347):298–307.
314. Mao Y, Liu X, Song Y, Zhai C, Zhang L. VEGF-A/VEGFR-2 and FGF-2/FGFR-1 but not PDGF-BB/PDGFR- β play important roles in promoting immature and inflammatory intraplaque angiogenesis. *PloS One*. 2018;13(8):e0201395.
315. Lefere S, Van de Velde F, Hoorens A, Raevens S, Van Campenhout S, Vandierendonck A, et al. Angiopoietin-2 Promotes Pathological Angiogenesis and Is a Therapeutic Target in Murine Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2019;69(3):1087–104.
316. Fagiani E, Lorentz P, Kopfstein L, Christofori G. Angiopoietin-1 and -2 exert antagonistic functions in tumor angiogenesis, yet both induce lymphangiogenesis. *Cancer Res*. 2011 Sep 1;71(17):5717–27.
317. Wu X, Giobbie-Hurder A, Liao X, Connelly C, Connolly EM, Li J, et al. Angiopoietin-2 as a Biomarker and Target for Immune Checkpoint Therapy. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(1):17–28.
318. Ramanathan R, Olex AL, Dozmorov M, Bear HD, Fernandez LJ, Takabe K. Angiopoietin pathway gene expression associated with poor breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;162(1):191–8.
319. Li P, He Q, Luo C, Qian L. Diagnostic and prognostic potential of serum angiopoietin-2 expression in human breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):660–4.
320. Wu FTH, Man S, Xu P, Chow A, Paez-Ribes M, Lee CR, et al. Efficacy of Cotargeting Angiopoietin-2 and the VEGF Pathway in the Adjuvant Postsurgical Setting for Early Breast, Colorectal, and Renal Cancers. *Cancer Res*. 2016 01;76(23):6988–7000.

321. Jiang L, Luan Y, Miao X, Sun C, Li K, Huang Z, et al. Platelet releasate promotes breast cancer growth and angiogenesis via VEGF-integrin cooperative signalling. *Br J Cancer*. 2017 Aug 22;117(5):695–703.
322. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol*. 2014 Mar;5:75.
323. Marelli G, Allavena P, Erreni M. Tumor-associated macrophages, multi-tasking cells in the cancer landscape. *Cancer Res Front*. 2015;1(2):149–161.
324. Tirpe AA, Gulei D, Ciortea SM, Crivii C, Berindan-Neagoe I. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 5;20(24).
325. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*. 2015 Dec;3:83.
326. Murasawa S, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiol Bethesda Md*. 2005 Feb;20:36–42.
327. Kopp H-G, Ramos CA, Rafii S. Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Curr Opin Hematol*. 2006 May;13(3):175–81.
328. Kopp H-G, Avecilla ST, Hooper AT, Shmelkov SV, Ramos CA, Zhang F, et al. Tie2 activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression. *Blood*. 2005 Jul 15;106(2):505–13.
329. Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther*. 2002 May;9(10):631–41.
330. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D’Udine B, Foley RA, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature*. 2004 Jul 22;430(6998):419–21.
331. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):343–53.
332. Jin F, Brockmeier U, Otterbach F, Metzen E. New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. *Mol Cancer Res MCR*. 2012 Aug;10(8):1021–31.
333. Paku S, Paweletz N. First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 1991 Sep;65(3):334–46.
334. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669–676.

335. Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost.* 1997 Jul;78(1):672–7.
336. Downes CP, Leslie NR, Batty IH, van der Kaay J. Metabolic switching of PI3K-dependent lipid signals. *Biochem Soc Trans.* 2007 Apr;35(Pt 2):188–92.
337. Zeng G, Bautch VL. Differentiation and dynamic analysis of primitive vessels from embryonic stem cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009;482:333–44.
338. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril.* 2000 Sep;74(3):429–38.
339. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 1998 Nov;78(11):1385–94.
340. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine.* 2000 Feb;12(1):1–9.
341. Suhr F, Brixius K, Bloch W. Angiogenic and vascular modulation by extracellular matrix cleavage products. *Curr Pharm Des.* 2009;15(4):389–410.
342. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 2011 Jul;91(3):1071–121.
343. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Feb;15(1):102–11.
344. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science.* 2000 Aug 18;289(5482):1197–202.
345. Schimanski CC, Schlaegel F, Jordan M, Moehler M, Sgourakis G, Drescher DG, et al. VEGF-D correlates with metastatic disease in gastric cancer patients undergoing surgery. *World J Surg.* 2011 May;35(5):1010–6.
346. Macedo F, Ladeira K, Longatto-Filho A, Martins SF. Gastric Cancer and Angiogenesis: Is VEGF a Useful Biomarker to Assess Progression and Remission? *J Gastric Cancer.* 2017 Mar;17(1):1–10.
347. Kolev Y, Uetake H, Iida S, Ishikawa T, Kawano T, Sugihara K. Prognostic Significance of VEGF Expression in Correlation With COX-2, Microvessel Density, and Clinicopathological Characteristics in Human Gastric Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2007 Sep;14(10):2738–2747.
348. Mawalla B, Yuan X, Luo X, Chalya PL. Treatment outcome of anti-angiogenesis through VEGF-pathway in the management of gastric cancer: a systematic review of phase II and III clinical trials. *BMC Res Notes.* 2018 Jan;11(1):21.

349. Raica M, Mogoantă L, Cîmpean AM, Alexa A, Ioanovici S, Mărgăritescu C, Lazăr D, Izvernariu D. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in intestinal type gastric carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2008;49(1):37-42.
350. Lastraioli E, Boni L, Romoli MR, Crescioli S, Taddei A, Beghelli S, Tomezzoli A, Vindigni C, Saragoni L, Messerini L, Bernini M, Bencini L, Giommoni E, Freschi G, Di Costanzo F, Scarpa A, Morgagni P, Farsi M, Roviello F, De Manzoni G, Bechi P, Arcangeli A; Gruppo Italiano di Ricerca Cancro Gastrico (GIRCG). VEGF-A clinical significance in gastric cancers: immunohistochemical analysis of a wide Italian cohort. *Eur J Surg Oncol.* 2014 Oct;40(10):1291-8.
351. Ji Y, Wang Q, Li Y, Wang Z. Prognostic value of vascular endothelial growth factor A expression in gastric cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2014 Mar;35(3):2787-93.
352. Laddha AP, Kulkarni YA. VEGF and FGF-2: Promising targets for the treatment of respiratory disorders. *Respir Med.* 2019;156:33-46.
353. Ahn S, Lee J, Hong M, Kim ST, Park SH, Choi MG, et al. FGFR2 in gastric cancer: protein overexpression predicts gene amplification and high H-index predicts poor survival. *Mod Pathol.* 2016 Sep;29(9):1095-1103.
354. Kasuga M, Komatsu S, Ikoma H, Ichikawa D, Okamoto K, Shiozaki A, et al. [Novel treatment strategy using Trafermin® consisting of bFGF for intractable pancreatic fistula following gastrectomy for gastric cancer-a case report with literature reviews]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2011 Nov;38(12):1966-8.
355. Li W, Lin S, Li W, Wang W, Li X, Xu D. IL-8 interacts with metadherin promoting proliferation and migration in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep;478(3):1330-1337.
356. Chung HW, Lim J-B. High-mobility group box-1 contributes tumor angiogenesis under interleukin-8 mediation during gastric cancer progression. *Cancer Sci.* 2017 Aug;108(8):1594-601.
357. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009 Nov;86(5):1065-73.
358. Laviron M, Boissonnas A. Ontogeny of Tumor-Associated Macrophages. *Front Immunol.* 2019;10:1799.
359. Xu J, Yu Y, He X, Niu N, Li X, Zhang R, et al. Tumor-associated macrophages induce invasion and poor prognosis in human gastric cancer in a cyclooxygenase-2/MMP9-dependent manner. *Am J Transl Res.* 2019;11(9):6040-54.
360. Gambardella V, Castillo J, Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Martínez-Ciarpaglini C, Cabeza-Segura M, et al. The role of tumor-associated macrophages in gastric cancer

development and their potential as a therapeutic target. *Cancer Treat Rev.* 2020 Jun;86:102015.

361. Kuroda T, Kitadai Y, Tanaka S, Yang X, Mukaida N, Yoshihara M, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005 Nov 1;11(21):7629–36.
362. Futagami S, Tatsuguchi A, Hiratsuka T, Shindo T, Horie A, Hamamoto T, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 and CD40 ligation have a synergistic effect on vascular endothelial growth factor production through cyclooxygenase 2 upregulation in gastric cancer. *J Gastroenterol.* 2008;43(3):216–24.
363. Berlth F, Bollschweiler E, Drebber U, Hoelscher AH, Moenig S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: Diagnostic relevance and prognostic value. Vol. 20. 2014. 5679–5684 p.
364. Bläker H. Grading der Tumoren des tubulären Verdauungssystems. *Pathol.* 2016 Jul;37(4):293–298.
365. Kim JY, Hong S-M, Ro JY. Recent updates on grading and classification of neuroendocrine tumors. *Ann Diagn Pathol.* 2017 Aug 1;29:11–6.
366. Tabuchi Y, Takiguchi Y, Nakamura T, Nakae S, Imanishi K, Murayama Y, et al. [Mitotic activity of cancer cells and survival of gastric cancer patients]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi.* 1986 Jan;87(1):44–8.
367. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res.* 2012 Apr;52(1–2):89–99.
368. Joosten LAB, Heinhuis B, Netea MG, Dinarello CA. Novel insights into the biology of interleukin-32. Vol. 70. 2013. 3883–3892 p.
369. Kim K-H, Shim J-H, Seo E-H, Cho M-C, Kang J-W, Kim S-H, et al. Interleukin-32 monoclonal antibodies for Immunohistochemistry, Western blotting, and ELISA. *J Immunol Methods.* 2008 Apr;333(1–2):38–50.
370. Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, et al. Prognostic significance of IL-17 mRNA expression in peritoneal lavage in gastric cancer patients who underwent curative resection. *Oncol Rep.* 2014 Feb;31(2):605–612.
371. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(2):169–80.

372. Oue N, Sentani K, Sakamoto N, Yasui W. Clinicopathologic and molecular characteristics of gastric cancer showing gastric and intestinal mucin phenotype. *Cancer Sci.* 2015 Aug;106(8):951–958.
373. Petrelli F, Berenato R, Turati L, Mennitto A, Steccanella F, Caporale M, et al. Prognostic value of diffuse versus intestinal histotype in patients with gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Oncol.* 2017 Feb;8(1):148–163.
374. Chen Y-C, Fang W-L, Wang R-F, Liu C-A, Yang M-H, Lo S-S, et al. Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2016 Jan;22(1):197–202.
375. Venerito M, Nardone G, Selgrad M, Rokkas T, Malfertheiner P. Gastric Cancer-Epidemiologic and Clinical Aspects. *Helicobacter.* 2014 Sep;19:32–37.
376. Privratsky JR, Newman PJ. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res.* 2014 Mar;355(3):607–619.
377. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* 2016 May;23(3):253–259.
378. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS.* 2005;(94):209–31.
379. Tzoutzos K, Batistatou A, Kitsos G, Liasko R, Stefanou D. Study of microvascular density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in cancerous and precancerous lesions of the eyelids. *Anticancer Res.* 2014 Sep;34(9):4977–83.
380. Pak KH, Jo A, Choi HJ, Choi Y, Kim H, Cheong J-H. The different role of intratumoral and peritumoral lymphangiogenesis in gastric cancer progression and prognosis. *BMC Cancer.* 2015 Dec;15(1):498.
381. Zhuang P-Y, Shen J, Zhu X-D, Lu L, Wang L, Tang Z-Y, et al. Prognostic Roles of Cross-Talk between Peritumoral Hepatocytes and Stromal Cells in Hepatocellular Carcinoma Involving Peritumoral VEGF-C, VEGFR-1 and VEGFR-3. Sarkar D, editor. *PLoS ONE.* 2013 May;8(5):e64598.

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Др Младен Павловић је рођен сам 19.05.1977. у Крагујевцу. Основну и средњу школу (Прва крагујевачка гимназија) је завршио као носилац дипломе „Вук Караџић“. Медицински факултет у Крагујевцу је завршио са просечном оценом 9.71 (девет и 71/100). У току школовања више пута је награђиван као најефикаснији студент године и за постигнуте успехе у току школовања. Добитник је награде Краљевине Норвешке као један од хиљаду најбољих студената у Србији 2000. године. Од четврте године студија био је стипендиста Републичке фондације за развој научног и уметничког подмлатка. Током студија активно је учествовао у раду Катедре за Хистологију и ембриологију, у својству демонстратора. По завршеним основним студијама након уписа Докторских академских студија био је стипендиста Министарства науке и заштите животне средине, и активни учесник на пројекту Министарства из области основних истраживања бр. ОИ 1327. Усмени докторски испит из области Клиничка и експериментална хирургија положио сам 27.09.2012. са оценом 10 (десет). Од 2006. године запошљен је на Клиници за Хирургију Клиничког центра у Крагујевцу. Специјалистички испит из опште хирургије положио је 27. 01. 2014. године са одличним успехом. Био је ангажован на пројекту Министарства здравља „Развој здравства Србије“, у оквиру имплементације клиничких путева, и као активан члан Комисије за самоевалуацију Клинике за Хирургију Клиничког центра Крагујевац учествовао сам у успешно спроведеној акредитацији КЦ Крагујевац и Клинике за општу и грудну хирургију. Објавио је више публикација у часописима са рецензијом, од којих су 6 на SCI листи. Учесник је више конгреса међународног карактера, у својству аутора или коаутора, као и више семинара, симпозијума и курсева у оквиру стручног и научног усавршавања и континуиране медицинске едукације из области хирургије, ургентне и опште медицине. Члан је Лекарске коморе Србије и Хируршке секције Српског лекарског друштва. Од 2017. члан је и струковних удружења – Удружења ендоскопских хирурга Србије и Европског удружења за ендоскопску хирургију. Члан је уредништва „Медицинског часописа“ који издаје регионална подружница Српског лекарског друштва. Активно чита, пише и говори енглески и руски језик на нивоу трећег степена. Ожењен је.

1. Pavlovic M, Milosevic B, Radovanovic D, Cvetkovic A, Trifunovic B, Canovic D, Mitrovic S, Jovanovic M, Spasic M, Vulovic M, Stojanovic B, Jeremic D and Jevdjic J. Malignant fibrous histiocytoma of the right upper leg – a case report. *Vojnosanit Pregl* 2016, DOI:10.2298/VSP160512237P
2. Pavlovic M, Gajovic N, Jurisevic M, Mitrovic S, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Jovanovic I. Diverse Expression of IL-32 in Diffuse and Intestinal Types of Gastric Cancer. *Gastroenterol Res Pract*. 2018 Oct 4;2018:6578273. doi: 0.1155/2018/6578273.
3. Pavlovic Mladen, Jurisevic Milena, Gajovic Nevena, Mitrovic Slobodanka, Jovanovic Milan, Radosavljevic Gordana, Pantic Jelena, Radovanovic Dragce, Arsenijevic Nebojsa, Jovanovic Ivan. (2018). IL-32 expression associates with lymph vessel invasion in intestinal type of gastric cancer. *Vojnosanitetski pregled*. 77. 158-158. 10.2298/VSP180727158P.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Младен Павловић _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

УТИЦАЈ IL-32 НА СТВАРАЊЕ КРВНИХ СУДОВА У КАРЦИНОМУ ЖЕЛУЦА

која је одбрањена на _____ ФАКУЛТЕТУ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као
резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити
другог права интелектуалне својине других лица,
да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској
форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију
истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

у _ Крагујевцу _., _____ године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Младен Павловић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

УТИЦАЈ IL-32 НА СТВАРАЊЕ КРВНИХ СУДОВА У КАРЦИНОМУ ЖЕЛУЦА

која је одбрањена на ФАКУЛТЕТУ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Крагујевцу _____ године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>