

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Ivan Švigelj

POVEZANOST LIPIDNOM PEROKSIDACIJOM PROMIJENJENIH PROTEINA I CIKLOOKSIGENAZE DVA  
(COX-2) S RAZLIČITIM RAZVOJNIM STADIJIMA INTESTINALNOG TIPA KARCINOMA ŽELUCA

Doktorski rad

Osijek, 2026.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku      **Doktorski rad**  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Interdisciplinarni Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti  
Znanstvena polja: biologija, temeljne medicinske znanosti

### POVEZANOST LIPIDNOM PEROKSIDACIJOM PROMIJENJENIH PROTEINA I CIKLOOKSIGENAZE DVA (COX-2) S RAZLIČITIM RAZVOJNIM STADIJIMA INTESTINALNOG TIPA KARCINOMA ŽELUCA

Ivan Švagelj

Doktorski rad je izrađen u: Institut Ruđer Bošković i Opća županijska bolnica Vinkovci

Mentor: doc.dr.sc. Morana Jaganjac, znanstveni savjetnik

**Kratki sažetak doktorskog rada:** Karcinogeneza intestinalnog tipa karcinoma želuca odvija se kroz višestupanjski proces poznat kao Correa kaskada, u kojem ključnu ulogu imaju kronična upala i oksidacijski stres. Cilj ovog rada bio je utvrditi izražaj i subcelularnu lokalizaciju proteina COX-2 i 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE)-proteinskih adukata te njihovu povezanost s kliničko-patološkim parametrima i progresijom bolesti. Rezultati su pokazali da je razina 4-HNE-proteinskih adukata povišena već u ranim stadijima i odražava perzistentni oksidacijski stres, dok promjene u izražaju i lokalizaciji COX-2, osobito njegova redistribucija, omogućuju razlikovanje malignih od benignih lezija. Eksperimentalni rezultati dodatno su potvrdili ulogu 4-HNE kao redoks-ovisnog modulatora staničnih funkcija. Analizirani biomarkeri imaju potencijalnu dijagnostičku i biološku vrijednost u procjeni progresije želučane karcinogeneze.

Broj stranica: 153

Broj slika: 38

Broj tablica: 35

Broj literaturnih navoda: 194

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: COX-2, 4-HNE, karcinom želuca, oksidacijski stres, proteinski adukti

Datum javne obrane: .2026.

Povjerenstvo za javnu obranu:

1. izv. prof. dr. sc., član;
2. izv. prof. dr. sc. , član;
3. doc. dr. sc. član;
4. prof. dr. sc., zamjena člana;
5. izv. prof. dr. sc., zamjena člana

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular Biosciences**

**PhD Thesis**

**Scientific Area: Interdisciplinary field of science**  
**Scientific Fields: biology, basic medical sciences**

### **ASSOCIATION OF LIPID PEROXIDATION OF ALTERED PROTEINS AND CYCLOOXYGENASE TWO (COX-2) WITH DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES OF INTESTINAL TYPE OF GASTRIC CANCER**

**Ivan Švagelj**

**The thesis performed at: Ruđer Bošković Institute and General County Hospital Vinkovci**

**Mentor: Asst. Prof. Morana Jaganjac**

**Short summary of the doctoral thesis:** Gastric intestinal-type carcinogenesis progresses through a multistep process known as the Correa cascade, in which chronic inflammation and oxidative stress play key roles. This study aimed to assess the expression and subcellular localization of COX-2 protein and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) protein adducts, and to examine their association with clinicopathological features and disease progression. The results showed that 4-HNE-protein adducts accumulate already at early stages, pointing to persistent oxidative stress, whereas alterations in COX-2 expression and localization, particularly its redistribution, are associated with malignant transformation and may aid in distinguishing benign from malignant lesions. Experimental findings further supported the role of 4-HNE as a redox-dependent modulator of cellular functions. Together, these findings suggest that the analyzed biomarkers may have diagnostic relevance and biological significance in evaluating and monitoring the progression of gastric carcinogenesis.

**Number of pages: 153**

**Number of pictures: 38**

**Number of tables: 35**

**Number of literature citations: 194**

**Original language: hrvatski**

**Keywords: COX-2, 4-HNE, gastric cancer, oxidative stress, protein adducts**

**Date of public defense:**

**Public Defence Commission:**

- 1. Assoc. Prof. Ph.D., Member;**
- 2. Assoc. Prof. Ph.D. , Member;**
- 3. doc. Asst. Prof. Ph.D. member;**
- 4. Prof. Dr. Sc., substitute member;**
- 5. Assoc. Prof. Ph.D., substitute member**

**Thesis deposited in:** National and University Library Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb;  
City and University Library Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

*Zrinki, Šimunu, Sari i Grguru,  
ekipi koja me uvijek iznova uči  
istinskim vrijednostima.*

Ocjena rada  
u tijeku

## ZAHVALA

*Zahvaljujem tvrtki Gorrea d.o.o. na materijalnoj podršci, osobito na odobravanju popusta pri nabavi protutijela HNEJ-2, što je omogućilo provedbu ovog istraživanja.*

*Posebnu zahvalnost upućujem prof. dr. sc. Kseniji Durgo s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na ustupljenoj staničnoj liniji AGS, korištenoj u eksperimentalnom dijelu istraživanja.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Nevenu Žarkoviću, dr. med., koji je prepoznao i podržao ovu temu još dok je bila u svijetu ideja, kao i studijskoj savjetnici, prof. dr. sc. Koraljki Gall Trošelj, dr. med., na vrijednim savjetima koji su doprinijeli kvaliteti ovoga rada.*

*Posebno zahvaljujem doc. dr. sc. Morani Jaganjac na prihvaćanju mentorstva, stručnom vodstvu, razumijevanju i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovoga rada, osobito pri planiranju i provedbi eksperimentalnog dijela istraživanja, bez čije potpore, znanja i iskustva ovaj doktorat ne bi bilo moguće uspješno dovršiti.*

*Zahvalnost upućujem i doc. dr. sc. Zlatku Marušiću, dr. med. na vremenu, spremnosti da poslušna, kritički procijeni i podijeli svoje stručno mišljenje o izazovima koji su se pojavljivali tijekom istraživanja, kao i na pomoći pri prikupljanju uzoraka displazije.*

*Zahvaljujem voditeljici Odjela za patologiju i citologiju, Mirti Vučko, dr. med., voditelju laboratorija Hrvoju Jurkoviću te cjelokupnom osoblju Odjela za patologiju i citologiju na pomoći, razumijevanju i podršci bez kojih realizacija ovoga rada ne bi bila moguća.*

*Zahvaljujem ravnatelju bolnice i predstavnicima lokalne zajednice na iskustvu koje je, unatoč izostanku podrške, doprinijelo dubljem razumijevanju izazova s kojima se suočavaju mladi obrazovani ljudi koji odlaze iz Slavonije, kao i promišljanju načina kako pomoći kolegama koji će se susretati sa sličnim izazovima.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, a osobito roditeljima, na bezrezervnoj podršci i primjeru kako se voli Domovina, a pošten i uporan rad isplati.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj supruzi Zrinki i djeci na ljubavi i podršci, a osobito u one izazovne trenutke nastale tijekom izrade ovoga rada.*

*Na kraju, zahvaljujem Duhu Svetom na darovima koje sam primio i koristio kroz život, kao i tijekom izrade ovoga rada.*

1	UVOD.....	1
1.1	Karcinom želuca .....	1
1.1.1	Epidemiološki i klinički podaci .....	1
1.1.2	Kliničko-patološka obilježja karcinoma želuca .....	2
1.1.3	Histološka podjela karcinoma želuca .....	3
1.1.4	Patogeneza karcinoma želuca i histološki prekursori (Correa kaskada).....	4
1.1.5	<i>Helicobacter pylori</i> ( <i>H. pylori</i> ) u karcinogenezi želuca .....	6
1.2	Oksidacijski stres i karcinogeneza .....	8
1.2.1	Reaktivne kisikove vrste i njihovi izvori.....	8
1.2.2	Antioksidacijski obrambeni sustavi .....	9
1.2.3	Oksidacijski (di)stres i stanična hormeza .....	10
1.2.4	Uloga oksidacijskog stresa u karcinogenezi .....	11
1.3	Lipidna peroksidacija (LPO) .....	14
1.3.1	Mehanizam i biološke posljedice lipidne peroksidacije .....	14
1.3.2	Nastanak, kemijska svojstva i 4-HNE-proteinski adukti (4-HNE-PA).....	16
1.3.3	Uloga 4-HNE-a u karcinogenezi.....	17
1.4	Upala i ciklooksigenaza-2 (COX-2) .....	18
1.4.1	Kronična upala u karcinogenezi .....	18
1.4.2	Struktura i biološka funkcija COX-2.....	18
1.4.3	Regulacija i izražaj COX-2 .....	19
1.4.4	Sucelularna lokalizacija i enzimska aktivnost COX-2 .....	19
1.4.5	COX-2 u karcinomu želuca .....	20
2	CILJ .....	22
3	HIPOTEZA.....	23
4	MATERIJALI I METODE .....	24
4.1	Ispitanici .....	24
4.2	Dozvole etičkog povjerenstva .....	27
4.3	Patohistološka analiza .....	27
4.4	Imunohistokemijska analiza .....	28
4.4.1	Imunohistokemjsko određivanje prisutnosti <i>H. pylori</i> u biopstatima sluznice želuca .....	28
4.4.2	Imunohistokemjsko određivanje izražaja COX-2 i nakupljanja 4-HNE-PA .....	28
4.5	Uzgoj staničnih linija.....	34
4.5.1	Ispitivanje citotoksičnosti 4-hidroksinonenala (4-HNE) .....	35
4.5.2	Ispitivanje učinka 4-HNE na stvaranje ROS-a u stanicama karcinoma želuca.....	35
4.5.3	Procjena migracijske sposobnosti AGS stanica - test ogrebotine (engl. <i>scratch test</i> ) .....	36
4.5.4	Imunocitokemija .....	37

4.6	Statistička obrada podataka .....	37
5	REZULTATI .....	40
5.1	Deskriptivna analiza uzorka .....	40
5.2	Izražaj biomarkera duž Correa kaskade .....	45
5.2.1	Izražaj COX-2 detektiran klonom CX-294 .....	45
5.2.2	Izražaj COX-2 detektiran protutijelom SP21.....	49
5.2.3	4-HNE-PA detektirani klonom HNEJ-2.....	51
5.3	Analiza biomarkera unutar pojedinih skupina Correa kaskade.....	53
5.3.1	Atrofija .....	53
5.3.2	Intestinalna metaplazija.....	54
5.3.3	Displazija .....	56
5.4	Karcinom želuca .....	57
5.4.1	Deskriptivna analiza skupine karcinoma .....	57
5.4.2	Povezanost biomarkera s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma.....	58
5.4.3	Međusobna povezanost biomarkera u karcinomu .....	59
5.5	Eksplorativna analiza povezanosti biomarkera s kliničko-patološkim parametrima .....	60
5.5.1	COX-2 detektiran klonom CX-294 .....	60
5.5.2	Citoplazmatski izražaj COX-2 detektirana klonom SP21.....	61
5.5.3	4-HNE-PA .....	61
5.6	Modeliranje progresije duž Correa kaskade .....	65
5.6.1	Šestostupanjski model progresije .....	65
5.6.2	Trostupanjski model progresije .....	71
5.6.3	Dvostupanjski (binarni) model progresije.....	77
5.7	Stanične kulture .....	83
5.7.1	Ispitivanje citotoksičnosti 4-HNE-a na AGS stanice .....	83
5.7.2	Akutni učinak 4-HNE-a na stvaranje unutarstaničnog ROS-a .....	85
5.7.3	Učinak 24-satnog tretmana 4-HNE-om na stvaranje unutarstaničnog ROS-a .....	85
5.7.4	Procjena migracijske sposobnosti AGS stanica .....	87
5.7.5	Imunocitokemijska analiza COX-2 u kulturi AGS stanica .....	89
6	RASPRAVA.....	90
6.1	Uvodna razmatranja .....	90
6.2	Kliničko-patološka obilježja ispitanika i Correa kaskade .....	91
6.3	Izražaj i subcelularna lokalizacija COX-2 tijekom progresije Correa kaskade.....	92
6.3.1	COX-2 detektiran klonom CX-294: alteracija membranske lokalizacije.....	93
6.3.2	COX-2 detektiran klonom SP21: citoplazmatski izražaj i jezgrena redistribucija .....	93
6.3.3	COX-2 u stadijima Correa kaskade: usporedba s literaturom.....	94

6.3.4	Metodološki čimbenici koji utječu na interpretaciju COX-2 imunohistokemije .....	99
6.3.5	Izražaj COX-2 u karcinomu želuca i povezanost s kliničko-patološkim parametrima ....	101
6.4	Oksidacijski stres i uloga 4-HNE tijekom želučane karcinogeneze .....	103
6.4.1	Citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA duž Correa kaskade .....	103
6.4.2	Nakupljanje 4-HNE-PA u vrčastim stanicama intestinalne metaplazije.....	104
6.4.3	4-HNE-PA u displaziji i karcinomu želuca .....	105
6.4.4	Povezanost 4-HNE-PA s kliničko-patološkim parametrima .....	106
6.5	Multivarijatno modeliranje progresije Correa kaskade .....	108
6.5.1	Višerazinski pristup modeliranju progresije.....	108
6.5.2	Šestostupanjski model progresije .....	108
6.5.3	Trostupanjski model progresije .....	109
6.5.4	Binarni model razlikovanja benignih i malignih lezija .....	110
6.5.5	Validacija, kalibracija i klinička uporabljivost binarnog modela .....	111
6.6	Integrativno značenje modela: komplementarna uloga COX-2 i 4-HNE-PA.....	111
6.7	Funkcionalni učinci 4-HNE u in vitro modelu želučanog karcinoma .....	114
6.7.1	Učinak 4-HNE na vijabilnost AGS stanica .....	114
6.7.2	Učinak 4-HNE na stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) .....	115
6.7.3	Učinak 4-HNE na migracijsku sposobnost AGS stanica.....	117
6.7.4	Utjecaj 4-HNE na izražaj COX-2 u AGS stanicama .....	118
6.8	Zaključna razmatranja .....	120
7	ZAKLJUČAK .....	121
8	LITERATURA .....	123
9	DODATAK .....	138
10	SAŽETAK .....	147
11	SUMMARY .....	149
12	ŽIVOTOPIS .....	151

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

4-HNE - 4-hidroksi-2-nonenal

4-HNE-PA - proteinski adukti 4-hidroksi-2-nonenala

AGS - humani adenokarcinom želuca (stanična linija AGS) (engl. *human gastric adenocarcinoma cell line*)

AIC - Akaikeov informacijski kriterij (engl. *Akaike information criterion*)

ATF-2 - aktivacijski transkripcijski čimbenik 2 (engl. *activating transcription factor 2*)

AUC - površina ispod ROC krivulje (engl. *area under the curve*)

BIC - Bayesov informacijski kriterij (engl. *Bayesian information criterion*)

cagPAI - cag patogenetski otok (engl. *cag pathogenicity island*)

CI - interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

COX-2 - ciklooksigenaza 2

CRP - C-reaktivni protein

CX-294 – mišje monoklonsko protutijelo specifično za COX-2

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

HE – hematoksilin-eozin bojanje

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - vodikov peroksid

*H. pylori* - *Helicobacter pylori*

IC<sub>50</sub> - polumaksimalna inhibitorna koncentracija (engl. *half maximal inhibitory concentration*)

iNOS - inducibilna sintaza dušikova oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*)

IQR - interkvartilni raspon (engl. *interquartile range*)

JGCA - Japanska udruga za karcinom želuca (engl. *Japanese Gastric Cancer Association*)

L• - lipidni radikal

LOOH - lipidni hidroperoksid

LMM - linearni mješoviti model (engl. *linear mixed model*)

MAPK - protein-kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MDA - malondialdehid

MMP - matriks metaloproteinaza

mRNK - glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger RNA*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

N/L omjer - omjer neutrofila i limfocita (engl. *neutrophil-to-lymphocyte ratio*)

NF-κB - nuklearni čimbenik kappa B (engl. *nuclear factor kappa B*)

NRF2 – nuklearni faktor eritroid 2-povezani faktor 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

NSAID - nesteroidni protuupalni lijek (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*)

O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> - superoksidni anion

OH• - hidroksilni radikal

OR - omjer izgleda (engl. odds ratio)

p53 - tumorski supresorski protein (engl. *tumor suppressor protein p53*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PGE2 - prostaglandin E2

PGG2 - prostaglandin G2

PI3K-AKT - signalni put PI3K/AKT

RNK - ribonukleinska kiselina

RNS - reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*)

ROC – krivulja odnosa specifičnosti i osjetljivosti klasifikatora (engl. *receiver operating characteristic*)

ROS - reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SD - standardna devijacija

SEM - standardna pogreška sredine (engl. *standard error of the mean*)

SP21 – zečje monoklonsko protutijelo specifično za COX-2

Sp1 – specifični protein 1 (engl. *specificity protein 1, SP1*)

TGF - transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor*)

TME - tumorski mikrookoliš (engl. *tumor microenvironment*)

TNF-α - čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

TP53 - tumor-supresorski gen TP53 (engl. *tumor protein p53*)

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

# 1 UVOD

## 1.1 Karcinom želuca

### 1.1.1 Epidemiološki i klinički podaci

Zloćudne bolesti su vodeći uzrok prijevremenog mortaliteta do 70. godine u većini zemalja Europske Unije (EU), uključujući Republiku Hrvatsku, kao i u SAD-u, a predstavljaju značajan društveni, javnozdravstveni i gospodarski problem 21. stoljeća (1,2). Među svim zloćudnim bolestima, karcinom želuca bio je peti najčešći karcinom i peti uzrok smrti povezanih s karcinomom u svijetu u 2022. godini. Karakterizira ga izražena razlika u incidenciji prema spolu, pri čemu zauzima četvrto mjesto po incidenciji u osoba muškog, a sedmo u osoba ženskog spola, dok se najveća učestalost bilježi u starijoj populaciji, osobito nakon 60. godine života (1). Također, poznato je da karcinom želuca pokazuje značajne geografske varijacije, s najvišom stopom incidencije u Istočnoj Aziji (Kina i Japan), Istočnoj Europi te Srednjoj i Južnoj Americi (3). U Republici Hrvatskoj je u 2023. godini karcinom želuca bio osmi najčešći maligni tumor među muškarcima (3,5 % svih novooboljelih) i šesti uzrok smrti od malignih bolesti, dok je kod žena zauzimao jedanaesto mjesto po incidenciji (≈3 % svih novooboljelih) te šesto mjesto po mortalitetu (2). Štoviše, prema hrvatskim podacima za 2024. godinu, nalazio se na petom mjestu među uzrocima prijevremenog mortaliteta od tumora (2). Osim geografske raspodjele, karcinom želuca karakterizira i specifična anatomska raspodjela unutar samog organa. U oko 80% slučajeva se javlja u distalnom dijelu želuca (tj. u području tijela želuca, antruma i pilorusa), a većina navedenih je lokalizirana u području antruma i/ili pilorusa (4). Karcinom želuca je, u pravilu, bez simptoma u ranom stadiju, a najčešći simptomi su probavne smetnje (dispepsija), anoreksija (slab apetit) ili rano osjećanje sitosti, gubitak težine i bol u trbuhu, dok se disfagija ili regurgitacija želučanog sadržaja mogu pojaviti kod proksimalnog karcinoma želuca ili karcinoma smještenog na spoju jednjaka i želuca. Jedan od ranih pokazatelja bolesti može biti i anemija koja može biti prisutna kod karcinoma koji krvare. Nažalost, ako su simptomi prisutni u trenutku postavljanja dijagnoze, bolest je vrlo često uznapredovala i neizlječiva (5). Zlatni standard za postavljanje dijagnoze karcinoma želuca jest endoskopski pregled (gastroskopija), uz preporučenu primjenu virtualne kromoendoskopije (engl. *virtual chromoendoscopy*), tijekom kojeg se određuje lokalizacija tumora u želucu i njegov makroskopski tip te uzimaju ciljane biopsije za histološku potvrdu dijagnoze (6). Na temelju smjernica najnovijeg izdanja Unije za međunarodnu kontrolu raka (engl. *Union for International Cancer Control*, UICC) i Američkog zajedničkog odbora za rak (engl. *The American Joint Committee on Cancer*, AJCC) definira se klinički stadij koji određuje hoće li pristup liječenju biti kurativan ili palijativan (7,8). U liječenju karcinoma želuca koristi se kemoterapija (neo-adjuvantna i postadjuvantna), imunoterapija i

kirurška resekcija, a o njihovoj upotrebi, redoslijedu, vrsti i trajanju se odlučuje na multidisciplinarnom konziliju za tumore na kojemu, prije određivanja smjera liječenja, svi pacijenti moraju biti prezentirani (9).

### 1.1.2 Kliničko-patološka obilježja karcinoma želuca

Karcinom želuca je zloćudni tumor koji najčešće potječe iz epitela želučane sluznice. U približno 90 % slučajeva pokazuje žljezdanu diferencijaciju te se stoga klasificira kao adenokarcinom (aden (grč. *ἀδήν*, *adēn*) = žlijezda; karcinom (grč. *καρκίνος*, *karkinos*) = zloćudni epitelni tumor; oma (grč. *-ωμα*, *-ōma*) = tvorba). Etiologija karcinoma želuca je višestruka. Većina slučajeva (oko 90 %) javlja se sporadično, dok se približno 10 % pojavljuje u obiteljskom kontekstu, pri čemu je 1-3 % slučajeva povezano s nasljednim sindromima (6,9). Istraživačka mreža projekta Atlas genoma karcinoma (engl. *The Cancer Genome Atlas*) identificirala je četiri molekularno različita podtipa karcinoma želuca: Epstein-Barr virus pozitivni tumori, tumori s visokom mikrosatelitnom nestabilnošću (engl. *microsatellite instability-high*), genomski stabilni tumori te tumori s kromosomskom nestabilnošću (engl. *chromosomal instability*) (10). Svaki od ovih podtipova obilježen je specifičnim molekularnim promjenama, uz određeno preklapanje između pojedinih skupina, no ova klasifikacija zasad nema izravnu terapijsku implikaciju. Prema proširenosti zloćudnog tkiva u stijenci želuca, karcinom želuca klasificira se na rani (engl. *early gastric carcinoma*) i uznapredovali (engl. *advanced gastric carcinoma*).

#### a) Rani karcinom želuca

Definiran je kao invazivni, najčešće dobro diferencirani, adenokarcinom ograničen na sluznicu ili podsluznicu, neovisno o postojanju proširenosti bolesti u limfne čvorove (11). Nadalje, rani karcinom se makroskopski, na temelju izgleda tijekom endoskopije (Pariška klasifikacija), može podijeliti na tri tipa: protrudirajući (I), plosnati/površinski (II) i ekskavirajući (III), a tip II se dalje dijeli na IIa (uzdignut), IIb (plosnat) i IIc (udubljen). Također, tipovi I i IIa su povezani s manjom vjerojatnošću proširenosti bolesti u limfne čvorove u usporedbi s višim stadijima (12). Na temelju ranije spomenute Pariške klasifikacije, veličine lezije, postojanja ulceracije, morfološkog podtipa i diferencijacije karcinoma razmatrat će se između opcija neoadjuvantne kemoterapije ili endoskopske resekcije, odnosno subtotalne i totalne kirurške resekcije želuca kao najboljeg izbora liječenja (9).

#### b) Uznapredovali karcinom želuca

Definiran je kao tumor koji invadira stijenku želuca preko podsluznice, odnosno zahvaća mišićni sloj stijenke (*muscularis propria*) (11). Većina pacijenata su muškarci (omjer muškarci : žene = 2:1) između 60. i 80. godine života (13), a za razliku od ranog karcinoma, često su prisutni ranije navedeni simptomi. Makroskopski se može podijeliti prema Borrmannovoj klasifikaciji na: polipoidni (tip I), ekskavirajući s oštro ograničenim i uzdignutim rubovima (tip II), ulcerirani bez

jasnih granica s infiltracijom baze (tip III) i difuzno infiltrirajući (tip IV) (14). Iako je dokazana prognostička vrijednost ove klasifikacije, ona nema značaj u izboru terapije. Do nedavno je kirurška resekcija bila jedini terapijski postupak u ovom stadiju bolesti, no danas standard predstavlja multimodalni pristup koji uključuje perioperativnu (neoadjuvantnu i adjuvantnu) kemoterapiju, radioterapiju i kirurško liječenje. S druge strane, prošireni (metastatski) karcinom želuca liječi se sustavnom terapijom koja uključuje kemoterapiju, ciljanu terapiju i imunoterapiju, dok se kirurško liječenje primjenjuje samo u manjem broju pažljivo odabranih bolesnika (9). Za razliku od 5-godišnjeg preživljenja pacijenata s ranim karcinomom koje iznosi oko 90%, petogodišnje preživljenje ovih pacijenata iznosi tek oko 20%, no multimodalno onkološko liječenje koje uključuje nove biološke (tzv. „pametne“) lijekove i imunoterapiju, zajedno s kemoterapijom, u određenih pacijenata, može povećati vjerojatnost preživljenja (9,11,14).

### 1.1.3 Histološka podjela karcinoma želuca

Intratumoralna i intertumoralna heterogenost histološke morfologije karcinoma želuca je dobro poznata (15), a upravo je ona vjerojatan razlog različitih histopatoloških klasifikacijskih sustava koji se danas koriste. Laurénova klasifikacija (16) i klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) (4) najčešće se koriste izvan Japana u kojemu pak, Japanska udruga za karcinom želuca (engl. *Japanese Gastric Cancer Association*, JGCA) (17), preporučuje histološki sustav tipizacije koji je sličan, ali ne i identičan WHO klasifikaciji (Tablica 1). Postoje i ostale podjele, od kojih su neke pokušaj povezivanja određene patološke karakteristike tumora s njegovom prognozom kao npr. Nakamura klasifikacija (18), koja dijeli karcinom želuca u dvije skupine: diferencirani i nediferencirani (Tablica 1). Laurénova klasifikacija prepoznaje dvije glavne vrste karcinoma želuca: intestinalni tip i difuzni tip. Intestinalni tip karakteriziraju tubularne ili papilarne strukture, dok je difuzni tip definiran slabo kohezivnim tumorskim stanicama koje infiltriraju tkivo i mogu, ali ne moraju, imati morfologiju stanica prstena pečatnjaka. Tumori koji sadrže elemente oba tipa nazivaju se mješani karcinomi, dok se oni koji ne pripadaju nijednoj od tih kategorija svrstavaju u neodređene (16). Iako potječe iz 1965. godine, Laurénova klasifikacija ostaje široko prihvaćena jer jasno razdvaja podtipove karcinoma s različitim epidemiološkim značajkama, kliničko-patološkim karakteristikama i biološkim ponašanjem (19). Ovi podtipovi također pokazuju različite obrasce širenja tako da intestinalni tip obično metastazira putem krvi prema jetri, dok se difuzni češće širi izravno prema peritoneumu (20). Intestinalni tip karcinoma želuca češći je oblik sporadičnog karcinoma u usporedbi s difuznim tipom, najčešće je lokaliziran u antralno-piloričnom području, a histološki se sastoji od žljezdanih (tubularnih ili papilarnih) struktura odnosno solidnih nakupina atipičnih epitelinih tumorskih stanica što ovisi o stupnju diferencijacije karcinoma (Tablica 1). Difuzni tip karcinoma želuca rjeđi je oblik sporadičnog karcinoma

i obično je povezan s lokalizacijom u korpusu, uz tendenciju ranijeg pojavljivanja. Mucinozni tip karcinoma, iako još rjeđi, karakteriziran je izraženom malignom žljezdanom komponentom koja proizvodi značajnu količinu sluzi, po definiciji, čineći više od 50% ukupne tumorske mase. Učestalost miješanog tipa karcinoma značajno varira, a ovaj tip karakteristično sadrži kombinaciju žljezdane komponente i slabo kohezivne komponente, najčešće stanica prstena pečatnjaka (4). Osim toga, mješoviti tip karcinoma želuca ima lošiju prognozu u usporedbi s jednim ili drugim tipom te pokazuje dvostruki obrazac širenja tj. metastaziranja (21). Opisane su još neke, vrlo rijetke, histološke podvrste karcinoma želuca koje razlikuje WHO klasifikacija, a nabrojane su u Tablici 1.

Tablica 1. Prilagođeno prema tablici preuzetoj iz WHO Classification of Tumours Editorial Board, editor. Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours. 5th Edition. Lyon: World Health Organization; 2019. (4)

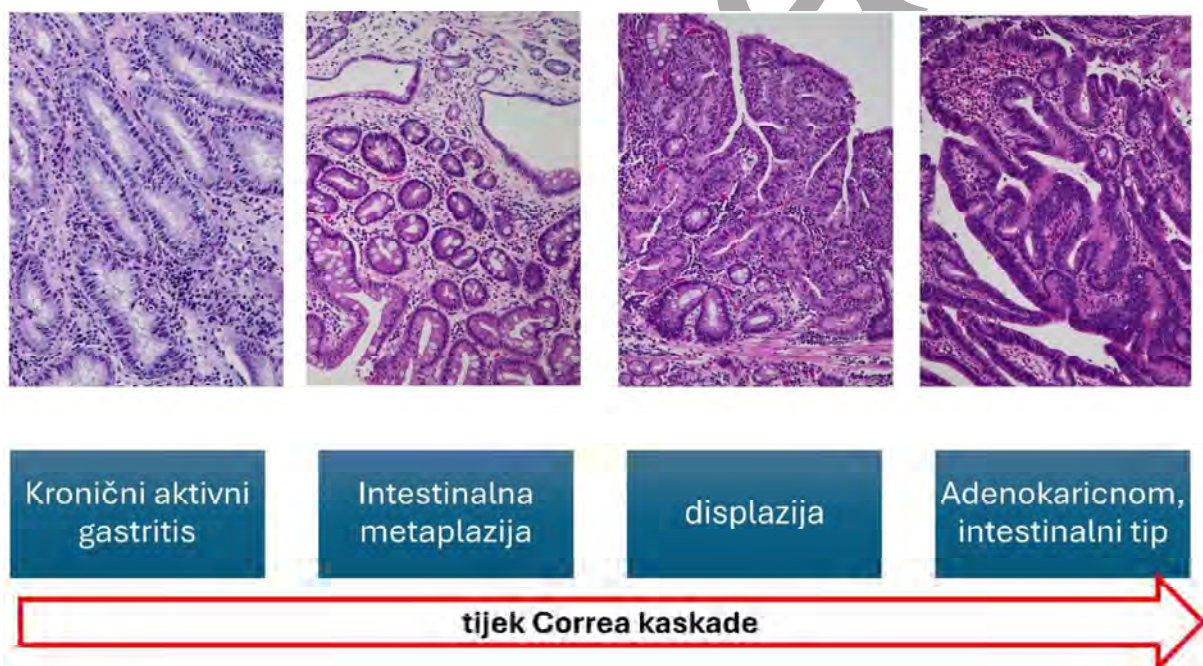
Laurén (1965)	Nakamura et al. (1968)	JGCA (2017)	WHO (2019)
<b>Intestinalni tip</b>	<b>Diferencirani tip</b>	Papilarni (pap)	Papilarni adenokarcinom
		Tubularni, dobro diferencirani (tub1)	Tubularni adenokarcinom, dobro diferenciran
		Tubularni, umjereno diferencirani (tub2)	Tubularni adenokarcinom, umjereno diferenciran
<b>Difuzni tip</b>	<b>Nediferencirani tip</b>	Slabo diferencirani - solidni (por1)	Slabo kohezivni karcinom
		Slabo diferencirani - nesolidni (por2)	Slabo kohezivni karcinom s fenotipom stanica prstenastog pečata
		Karcinom stanica prstena pečatnjaka (sig)	Karcinom stanica prstena pečatnjaka
<b>Miješani / neodređeni</b>	—	Mucinozni (muc)	Mucinozni adenokarcinom
		Mješoviti	Mješoviti adenokarcinom
			<b>Ostali histološki podtipovi</b>
			Adenoskvamozni karcinom
			Karcinom pločastih stanica
			Nediferencirani karcinom
			Karcinom s limfoidnom stromom
			Hepatoidni adenokarcinom
			Adenokarcinom s enteroblastičnom diferencijacijom
			Adenokarcinom tipa fundičnih žlijezda
			Mikropapilarni adenokarcinom

#### 1.1.4 Patogeneza karcinoma želuca i histološki prekursori (Correa kaskada)

Razvoj sporadične displazije i karcinoma sluznice želuca složen je, višestruki proces pod utjecajem okolišnih čimbenika i čimbenika predispozicije povezanih s domaćinom (22,23). Danas se smatra da, u većini slučajeva, dugotrajna infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) inducira upalu i potiče oslobađanje pro-upalnih citokina što uzrokuje kronični gastritis (24). Dugotrajna upala želučane

sluznice može potaknuti fenotipske promjene poput fibroze *lamine propriae* (zamjena gubitka žlijezda vezivnim tkivom) i/ili metaplastične transformacije izvornih žlijezda (mukozno-sekretornih ili oksintičnih) (11). Ove promjene dovode do atrofije sluznice tj. gubitka žlijezda karakterističnih za izvorni anatomske dio želuca te stoga definicija atrofije sluznice obuhvaća i nestanak i metaplastičnu (intestinalnu i/ili pseudopiloričnu) transformaciju izvornih žlijezda (25). Atrofija sluznice (bilo kojeg histološkog podtipa) dovodi do funkcionalnih promjena koje utječu na proizvodnju kiseline i lučenje pepsinogena i gastrina (26) pa su stoga obje vrste metaplazije, intestinalna i pseudopilorična, povezane s povećanim rizikom od nastanka karcinoma želuca, a smatraju se *prekanceroznim stanjima* želučane sluznice (27,28). Ozbiljnost atrofije žlijezda odražava opseg zahvaćenosti želučane sluznice, pri čemu veća proširenost lezija nosi veći rizik za razvoj karcinoma želuca (6). Anatomska raspodjela atrofije (antralna ili korpusna/oksintična) odražava etiologiju upalnog procesa, pri čemu je antralno dominantna atrofija najčešće povezana s infekcijom *H. pylori*, dok je korpusno dominantna atrofija tipična za autoimuni gastritis (29). Iz literature je dobro poznata veza intestinalne metaplazije s intestinalnim podtipom karcinoma želuca dok je izravna uloga pseudopilorične metaplazije u karcinogenezi karcinoma želuca spornija, ali je poznato da ona može napredovati prema intestinalnoj metaplaziji i, posljedično, intestinalnom tipu karcinoma (30,31). Postoje dva podtipa intestinalne metaplazije: tip tankog crijeva (kompletna metaplazija) i tip debelog crijeva (nekompletna metaplazija). Intestinalna metaplazija također se može podijeliti prema histokemiji mucina na tip I (kompletna, tip tankog crijeva, izlučuje sialomucin) i tip II ili III (nekompletna, tip debelog crijeva, dodatno podijeljena prema izlučivanju sialomucina i/ili sulfomucina) (11). Istraživanja su pokazala kako je tip III intestinalne metaplazije najosjetljiviji na neoplastičnu transformaciju (4). Zbog izravne korelacije između veličine površine zahvaćene intestinalnom metaplazijom, kao i intestinalne metaplazije bogate sulfomucinom, smatra se da je proširenost intestinalne metaplazije pouzdan pokazatelj rizika od karcinoma želuca (28,32). Prvi, nedvojbeno neoplastični korak u Correa kaskadi jest želučana displazija koja može biti udubljena, ravna ili uzdignuta, a po definiciji ne invadira podležću stromu (4,11). Radi se o intraepitelnoj leziji koja pokazuje različite kombinacije histoloških promjena povezanih s displastičnim fenotipom kao što su atipija epitelnih stanica (karakterizirana gubitkom polarizacije, promjenom cilindričnog u kubični oblik stanice s povećanim omjerom jezgre i citoplazme te prominentnom jezgričicom i brojnim, mjestimice atipičnim, mitozama), nepravilna diferencijacija i poremećaj arhitekture sluznice (11,28). Prema razini diferencijacije displazija se gradira dvostupanjski na lezije niskog i lezije visokog stupnja, a stupanj dediferencijacije izravno je povezan s rizikom od razvoja karcinoma (4). Bez obzira na razlike u klasifikaciji, patolozi diljem svijeta slažu se oko neoplastičnog karaktera želučane displazije, što je potkrijepljeno njezinom dediferenciranom morfoloijom, molekularnom deregulacijom i snažnom povezanošću s rizikom od progresije u karcinom te se ona, za razliku od atrofije i intestinalne metaplazije, smatra *prekanceroznom lezijom* (28). Ovaj proces, koji kreće iz

kroničnog gastritisa i napreduje kroz faze atrofije sa smanjenom proizvodnjom želučane kiseline te preko intestinalne metaplazije i displazije dovodi do adenokarcinoma želuca nosi naziv Correa kaskada ili Correa model karcinogeneze (Slika 1), a naziv je dobio po autoru Pablu Correi koji ju je prvi opisao i objavio (33–35). Treba istaknuti da svi navedeni koraci, u pravilu, započinju i razvijaju se u području vrata antralnih ili fundalnih žlijezda, što podupire hipotezu da su prekursorske stanice smještene upravo u tim regijama tzv. mukozne stanice vrata (engl. *mucous neck cells*) (36,37). Ipak, Correa model ne objašnjava sve karcinogene putove, jer se neki adenokarcinomi razvijaju u neintestinaliziranoj sluznici, zadržavajući želučani fenotip kao npr. adenokarcinom tipa fundičnih žlijezda.



Slika 1. Correa kaskada (hematoksilin eozin (HE); 10x). Slijed fotomikrografija koje prikazuju teoretski proces karcinogeneze intestinalnog tipa adenokarcinoma želuca koji započinje kroničnim gastritisom, napreduje preko intestinalne metaplazije i displazije epitelnih stanica i završava adenokarcinomom želuca.

#### 1.1.5 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) u karcinogenezi želuca

Razmatranje sporadičnog karcinoma želuca neizostavno uključuje infekciju bakterijom *H. pylori*, budući da se približno 90 % slučajeva može povezati s kroničnim gastritisom uzrokovanim ovom bakterijom. *H. pylori* je gram-negativna, mikroaerofilna spiralna bakterija koja kolonizira želučanu sluznicu i inficira više od polovice svjetske populacije. Njezina kolonizacija inducira proinflamatorni odgovor epitelnih stanica i regrutaciju upalnih stanica u sluznicu želuca, što dovodi do razvoja kroničnog gastritisa. Dugotrajna infekcija može napredovati prema težim komplikacijama, uključujući peptičku ulkusnu

bolest, želučani adenokarcinom i MALT limfom (od engl. *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*) (29). Iako manje od 5% sveukupno zaraženih osoba u konačnici razvije karcinom, 1994. godine *H. pylori* klasificiran je kao biološki karcinogen skupine jedan prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (38,39). Razlog navedenom su različiti složeni mehanizmi bakterijske virulencije i njihova interakcija s genetski predisponiranim imunološkim sustavom domaćina te okolišnim čimbenicima (40). Određeni sojevi *H. pylori* virulentniji su te su snažnije povezani s povećanim rizikom razvoja karcinoma želuca. Infekcija sojevima *H. pylori* koji sadrže tzv. *cag patogenetski otok* (engl. *cag pathogenicity island*, CagPAI) izaziva znatno jaču upalnu reakciju u odnosu na CagPAI-negativne sojeve te se smatra jednim od najvažnijih čimbenika rizika za razvoj karcinoma želuca. CagPAI-pozitivni sojevi sadrže gene koji kodiraju komponente proteinskog kompleksa CagT4SS (engl. *type IV secretion system*), koji nakon adhezije bakterije omogućuje izravan prijenos određenih molekula iz bakterije *H. pylori* u epitelne stanice želučane sluznice domaćina. Jedna od takvih molekula je i citotoksin-povezani protein A (engl. *cytotoxin-associated gene A*, CagA), također kodiran genom *cagPAI*, koji nakon fosforilacije u stanici domaćina dovodi do aktivacije onkogeno, supresije tumorsupresorskih gena te povećanja razine reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, što posljedično može doprinijeti inicijaciji neoplazije (24,41). Također, sojevi koji proizvode vakuolizirajući citotoksin A (engl. *vacuolating toxin*), preko indukcije apoptoze ili nekroze, indukcije autofagije te supresije B- i T-limfocita, utječu na supresiju imunološkog odgovora domaćina promovirajući toleranciju na *H. pylori* (42). S druge strane, genetski čimbenici domaćina, uključujući jednonukleotidne polimorfizme (engl. *single nucleotide polymorphisms*) u genima povezanim s upalom (npr. IL1B, TNF), također igraju ulogu u riziku razvoja karcinoma, s prepoznatim specifičnim genomskim profilima u *H. pylori*-povezanim karcinomima želuca (15,40,43). Ostali dobro poznati okolišni čimbenici u patogenezi karcinoma želuca uključuju infekciju Epstein-Barr virusom, pušenje te prehranu bogatu solju (npr. sušena ili soljena riba, dimljeno meso, sojin umak i ukiseljena hrana) i siromašnu mikronutrijentima, vitaminima i antioksidansima, koja pogoduje nastanku genotoksičnih spojeva poput N-nitrozamina (44,45). Nasuprot tome, prehrana bogata svježim povrćem, citrusnim voćem i askorbinskom kiselinom povezana je s manjim rizikom od razvoja karcinoma želuca (11,44).

Iako se smatralo da globalni pad incidencije karcinoma želuca korelira sa smanjenjem infekcije *H. pylori* (11), novije studije to demantiraju (40). Osobe zaražene bakterijom *H. pylori* imaju šest puta veći rizik od razvoja želučanih lezija, osobito ako je infekcija započela u ranom djetinjstvu (46,47). Osim atrofije, koja predstavlja važan korak u Correa kaskadi nastanka karcinoma želuca, smanjena proizvodnja želučane kiseline može omogućiti rast drugih bakterijskih zajednica koje također mogu sudjelovati u karcinogenezi (6). U bolesnika s karcinomom želuca opisana je disbiotička mikrobna zajednica s

genotoksičnim potencijalom koja se razlikuje od mikrobiote prisutne u bolesnika s kroničnim gastritisom (48,49).

S obzirom na navedeno, u svrhu prevencije karcinoma želuca, infekciju bakterijom *H. pylori* je potrebno liječiti tj. eradicirati, no prije toga treba postaviti točnu dijagnozu (6). Metode detekcije ove bakterije dijelimo na invazivne i neinvazivne. Invazivni testovi zahtijevaju uzorke biopsije uzete tijekom gastroskopije i uključuju brzi ureaza test, histološki pregled, bakterijsku kulturu i izravno otkrivanje genetskog materijala *H. pylori* pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), kvantitativnog PCR-a ili fluorescentne in situ hibridizacije. Neinvazivne metode uključuju 13C-urea izdisajni test, serološku detekciju anti-*H. pylori* antitijela, test antigena u stolici i izravno otkrivanje genetskog materijala *H. pylori* u stolici pomoću PCR-a (39). Plan liječenja infekcije *H. pylori* ovisi o kliničkoj slici bolesnika, lokalnim obrascima antibiotske rezistencije te dostupnosti testiranja osjetljivosti bakterije na antibiotike. Prema Maastricht VI / Florence smjernicama, preporučuje se, kada je moguće, provesti testiranje osjetljivosti prije započinjanja terapije, no takav pristup još uvijek nije rutinski dostupan u svakodnevnoj kliničkoj praksi. U područjima s visokom (>15 %) ili nepoznatom rezistencijom na klaritromicin kao prva linija liječenja preporučuje se bizmutna četverostruka terapija (inhibitor protonske pumpe, bizmut, tetraciklin i metronidazol), dok se u područjima s niskom rezistencijom može primijeniti klasična trojna terapija koja uključuje inhibitor protonske pumpe, amoksisilin i klaritromicin (29). Infekcija bakterijom *H. pylori*, osim kliničkog značaja u kontekstu liječenja, predstavlja ključni inicijalni događaj u razvoju kronične upale želučane sluznice, čime započinje kaskada molekularnih promjena uključenih u karcinogenezu želuca.

## 1.2 Oksidacijski stres i karcinogeneza

### 1.2.1 Reaktivne kisikove vrste i njihovi izvori

Oksidacijski stres uzrokovan je relativnim suviškom reaktivnih kisikovih (ROS, engl. *reactive oxygen species*) i dušikovih (RNS, engl. *reactive nitrogen species*) vrsta u odnosu na sustave antioksidansa. Kada je navedeni suvišak strogo kontroliran i predstavlja dio urednog funkcioniranja stanice, definira se kao eustres, no kada suvišak ROS-a postane takav da dovodi do poremećaja homeostatske ravnoteže koristimo pojam distress (50). ROS i RNS predstavljaju skupinu reaktivnih molekula kisika i dušika koje mogu biti slobodni radikali ili neradikalni oksidansi. Slobodni radikali su nestabilni zbog prisutnosti jednog ili više nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci (24). Osim prema stabilnosti, različite reaktivne kisikove vrste se razlikuju prema svojoj reaktivnosti i sposobnosti difuzije. Među njih se ubrajaju slobodni radikali kisika, poput superoksidnog aniona ( $O_2^{\bullet-}$ ) i hidroksilnog radikala ( $OH^{\bullet}$ ), kao i neradikalni oksidansi poput vodikova peroksida ( $H_2O_2$ ) i hipokloritne kiseline (51). Važno je naglasiti da pojedine ROS vrste mogu međusobno prelaziti iz jednog oblika u drugi, čime se mijenjaju njihova

kemijska svojstva, uključujući stabilnost, reaktivnost i sposobnost difuzije kroz stanicu i tkiva. S druge strane, RNS predstavlja dušikov monoksid ( $\text{NO}^\bullet$ ), koji može reagirati sa  $\text{O}_2^{\bullet-}$  stvarajući peroksininitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), visoko reaktivan oksidans uključen u oksidacijska i nitrozativna oštećenja stanice (52,53).

Glavni unutarstanični izvori ROS-a u stanju homeostaze uključuju: 1) prijenos elektrona na  $\text{O}_2$  koji se odvija u respiracijskom lancu za vrijeme oksidativne fosforilacije (52,54,55); 2) redukciju  $\text{O}_2$  u  $\text{O}_2^{\bullet-}$  putem nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze tijekom prijenosa signala čimbenika rasta (52,56) i 3) proizvodnju  $\text{H}_2\text{O}_2$  koja se događa tijekom savijanja proteina u endoplazmatskoj mrežici (57). Ostali, manje značajni izvori ROS-a, tijekom eustresa, uključuju aktivnosti enzima poput citokroma P450, monoamin oksidaze, ksantin oksidaze, ciklooksigenaze, glikolat oksidaze, hidroksikiselinske oksidaze, aldehid oksidaze i oksidaze aminokiselina (24,55,58). Važno je naglasiti da visoko reaktivni  $\text{HO}^\bullet$  može nastati i iz  $\text{H}_2\text{O}_2$  putem Fentonove reakcije, koja uključuje i prijelazne metale poput željeza, bakra ili mangana (51,53,59). Dušikov monoksid ( $\text{NO}^\bullet$ ), ranije spomenuti predstavnik RNS-a, je mala molekula koja sudjeluje u različitim biološkim procesima kao neurotransmitor, vazodilatator itd., a proizvodi se iz L-arginina pomoću dušikove oksid sintetaze (engl. *nitric oxide synthase*, NOS)(53). Osim toga, tijekom upale dolazi do inkucije izoenzima iNOS koja je najzastupljenija u makrofagima, a odgovorna je za većinu proizvodnje  $\text{NO}^\bullet$  tijekom upale (60). Uloga ROS-a u stanju homeostaze jest da posreduju u kaskadi staničnih puteva koji su povezani s proliferacijom stanica, a najznačajniji primjeri su nizvodni putevi inzulinu sličnog čimbenika rasta ovisnim (od engl. *insulin like growth factor*), aktivacija kanala receptora prolaznog potencijala (engl. *transient receptor potential channels*) te modifikacija cisteinskih nastavaka RAS (od engl. *rat sarcoma*) proteina koja rezultira njihovom aktivacijom (61).

### 1.2.2 Antioksidacijski obrambeni sustavi

Slijedom navedenog jasno je kako su najvažniji izvori ROS-a produkti normalnog metabolizma, a stanica ih koristi kao unutarstanične signalne molekule, pogotovo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no potomje se odvija samo u usko kontroliranom rasponu (eustres) koji se održava putem sustava antioksidansa (52,53). Sustav antioksidansa je naziv za različite molekule koje sprječavaju nekontrolirano nakupljanje ROS i RNS unutar stanice te na taj način onemogućuju njihovo štetno djelovanje, a s druge strane, reguliraju signalne procese posredovane putem ROS-a. S obzirom na način djelovanja te vrstu molekula koje neutraliziraju antioksidanse dijelimo na: 1) male ne-katalitičke molekule koje direktno neutraliziraju ROS i RNS, a mogu biti endogene kao npr. glutation (vrlo značajan za održavanje homeostaze), zatim bilirubin, melatonin, melanin i urična kiselina ili egzogene kao vitamini C i E(62), 2) katalitički enzimi koji neutraliziraju  $\text{O}_2^{\bullet-}$  u  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$ , a uključuju citosolnu bakar/cink superoksid dismutazu (SOD1, Cu/ZnSOD), mitohondrijsku mangan superoksid dismutazu (SOD2, MnSOD) i izvanstaničnu superoksid dismutazu (SOD3, EC-SOD) (53,63), 3) enzimi koji neutraliziraju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i to ili u  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$  kao katalaza i peroksiredoksini

zajedno s tioredoksinima ili u H<sub>2</sub>O kao glutation peroksidaza koja prema određenim istraživanjima neutralizira do 90% staničnog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (53,61), dok Sies i sur. tvrde da većinu ROS-a unutar stanica ipak neutraliziraju superoksid dizmutaze (52). Postoji i skupina neizravnih antioksidansa, među kojima se ističu sestrini, koji potiču aktivaciju jezgrenog eritroidnog čimbenika 2-srodnog transkripcijskog čimbenika (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, NRF2) i inhibiraju mTORC1 (od engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*), proteini koji izoliraju ili prenose prijelazne metale, pa na taj način onemogućavaju odvijanje Fentonove reakcije, zatim razni enzimi koji metaboliziraju lijekove poput aldehid dehidrogenaze te sirtuini koji kao npr. sirtuin 3 katalizira deacetilaciju SOD2 te na taj način poboljšava učinkovitost neutraliziranja O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (61).

### 1.2.3 Oksidacijski (di)stres i stanična hormeza

Povećanje reaktivnih jedinki unutar stanice može biti uzrokovano vanjskim agensima kao što su zračenje (ultraljubičasto ili rendgensko), ozon, bakterije i virusi, cigaretni dim, lijekovi ili unutarnjim povećanjem proizvodnje ROS-a pojačavanjem ranije navedenih aktivnosti (24,51). Neovisno o uzorku, povećana količina ROS/RNS-a koja dovodi do poremećaja homeostatske ravnoteže, odnosno distresa stanice koja na to odgovara različitim mehanizmima (52). Ukoliko navedeno povećanje rezultira vrlo velikim suviškom ROS-a doći će do citotoksičnog učinka odnosno unutar stanice će se aktivirati mehanizmi koji će ju odvesti prema apoptozi, ferroptozu ili starenju. U svakom slučaju, neovisno o količini suviška ROS-a, primarni odgovor stanice na kratkotrajni oksidacijski stres dovodi do metaboličkog reprogramiranja stanice, gdje se povećanje proizvodnje NADPH, koji održava glutation i tioredoksin u reduciranom stanju, postiže preko glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze, odnosno preusmjerenjem metabolizma glukoze prema putu pentoza fosfataze. Ukoliko se povećana proizvodnja ROS-a nastavi u netoksičnim koncentracijama dolazi do redoks promjene (engl. *switch*) proteina poput glicerinaldehid 3 - fosfat dehidrogenaza i piruvat kinaze M2 čime se inhibira njihova aktivnost te oni dalje blokiraju glikolizu i još više preusmjeravaju katabolizam glukoze kroz put pentoza fosfataze te posljedično tome dodatno povećavaju proizvodnju NADPH (64). Ukoliko stanica ostaje izložena kroničnom oksidacijskom opterećenju, karakteriziranom nakupljanjem endogenih elektrofila (poput 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE)) i/ili iscrpljenjem glutation- i tioredoksinog antioksidacijskog sustava, dolazi do transkripcijskog reprogramiranja, odnosno pojačane izražajnosti gena uključenih u antioksidacijsku obranu. Među navedene gene pripadaju brojni transkripcijski čimbenici poput aktivator-proteina 1 (engl. *activator protein 1*), hipoksijom induciranog čimbenika 1 alfa (engl. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*), čimbenika toplinskog šoka 1 (engl. *heat shock factor 1*), jezgrenog čimbenika κB (engl. *nuclear factor kappa B*, NF-κB), NRF2 i proteina p53 (53). Smatra se da je malo vjerojatno da svi navedeni transkripcijski čimbenici djeluju simultano, već da je njihova aktivacija ovisna o koncentraciji i trajanju oksidacijskog stresa, kao i o istodobnoj prisutnosti drugih stanja poput upale, hipoksije, metaboličkog ili proteotoksičnog stresa

te oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Prema jednoj od teorija, NRF2 predstavlja prvi stup obrane koji se aktivira pri umjerenom porastu ROS-a. Njegovim iscrpljivanjem ili nedostatnom aktivnošću dolazi do aktivacije dodatnih redoks-osjetljivih transkripcijskih čimbenika, poput aktivator proteina 1 i NF- $\kappa$ B, koji čine drugi stup obrane. Daljnje povećanje razine ROS-a dovodi do aktivacije puta posredovanog proteinom p53, što rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa te usmjeravanjem stanice prema staničnom starenju ili apoptozi (53).

Utjecajem na pojedine komponente stanice, oksidacijski stres rezultira nizom različitih posljedica za stanicu. Jedna od posljedica oksidacije molekule DNK je njezina nestabilnost i posljedično pucanje što dovodi do velikih neželjenih promjena, kako u jezgrenoj tako i u mitohondrijskoj DNK (52,53). Među bazama DNK, gvanin je najpodložniji oksidacijskim oštećenjima, a najznačajnija mutagena lezija je 8-okso-7,8-dihidrogvanina (također nazvana 8-oksogvanin ili 8-hidroksigvanin), koja se uparuje s adeninom umjesto s citozinom i tako generira transverzijske mutacije nakon replikacije (24,53). Osim toga, ribonukleinska kiselina (RNK) je također podložna oksidaciji, a promjene koje imaju utjecaj na patološke procese su opisane kod oksidacija različitih mikroRNK molekula koje utječu na apoptozu (51,52). Nadalje, proteini, najbrojnije molekule i nositelji obavljanja ključnih funkcija unutar stanice, također su podložni oksidacijskom stresu, a učinci oksidacije očituju se promjenama poput oksidacije aminokiselinskih ostataka, denaturacije proteina, cijepanja peptidnih veza i formiranja proteinskih agregata (24). Navedene promjene proteina uzrokuju gubitak strukturalnog integriteta i/ili konformacijske promjene što vrlo često rezultira promjenama u obavljanju zadanih funkcija čiji učinci mogu imati različite posljedice za sudbinu stanice (24). Treća velika grupa makromolekula su lipidi, a njihov neposredni kontakt s ROS/RNS dovodi do oksidacijskog oštećenja lipida i to posebice višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids*) tj. onih koje sadrže dvije ili više dvostruke veze između ugljikovih atoma (51).

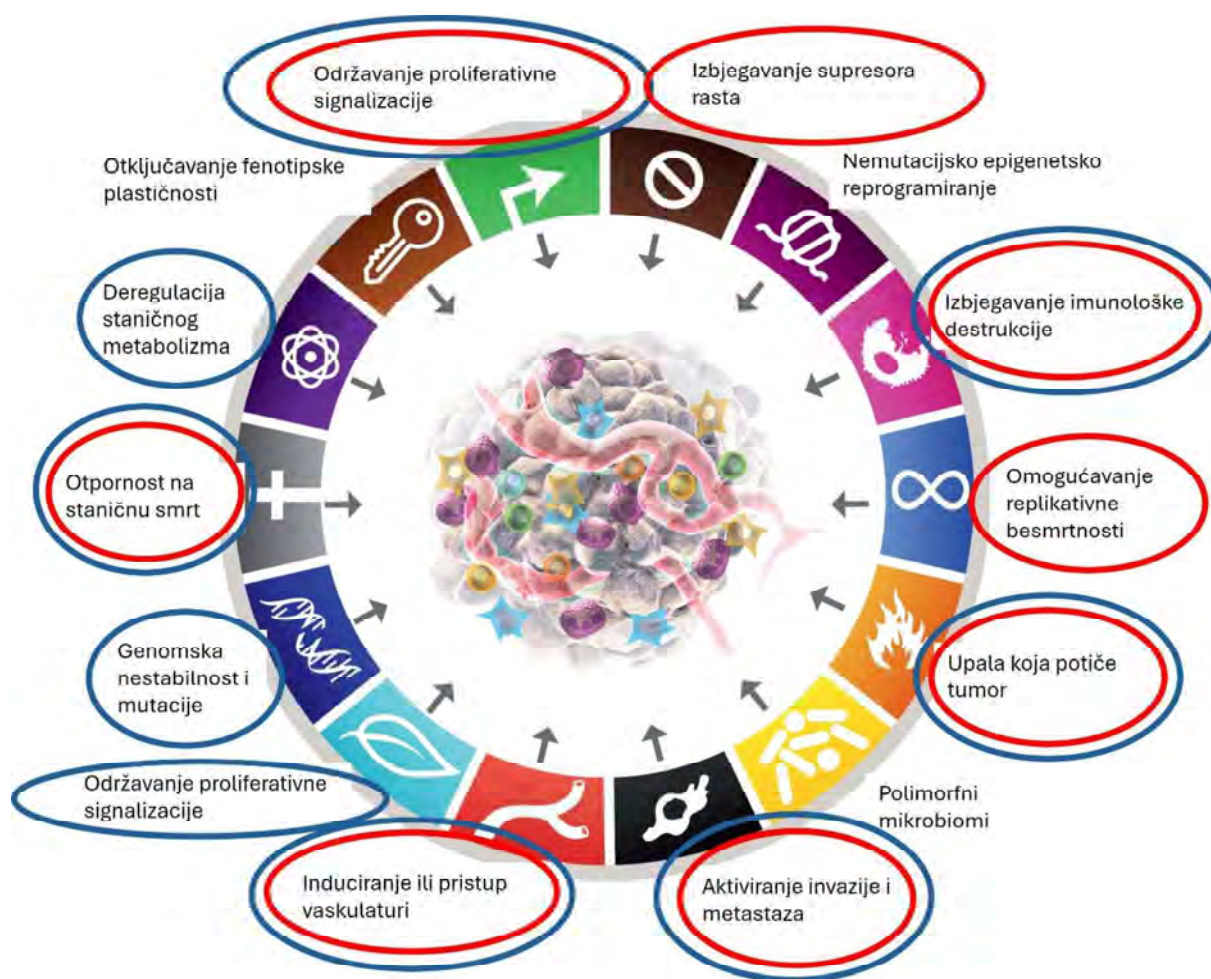
#### 1.2.4 Uloga oksidacijskog stresa u karcinogenezi

Slijedom navedenog može se zaključiti kako povišena koncentracija ROS-a tj. oksidacijski stres, preko oksidacije i deformacije nukleinskih kiselina, proteina i fosfolipida, ima veliki potencijal koji može odvesti stanicu u brojnim patofiziološkim smjerovima među kojima se nalazi i put zloćudne preobrazbe - karcinogeneze (24,55). Brojne su značajke karcinoma u kojima oksidacijski stres može odigrati značajnu ulogu, a kao primjeri ističu se:

- genomska nestabilnost i mutacije, kao što su nakupljanje 8-oksogvanina koje mogu uzrokovati aktivaciju pro-onkogenih ili deaktivaciju tumorsupresorskih gena (65,66);
- održavanje proliferacijskih signalnih puteva blokiranjem aktivnosti protein tirozin fosfataza, PTEN-a (od engl. *phosphatase and tensin homolog*) i fosfataza MAPK (engl. *mitogen-activated*

*protein kinase phosphatases*), čime se pojačavaju signalne kaskade MAPK/ERK (engl. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*), PI3K/AKT (engl. *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B*) i PKD/NF- $\kappa$ B (engl. *protein kinase D/nuclear factor kappa B*), ovisno o vrsti zahvaćenih stanica (53,55,67);

- izbjegavanje apoptoze (68);
- deregulacija staničnog metabolizma inhibicijom aktivnosti piruvat kinaze oksidacijom ostatka Cys-358 te preusmjeravajući glukozu u pentoza fosfatni put (66,69);
- promocija invazivnosti i rasta preko fibroblasta povezanih s karcinomom (engl. *cancer associated fibroblast*) koji se nalaze u tumorskom mikrookolišu (engl. *tumor microenvironment*, TME) (67);
- indukcija angiogeneze preko blokiranja razgradnje hipoksijom induciranog čimbenika 1 (engl. *hypoxia-inducible factor 1*) koji dalje stimulira put vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*) (68);
- izbjegavanje destrukcije putem imunskog sustava na način da ROS generirani u upalnom TME mogu uzrokovati post-translacijske modifikacije cisteinskih ostataka u proteinima tj. promijeniti afinitet T-staničnog receptora prema antigenom peptidu i na taj način oslabiti imunski odgovor(59);
- održavanje tumor promovirajuće upale preko NOX1/ROS (engl. *NADPH oxidase 1/reactive oxygen species*) signalne kaskade karakteristične za sekvencu kronični gastritis - adenokarcinom (70);
- moduliranje fenotipske plastičnosti (71);
- starenje stanica (Slika 2) (61).



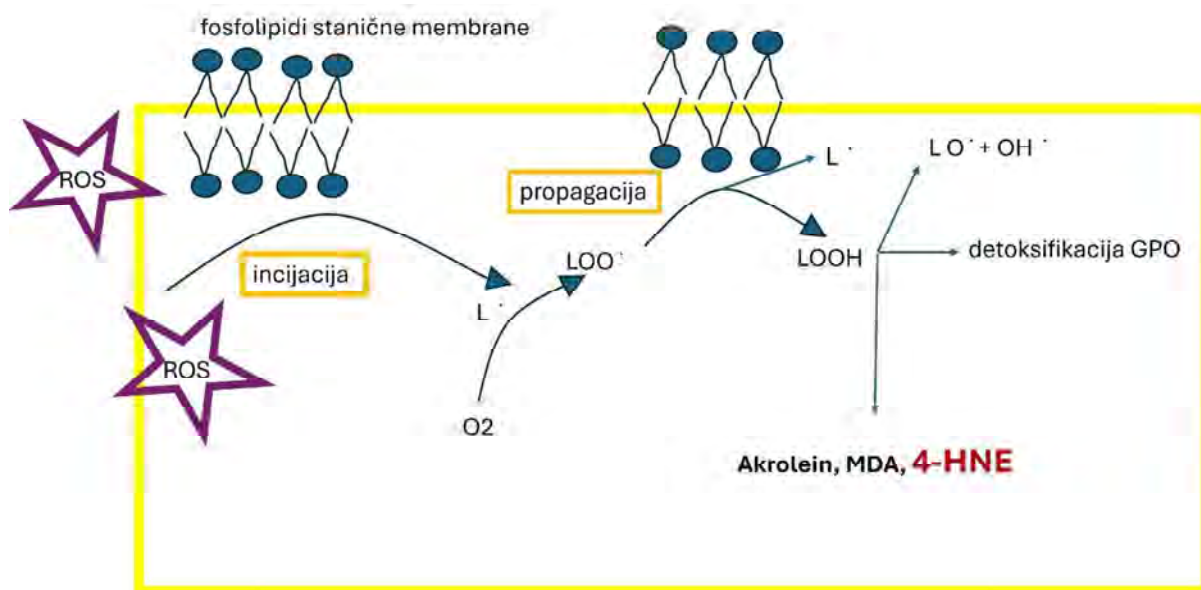
Slika 2. Povezanost povećanog izražaja enzima COX-2 (crveni krugovi) i oksidacijskog (di)stresa (plavi krugovi) s značajkama karcinoma.

Iako povišena uloga ROS-a igra ulogu u promociji, razvoju i progresiji malignih bolesti, njihov relativni suvišak ipak treba biti zadržan na određenoj razini jer stanice koje kreću prema malignoj aliteraciji moraju izbjeći citotoksično djelovanje (pre)visokih koncentracija ROS-a, a to postižu istovremenim povećanjem antioksidacijskih kapaciteta, između ostaloga i prebacivanjem NRF-2 iz citoplazme u jezgru te posljedičnim aktiviranjem sustava antioksidacijskog odgovora (engl. *antioxidant response element*) (55,59). Također, treba napomenuti, kako bi se relativni suvišak ROS-a, povezan s protumorskim djelovanjem, mogao postići i kroničnim gubitkom tj. iscrpljivanjem antioksidacijskog statusa uz održanu tek blago povećanu koncentraciju ROS-a kao kod kronične upale (61). Jedna od najvažnijih posljedica povećane razine reaktivnih kisikovih vrsta jest oksidacijsko oštećenje membranskih lipida, osobito višestruko nezasićenih masnih kiselina, što dovodi do pokretanja procesa lipidne peroksidacije.

## 1.3 Lipidna peroksidacija (LPO)

### 1.3.1 Mehanizam i biološke posljedice lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija naziv je za proces oksidacijskog oštećenja lipida i to posebice višestruko nezasićenih masnih kiselina, a uzrokuje lančane reakcije oksidacije unutar lipidnih molekula stanične membrane. Sam proces, teoretski, se može podijeliti u tri glavne faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijacija, većinom započinje napadom tj. adicijom reaktivnih kisikovih vrsta, poput  $\text{OH}\bullet$  ili  $\text{O}_2\bullet$ , na nezasićene masne kiseline, no moguća reakcija je i  $\text{OH}\bullet$  posredovana abstrakcija vodika iz metilenske grupe ugljikovodikovog lanca masne kiseline (72). Neovisno o načinu nastanka navedenim reakcijama nastaju lipidnih radikali ( $\text{L}\bullet$ ) koji su vrlo nestabilni i skloni daljnjim reakcijama (51). U slijedećoj fazi, fazi propagacije, nastali  $\text{L}\bullet$  reagiraju s molekulama kisika ( $\text{O}_2$ ), tvoreći lipidne peroksilne radikale ( $\text{LOO}\bullet$ ) koji mogu napadati susjedne lipide, stvarajući lipidni hidroperoksid ( $\text{LOOH}$ ) i nove lipidne radikale, čime se zatvara krug lančane reakcije oksidacije lipida (73). Tijekom ove faze, membrana stanice biva progresivno oštećena, što narušava njenu strukturu i funkciju (51). Također, treba naglasiti kako su  $\text{LOOH}$  nestabilni i mogu se dalje razgraditi na nekoliko načina: 1) uz pomoć Fentonove reakcije nastaju alkoksil radikal i  $\text{OH}\bullet$  koji onda uzrokuje dodatna oštećenja; 2) spontana razgradnja u sekundarne proizvode lipidne peroksidacije, kao što su akrolein, malondialdehid (MDA) i 4-HNE (73); 3) detoksifikacija putem glutation-peroksidaze (52). Lančana reakcija lipidne peroksidacije završava fazom terminacije koju uzrokuje međusobna reakcija između dva radikala koji onda formiraju stabilnije, ne-radikalne produkte, ili jednostavno djelovanjem antioksidansa (Slika 3) (53). Ovisno o tipu višestruko nezasićene masne kiseline koja sudjeluje u procesu lipidne oksidacije, razlikuju se njihovi ranije navedeni sekundarni produkti, a ovdje se ističu arahidonska i linoleinska kiselina, s obzirom da njihovi produkti često zadržavaju određeno biološko djelovanje i nakon što su ROS uklonjeni (73).

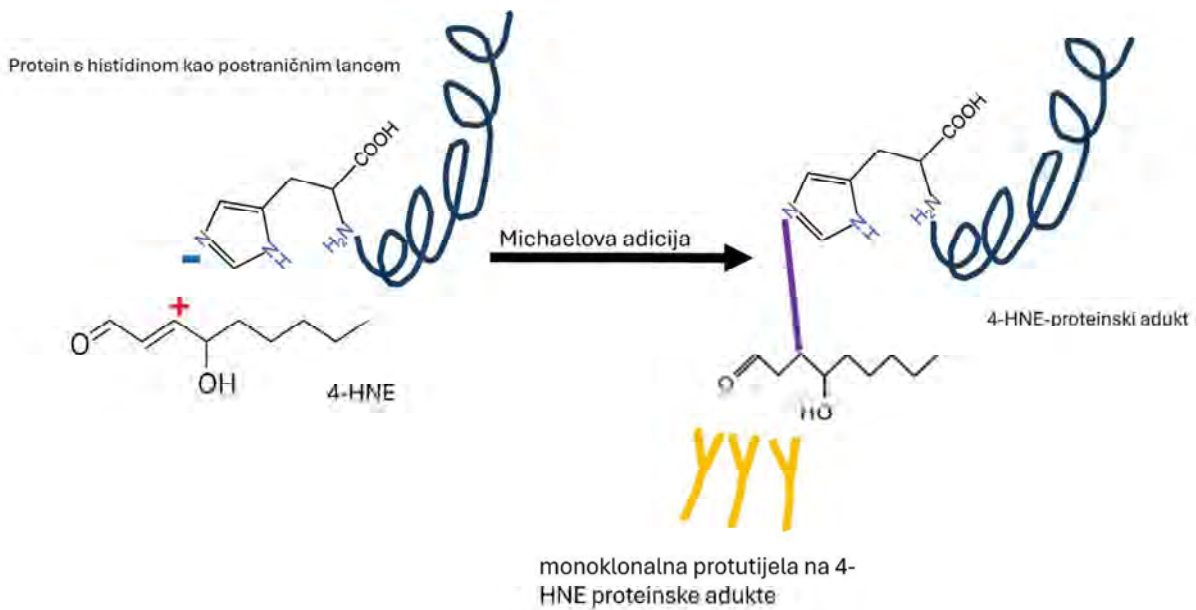


Slika 3. Shematski prikaz lipidne peroksidacije u staničnoj membrani. Proces započinje inicijacijom djelovanjem ROS na lipide, nastavlja se propagacijom kroz stvaranje lipidnih peroksilnih radikala i hidroperoksida (LOOH), te završava njihovom razgradnjom u reaktivne radikale ili toksične produkte (akrolein, MDA, 4-HNE) odnosno detoksifikacijom glutation-peroksidazom.

Iz navedenog je jasno kako lipidna peroksidacija ima značajne biološke posljedice koje mogu dovesti do ozbiljnih oštećenja stanica i tkiva. Već spomenuto oštećenje membrane narušava strukturu fosfolipida u membranama, čime se povećava propusnost membrane što dovodi do gubitka ionske ravnoteže i poremećaja transporta tvari kroz membranu. Također, oksidirani lipidi i njihovi produkti djeluju kao signalne molekule koje potiču upalne procese što je patofiziološki mehanizam važan u razvoju kroničnih bolesti poput dijabetesa i ateroskleroze (50,74). Konačno, teška oštećenja membrane, proteina i DNK mogu dovesti do stanične smrti putem apoptoze ili nekroze. Nadalje, važno je napomenuti da završni produkti lipidne peroksidacije, kao što su MDA i 4-HNE, mogu reagirati s proteinima, DNK i drugim biomolekulama, stvarajući „napredne završne produkte lipidne peroksidacije“ te time uzrokujući dodatna oštećenja stanice (75). Za razliku od MDA, 4-HNE se smatra slabijim staničnim mutagenom, no njegova zapažena uloga u prijenosu signala različitih staničnih puteva mogla bi imati utjecaja na stanični fenotip (53). Među navedenim sekundarnim produktima lipidne peroksidacije, 4-HNE posebno se ističe zbog svoje izražene kemijske reaktivnosti i sposobnosti modulacije brojnih staničnih signalnih puteva, zbog čega se smatra jednim od ključnih medijatora bioloških učinaka oksidacijskog stresa.

### 1.3.2 Nastanak, kemijska svojstva i 4-HNE-proteinski adukti (4-HNE-PA)

4-HNE je  $\alpha,\beta$ -nenasićeni, visoko reaktivni, aldehid koji može nastati iz arahidonske ili linoleinske kiseline i to kao posljedica lipidne peroksidacije ili enzimatski, djelovanjem lipooksigenaza (76). S obzirom na strukturu 4-HNE, koju obilježavaju tri funkcionalne skupine (dvostruka veza, hidroksilna i karbonilna skupina), molekula posjeduje dva reaktivna elektrofilna centra.  $\beta$ -ugljik (C3) predstavlja primarno mjesto za Michaelovu adiciju s nukleofilima, dok aldehidni ugljik (C1) sudjeluje u stvaranju Schiffovih baza te može djelovati i kao redoks-aktivan centar uključen u reakcije oksidacije i redukcije. Zbog takvih svojstava 4-HNE se smatra blagim elektrofilom (50,76). Iako može stvarati Schiffove baze i Michaelove adukte s proteinima koji u bočnim lancima imaju cistein (Cys), histidin (His), lizin (Lys) ili arginin (Arg), dominantna reakcija je stvaranje Michaelovom adicijom nastaju adukti s blagim nukleofilima (77,78) (Slika 4). Slijedom navedenog, primarni blagi nukleofilni cilj 4-HNE-a su postranični lanci aminokiselina koji sadrže cisteinske sulfhidrilne grupe, reaktivne grupe lizina i histidina su nešto jači biološki nukleofili, pa je afinitet vezanja za njih nešto slabiji, a afinitet vezanja za arginin je najslabiji (50). Osim toga, zbog svoje amfifilne prirode i relativno izraženih lipofilnih svojstava, 4-HNE pokazuje afinitet prema lipidnim membranama te se može lokalno nakupljati u njihovoj strukturi, osobito na mjestima nastanka lipidne peroksidacije. U fiziološkim uvjetima 4-HNE je prisutan u manjim, strogo kontroliranim koncentracijama te, preko aktivacije NRF2 puta, sudjeluje u regulaciji stanične redoks homeostaze. U većim koncentracijama se javlja kao posljedica lipidne peroksidacije, a iako se može naći u slobodnom stanju unutar stanice (2-8%), većina nastalog 4-HNE-a je vezana za druge proteine tvoreći „naknadne/napredne završne produkte lipidne peroksidacije“ (poput 4-HNE-proteinskih adukata (4-HNE-PA)) na što su posebno osjetljivi postranični lanci proteina smještenih u blizini staničnih membrana (75,79). Istodobno se višak 4-HNE uklanja enzimskom detoksikacijom, ponajprije djelovanjem glutation-S-transferaze, aldehid-dehidrogenaze i alkohol-dehidrogenaze (74). Smatra se kako su koncentracija i intenzitet izlaganja 4-HNE-u, kao i vrsta stanice koja je izložena, odgovorni za reaktivnost, a time i za ciljne proteine koji će biti zahvaćeni 4-HNE-om što može rezultirati promjenom strukture i funkcije zahvaćenog proteina (50).



Slika 4. Shematski prikaz nastanka 4-HNE-PA Michaelovom adicijom. 4-HNE kao elektrofil reagira s nukleofilnim bočnim lancem histidina u proteinima, pri čemu nastaje stabilan 4-HNE-PA koji se može detektirati specifičnim monoklonskim protutijelima.

### 1.3.3 Uloga 4-HNE-a u karcinogenezi

Kada promatramo 4-HNE u sklopu karcinogeneze, samo nakupljanje 4-HNE-proteinskih adukata je ovisno o vrsti tumora jer se u pojedinim vrstama adukti akumuliraju pretežno u tumorskim stanicama u usporedbi s okolnom stromom, dok je u određenim slučajevima situacija obrnuta (80). Također, ovisno o svojoj koncentraciji, slobodni 4-HNE uključen je u brojne signalne puteve te kao medijator može modulirati različite stanične procese povezane s metaboličkim prilagodbama na promjene redoks statusa, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, organizaciju citoskeleta, autofagiju i različite oblike stanične smrti (81,82). Putem navedenih mehanizama smatra se da 4-HNE, uz svoju fiziološku ulogu kao i ulogu u patogenezi bolesti poput karcinoma želuca, sudjeluje i u obrambenim mehanizmima normalnih stanica usmjerenim protiv razvoja tumora (74,83). Zbog visoke reaktivnosti slobodnog 4-HNE i njegove niske stabilne koncentracije u tkivu, određivanje njegovih adukata, osobito proteinskih adukata, smatra se biološki i klinički relevantnijim pristupom, budući da je njihovo stvaranje proporcionalno prosječnim razinama slobodnog 4-HNE, pa se protutijelima utemeljene metode detekcije, osobito analiza 4-HNE-histidinskih adukata, smatraju pouzdanim pokazateljem njegove prisutnosti što dodatno potvrđuje ulogu 4-HNE kao ključnog medijatora koji integrira oksidacijski stres sa signalnim i metaboličkim reprogramiranjem stanica u tumorskom mikrookolišu, osobito u kontekstu prilagodbe na kronični oksidacijski stres i progresije karcinogeneze (81,84).

## 1.4 Upala i ciklooksigenaza-2 (COX-2)

### 1.4.1 Kronična upala u karcinogenezi

Upala se može definirati kao odgovor vaskulariziranog tkiva kojim se, iz cirkulacije, regrutiraju leukociti i molekule imunskog sustava obrane domaćina na mjesto oštećenja, a u svrhu uklanjanja inicijalnog uzroka (85). Među uzrocima koji je mogu izazvati su prisutnost stranih mikroorganizama tj. infekcija, nekrotično tkivo, strano tijelo ili nekontrolirane imunodne reakcije poput reakcija preosjetljivosti. S obzirom na dužinu trajanja, upalu možemo podijeliti na akutnu i kroničnu, a potonja je prepoznata kao ona koja igra važnu ulogu u razvoju pojedinih karcinoma, poput karcinoma želuca. Štoviše, opetovane infekcije i kronična upala povezuju se s 13% smrtnosti od karcinoma na globalnoj razini (86). Važan okidač upale jest i nekroza stanica karcinoma koja može nastati uslijed nedostatka nutrijenata zbog nekontroliranog rasta tumorskih stanica ili kao posljedica ulaska mikroorganizama u tumorsko tkivo zbog narušavanja fizioloških barijera (87). Daljnje djelovanje kronične upale može ubrzati razvoj i širenje tumora poticanjem imunosupresije i slabljenjem antitumorskog imuniteta (88). Stoga se ova, "tumorom potaknuta upala" (*engl. tumor-elicited inflammation*), smatra važnom značajkom malignog napredovanja većine solidnih tumora (89).

### 1.4.2 Struktura i biološka funkcija COX-2

Jedan od mnogobrojnih sudionika koji sudjeluju u složenom procesu upale jest i protein ciklooksigenaza-2 (COX-2), jedan od tri enzima iz obitelji ciklooksigenaza, zadužen za sintezu prostaglandina (npr. prostaglandin E<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>) iz arahidonske kiseline (24,90). Ovaj ključni regulatorni enzim koji ograničava brzinu sinteze prostaglandina, poznat i pod nazivom prostaglandin-endoperoksid sintaza 2 (*engl. prostaglandin-endoperoxide synthase 2*; PTGS2), kodiran je genom *COX-2* smještenim na dugom kraku kromosoma jedan koji se sastoji od devet introna i deset egzona (91,92). Sam protein sastoji se od 604 aminokiseline, a razgrađuje ga proteasom (90,93–95). Za razliku od enzima ciklooksigenaze 1, COX-2 nije bazalno izražen u većini histološki urednih zdravih tkiva, no zapažen je nizak, ali postojan, bazalni izražaj proteina COX-2 u tkivu želuca, bubrega, središnjeg živčanog sustava i u organima ženskog spolnog sustava (60,90,92,96). S druge strane, prema rezultatima istraživanja provedenog u Sloveniji bazalni izražaj proteina COX-2 se može detektirati u parenhimskim stanicama mnogih ljudskih tkiva, što bi moglo ukazivati na širu prisutnost ovog enzima (97,98). Bazalni izražaj COX-2 u tkivu želuca vjerojatno je povezan s važnom ulogom koju prostaglandini (PG) imaju štiteći sluznicu želuca regulacijom protoka krvi kroz sluznicu, regulacijom dinamike epitelnih stanica, sintezom sluzi i inhibicijom lučenja želučane kiseline (96,98,99).

### 1.4.3 Regulacija i izražaj COX-2

Izražaj ovoga proteina ovisi o brojnim regulacijskim razinama na translacijskoj i posttranslacijskoj razini, a primarno raste kao odgovor na različite upalne podražaje, uključujući citokine poput interleukina-6 i čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), lipidne peroksidacijske produkte kao što je 4-HNE, čimbenike rasta i hormone, kao i infekcija bakterijom *H. pylori* (60,92,96,99). Osim toga, zabilježen je povećan izražaj COX-2 pri aktivaciji određenih onkogenih te inaktivaciji tumor-supresorskih gena (npr. *TP53*) (100,101). Zbog takvog brzog odgovora na različite podražaje, COX-2 se često svrstava u skupinu tzv. „ranih odgovarajućih gena“ (engl. *immediate-early genes*) (90,93,96,99–102). S obzirom na široku paletu induktora navedenog proteina, brojni su i transkripcijski čimbenici čija su vezna mjesta povezana s promotorom COX-2. Među njima se ističe NF- $\kappa$ B s dva vezna mjesta, a tu su i specifični protein 1 (engl. *specificity protein 1*, SP1), aktivacijski transkripcijski čimbenik 2 (engl. *activating transcription factor 2*, ATF-2), aktivator proteina 2 (engl. *activator protein 2*), transduktor signala i aktivator transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) te transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor*, TGF) (90,92,93). Transkript gena COX-2 sadrži 3'-neprevedenu regiju (engl. *3'-untranslated region*, 3'-UTR) koja uključuje AU-bogate sekvence (engl. *AU-rich elements*), važne za posttranskripcijsku regulaciju stabilnosti mRNK. Ove sekvence omogućuju regulaciju brzine razgradnje mRNK te time utječu na razinu translacije i konačan izražaj proteina COX-2 (97). Stabilnost mRNK može se dodatno modulirati djelovanjem određenih mikroRNK, primjerice mikroRNA-101, koje potiču degradaciju mRNK i posljedično smanjuju translaciju (47). S druge strane, aktivacija signalnih putova kao što su K-ras (od engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) i p38 MAPK može dovesti do stabilizacije mRNK COX-2 putem njihovih nizvodnih transkripcijskih čimbenika, uključujući ATF-2 (93,103). Ovi mehanizmi rezultiraju produljenjem životnog vijeka mRNK i pojačanom translacijom, čime dodatno doprinose povećanom izražaju COX-2. Nadalje, polimorfizmi promotorske regije gena COX-2, uz svoj učinak na regulaciju njegove izražajnosti, dovode se i u izravnu vezu s nastankom karcinoma želuca, pri čemu epigenetski mehanizmi, poput metilacije CpG (od engl. *cytosine-phosphate-guanine*) otočica u promotorskoj regiji, imaju važnu ulogu u toj regulaciji (103,104).

### 1.4.4 Suelularna lokalizacija i enzimska aktivnost COX-2

Zbog svoje funkcije u ranoj reakciji na upalu, enzim COX-2 smješten je na membranama kako bi bio blizu arahidonske kiseline, glavne „sirovine“ za proizvodnju prostaglandina (24). Zapravo, njegova funkcija se može podijeliti na dva dijela s obzirom da djeluje kao oksigenaza, pri oksidaciji arahidonske kiseline u prostaglandin G2 (PGG2), a zatim i kao peroksidaza pri eventualnoj pretvorbi PGG2 u prostaglandin H2 (96,105). Njegove membranske lokacije uključuju: a) endoplazmatski retikulum, b) membranu jezgrene ovojnice (unutrašnje i vanjske) i c) staničnu (plazmatsku) membranu makrofaga i fibroblasta (106), a vrlo vjerojatno i epitelnih stanica crijevnih organa, uključujući površinske, foveolarne i žljezdane

epitelne stanice sluznice želuca (97,103,107,108). Neovisno o uzroku, povećani izražaj i posljedična aktivnost COX-2 doprinose povećanju ukupne količine stvorenih ROS unutar stanice, a navedeno može, npr. preko nastanka 4-HNE-a, rezultirati zatvaranjem kruga pozitivne povratne sprege (24). Također, upalom posredovan nastanak TNF- $\alpha$  aktivira NF- $\kappa$ B koji potiče izražajnost COX-2, ali i samoga TNF- $\alpha$ , te na taj način povećava proizvodnju prostaglandina E2 (PGE2) koji igra vrlo važnu ulogu u održavanju upale (93). Kao što je ranije navedeno, jedna od važnih funkcija enzima COX-2 jest modulacija upalnog odgovora, pri čemu povećana aktivnost ovog enzima u metaplastičnim i displastičnim stanicama može predstavljati prekretnicu u regulaciji ključnih upalnih i protumorskih procesa (60). Na temelju tih pretpostavki, COX-2 bi mogao imati obilježja onkoproteina, s obzirom na to da potiče visoku proizvodnju PGE2, što dodatno stimulira angiogenezu (94,107), ali i inhibira lokalne imunološke odgovore, slabeći aktivnost dendritičnih stanica, stanica prirodnih ubojica (engl. *natural killer cells*) i regulatornih T limfocita (109). Nadalje, COX-2 preko PGE2 stimulira rast i proliferaciju tumora (110), između ostaloga, transaktivacijom receptora za epidermalni čimbenik rasta (99) i slabi antiproliferativni učinak TGF- $\beta$  (93). Također, utječe na regulaciju apoptoze povećanjem izražaja proteina Bcl-2, što rezultira stabilizacijom mitohondrijske membrane i inhibicijom aktivacije unutrašnjeg puta apoptoze (95,108,111). Dodatno, pojedine studije navode mogućnost da povećana aktivnost COX-2 može doprinijeti nastanku mutacija u genu *TP53*, što predstavlja još jedan mehanizam inhibicije apoptoze (112), dok u suprotnom smjeru mutirani tip gena *TP53* može preko aktivacije Ras/Raf/MAPK puta povećati izražaj COX-2 čime se, još jednom, zatvara krug pozitivne povratne sprege (93,101). Štoviše, COX-2 može oslabiti učinak E-cadherina te slabljenjem međustaničnih veza potaknuti epitelno-mezehimalnu transformaciju karcinomskih stanica i posljedično tome širenje tumora u smislu invazije i metastaza (113). Sličnu ulogu COX-2 igra s povećanjem izražaja matriks-metaloproteinaza koje omogućavaju razgradnju kolagena u tkivima te na taj način olakšavaju širenje malignih stanica (93). Konačno, COX-2 je, preko PGE2, povezan i s poticanjem upale potaknute tumorom (47) te pojačanim izražajem CD44 receptora koji ima važnu ulogu u populaciji tumorskih matičnih stanica (114).

#### 1.4.5 COX-2 u karcinomu želuca

Povećani izražaj COX-2 opisan je u različitim vrstama karcinoma, a u kontekstu karcinoma želuca, COX-2 je identificiran kao enzim povezan s početkom, razvojem i progresijom epitelne komponente ove maligne bolesti (47,60,118,101,105,108,111,112,115–117). Također, iako postoje iznimke (119), čini se da je navedeno relativno rana pojava (47,105,108,117), budući da je zabilježena već u prekanceroznim stanjima poput atrofičnog gastritisa i intestinalne metaplazije, kao i u prekanceroznim lezijama, uključujući displaziju niskog i visokog stupnja te u ranim fazama karcinoma želuca (103,120). Nadalje, signalni put COX-2/PGE2 ima važnu ulogu u regulaciji mikrokruženja želučane tumorigeneze (93), uključujući i promociju protumorske aktivnosti makrofaga povezanih s tumorom (engl. *tumor-*

*associated macrophages*) (121). Poznato je da su infekcija *H. pylori* i posljedična kronična upala ključni koraci potrebni za početak i razvoj karcinoma želuca, no etiopatogenetski mehanizam koji povezuje ove procese još nije u potpunosti razjašnjen (122). Povezanost povećanog izražaja enzima COX-2 u epitelnim stanicama s infekcijom *H. pylori* i upalnim stanjima uzrokovanim drugim etiološkim čimbenicima može se uspostaviti putem receptora sličnih proteinu Toll i/ili gastrina s jedne strane ili povećanim izražajem iNOS i fosforilacijom p38 MAPK puta s posljedičnom aktivacijom ATF-2 s druge strane (47,60,93,117). Osim stabilizacije mRNK COX-2, navedeni čimbenici mogu izravno povećati transkripciju COX-2 ili utjecati na aktivaciju post-translacijskih modifikacija, čime se povećava izražaj COX-2 (47,60,92,111). U prilog navedenom govori i činjenica da eradikacijom bakterije *H. pylori* razina izražaja COX-2 značajno opada (47,110). Također, COX-2 je jedan od glavnih proizvoda aktivacije puta NF- $\kappa$ B, bez obzira na uzrok, pa neki autori smatraju da je povećana aktivnost ovog čimbenika primarno zaslužna za povećanje izražaja proteina COX-2 u karcinomu želuca (114,123). Zbog svoje središnje uloge u regulaciji upale, oksidacijskog stresa i tumorske progresije, protein COX-2 se smatra jednim od ključnih molekularnih posrednika koji povezuju kroničnu upalu s razvojem karcinoma želuca. Stoga, COX-2, osim što modulira upalni odgovor, sudjeluje i u poremećaju stanične redoks ravnoteže, čime se prirodno nadovezuje na ulogu oksidacijskog stresa u karcinogenezi.

## 2 CILJ

Glavni cilj: Utvrditi razliku u izražaju i međusobnu povezanost biomarkera oksidacijskog stresa (tj. proteina promijenjenih završnim produktima lipidne peroksidacije) i proteina COX-2 u tkivima različitim razvojnih stadija karcinoma želuca i zdrave sluznice želuca metodom imunohistokemije.

Specifični ciljevi:

1. Ispitivanje imunohistokemijskog nakupljanja 4-HNE-proteinskih adukata u zdravoj sluznici želuca i različitim patološkim stanjima sluznice želuca koja odgovaraju različitim razvojnim stadijima intestinalnog tipa karcinoma želuca (intestinalna metaplazija, atrofija, intestinalna metaplazija s atrofijom, displazija, karcinom želuca);
2. Određivanje izražaja proteina COX-2 u zdravoj sluznici želuca i različitim patološkim stanjima sluznice želuca koja odgovaraju različitim razvojnim stadijima intestinalnog tipa karcinoma želuca korištenjem dva različita protutijela za protein COX-2 koja se razlikuju prema epitopima koje prepoznaju;
3. Povezivanje epidemioloških (dob, spol) i kliničko-patoloških podataka (pušačke navike, upotreba ne-steroidnih antireumatskih lijekova, infekcija *H. pylori*, intenzitet i priroda upale, biokemijski parametri) s razinom izražaja i unutarstaničnim smještajem signala proteina COX-2 i 4-HNE-proteinskih adukata utvrđenih metodom imunohistokemije.
4. Utvrditi učinak fizioloških i patoloških koncentracija 4-HNE-a na staničnu redoks homeostazu, izražaj proteina COX-2 i migraciju stanica ljudskog adenokarcinoma želuca *in vitro*.

### 3 HIPOTEZA

1. Razlika u izražaju biomarkera oksidacijskog stresa i proteina COX-2 prikazana metodom imunohistokemije omogućuje:
  - a. razlikovanje nepromijenjene (fiziološke) sluznice od patoloških stanja sluznice antruma želuca;
  - b. razlikovanje između pojedinih skupina patoloških stanja sluznice antruma želuca koja odgovaraju različitim razvojnim stadijima intestinalnog tipa karcinoma želuca (intestinalna metaplazija, atrofija, intestinalna metaplazija s atrofijom, displazija, karcinom želuca).
  
2. Različite koncentracije 4-HNE-a utječu na vijabilnost, staničnu redoks homeostazu, migracijsku aktivnost i izražaj proteina COX-2 u stanicama adenokarcinoma želuca *in vitro*.

## 4 MATERIJALI I METODE

### 4.1 Ispitanici

Ovo retrospektivno istraživanje provedeno je na arhivskom bioptičkom materijalu pohranjenom na Odjelu za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci te na Zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Nakon definiranja dijagnostičkih kategorija (uredna želučana sluznica, atrofija, intestinalna metaplazija, kombinacija atrofije i intestinalne metaplazije i displazija), provedena je retrospektivna identifikacija potencijalnih uzoraka pretraživanjem arhive patohistoloških nalaza Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci. Pretraživanje arhive provedeno je sustavno, s ciljem pronalaska bolesnika koji zadovoljavaju unaprijed definirane kriterije uključenja. Uključeni slučajevi morali su ispunjavati sljedeće kriterije:

- dob  $\geq$  40 godina u trenutku postavljanja dijagnoze,
- biopsija uzeta iz antruma želuca,
- u skupini karcinoma, histološki potvrđen intestinalni tip adenokarcinoma i
- izostanak prethodne neoadjuvantne kemoterapije ili radioterapije.

Nakon inicijalne identifikacije potencijalnih slučajeva na temelju pregledanih patohistoloških nalaza, proveden je grubi pretpregled hematoksilin-eozinom (HE) obojenih preparata. U toj fazi provjeravana je podudarnost opisane dijagnoze s morfološkim nalazom na preparatima. Uzorci kod kojih je postojala dijagnostička neusklađenost ili dvojba isključeni su iz daljnje analize ili su podvrgnuti dodatnoj reviziji. Također, tijekom provedbe retrospektivne identifikacije i pretpregleda uzoraka u arhivi Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci utvrđeno je da raspoloživ broj uzoraka želučane displazije nije dostatan za postizanje planiranog broja slučajeva u toj dijagnostičkoj kategoriji. S obzirom na ključnu ulogu displazije kao prijelaznog stadija između intestinalne metaplazije i invazivnog karcinoma, odlučeno je da se ta skupina dodatno nadopuni. U tu je svrhu uspostavljena suradnja sa Zavodom za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb, uz suglasnost za korištenje arhivskog patohistološkog materijala. U sljedećem koraku procjenjivana je dostatnost tkivnog materijala odabranih slučajeva za planirane dodatne analize te su u analizu uključeni isključivo uzorci s dovoljnom količinom očuvanog reprezentativnog tkiva. Istraživanjem je inicijalno bilo predviđeno uključivanje 140 uzoraka, i to po 20 uzoraka u svakoj od pet preinvazivnih kategorija (uredna želučana sluznica, atrofija, intestinalna metaplazija, kombinacija atrofije i intestinalne metaplazije te displazija), uz dodatnih 40 uzoraka histološki potvrđenog intestinalnog tipa karcinoma želuca. Konačan broj i raspodjela uključenih uzoraka odstupali su od inicijalno predviđenog zbog ograničene dostupnosti uzoraka u zadovoljavajućoj količini i kvaliteti te zbog revizije histopatološke klasifikacije. Naime, u manjem broju biopsijskih uzoraka

inicijalno svrstanih u skupinu atrofije, na dubljim razinama preparata identificirana su područja intestinalne metaplazije. U takvim slučajevima uzorci su, ovisno o dominantnoj histološkoj komponenti, reklasificirani u skupinu intestinalne metaplazije ili u skupinu kombiniranih promjena atrofije i intestinalne metaplazije (Slika 5).

Konačno, istraživanje je provedeno na ukupno 148 uzoraka raspoređenih u šest skupina duž Correa kaskade: uredna sluznica (n = 20), atrofija (n = 14), intestinalna metaplazija (n = 31), kombinirana skupina atrofija i metaplazija (n = 22), displazija (n = 21) te karcinom (n = 40). Koristili su se parafinski blokovi iz vremenskog perioda od 2013. do 2025. godine.

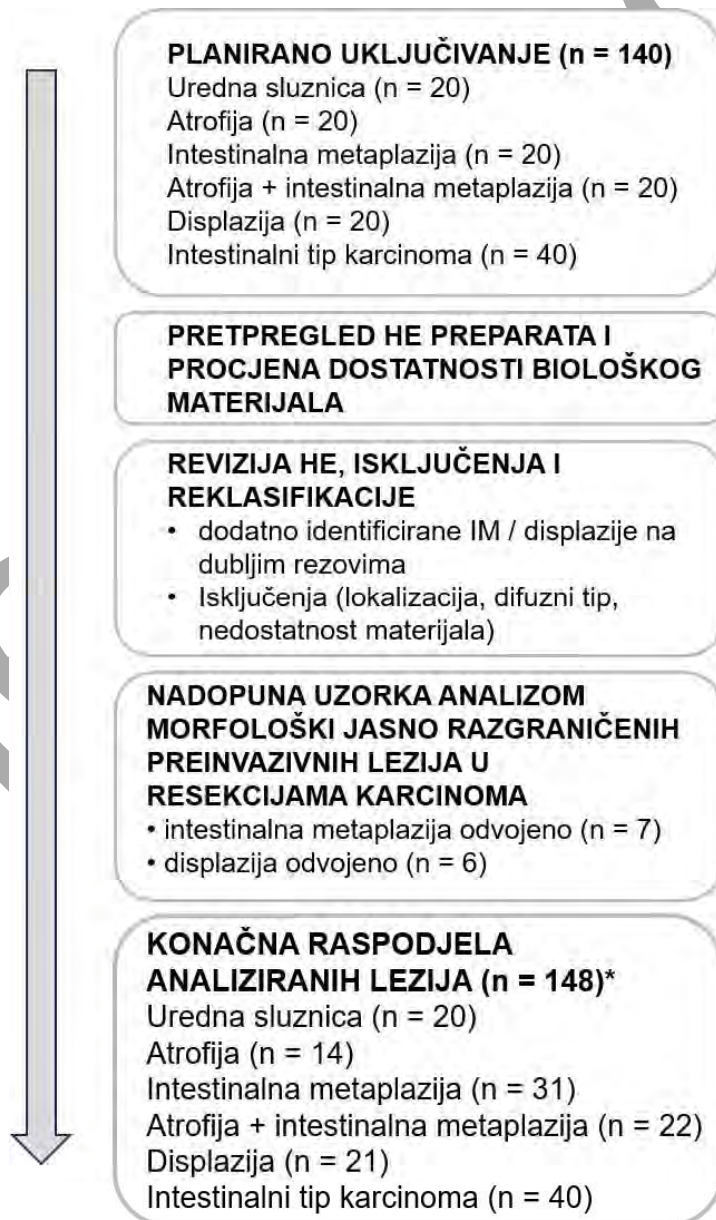
Sve imunohistokemijske analize provedene su u laboratoriju Odjela za patologiju i citologiju OŽB Vinkovci kako bi se osigurali jedinstveni laboratorijski uvjeti. Za svakog bolesnika uključenog u istraživanje prikupljeni su klinički i laboratorijski podaci dostupni u medicinskoj dokumentaciji, uključujući dob i spol, pušački status, podatke o uporabi nesteroidnih protuupalnih lijekova (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*, NSAID) te status infekcije *H. pylori*. Od biokemijskih parametara zabilježeni su C-reaktivni protein (CRP), koncentracija željeza u serumu te apsolutni broj neutrofila i limfocita iz kojih je naknadno izračunat omjer neutrofila i limfocita (N/L omjer). Histološkom analizom HE obojenih preparata, ukoliko nisu ranije zabilježeni, dodatno su procijenjeni parametri lokalne upale, uključujući tip upale (kronična ili kronična aktivna), intenzitet upalnog infiltrata (blag, umjeren ili jak) te prisutnost pozitivne imunohistokemijske reakcije na antigene *H. pylori*.

Tijekom revizije preparata pokazalo se da je upravo kategorija displazije metodološki najzahtjevnija, ponajprije zbog njezine relativno rijetke zastupljenosti u izoliranim biopsijskim uzorcima te čestog preklapanja s invazivnim lezijama u većim resekcijskim preparatima. Kako bi se osigurao dostatan i morfološki reprezentativan broj uzoraka displazije, u analizu su uključena područja displazije identificirana unutar većih kirurških resekcijskih uzoraka intestinalnog tipa karcinoma želuca. U tim slučajevima displazija je bila morfološki jasno razgraničena od invazivne komponente karcinoma te je analizirana kao zasebna lezija. Izražaj biomarkera procjenjivan je odvojeno u području displazije i u području invazivnog karcinoma, pri čemu su ta dva morfološka entiteta tretirana kao neovisne analitičke jedinice. Ovakav pristup primijenjen je kod šest od ukupno 21 uzorka uključenog u skupinu displazije, pri čemu su isti resekcijski uzorci istodobno doprinosili i skupini karcinoma.

Sličan metodološki princip primijenjen je i kod intestinalne metaplazije. U slučajevima većih resekcijskih uzoraka karcinoma u kojima su u okolnoj sluznici identificirana područja intestinalne metaplazije, ta su područja analizirana zasebno, pod uvjetom jasne morfološke razgraničenosti od displastičnih i invazivnih promjena. Time su u skupinu intestinalne metaplazije uključeni i uzorci proizašli iz

resekcijskih preparata karcinoma, što se odnosilo na sedam od ukupno 31 uzorka intestinalne metaplazije.

Ovakav pristup omogućio je optimalno iskorištavanje dostupnog tkivnog materijala, osobito u kontekstu složenih i resursno zahtjevnih imunohistokemijskih analiza, uz istodobno očuvanje metodološke dosljednosti i jasne morfološke razgraničenosti pojedinih lezija. Time je osigurano da se relevantne preinvazivne promjene ne zanemare, već da budu analizirane u kontekstu kontinuuma želučane karcinogeneze.



Slika 5. Dijagram tijeka uključivanja, revizije i reklasifikacije uzoraka te konačne raspodjele analiziranih histoloških lezija. \*Analiza provedena na razini lezije; pojedini resekcijski uzorci sadržavali su više morfološki jasno razgraničenih lezija. (IM – intestinalna metaplazija; HE – hematoksilin-eozin)

## 4.2 Dozvole etičkog povjerenstva

Istraživanje je provedeno uz odobrenje Etičkog povjerenstva Opće županijske bolnice Vinkovci (broj 01-4194/2/2020 i 01-9687/3/23) te Etičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković (broj BEP-542/2-2024.lu). Pri planiranju i provedbi istraživanja poštovani su etički principi definirani Helsinškom deklaracijom iz 1975. godine i njezinim izmjenama iz 1983. godine, a cjelokupno istraživanje provedeno je u skladu s navedenim smjernicama. Podaci o demografskim obilježjima pacijenata te kliničkim i histološkim karakteristikama tumora prikupljeni su iz povijesti bolesti i patohistoloških nalaza dostupnih u bolničkim informacijskim sustavima te su potom kodirani radi zaštite identiteta ispitanika uključenih u istraživanje. U cilju osiguravanja povjerljivosti i zaštite osobnih podataka, pristup izvornoj dokumentaciji imao je isključivo glavni istraživač.

## 4.3 Patohistološka analiza

Za histološku analizu korišteni su mikroskopski preparati iz arhive Odjela za patologiju i citologiju OŽB Vinkovci te arhive Zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb. Preparati su nastali tijekom rutinskog dijagnostičkog rada nakon fiksacije tkiva u 10 % neutralno puferiranom formalinu (BioGnost, Zagreb, Hrvatska), uklapanja u parafin (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) te rezanja parafinskih blokova na rezove debljine 4 µm mikrotomom (Microm HM 355S, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Njemačka). Rezovi su obojeni standardnom HE metodom korištenjem Mayerova hemaluma (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i 0,5 % vodene otopine eozina Y (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka). Hematoksilin-eozin (HE) preparati pregledani su svjetlosnim mikroskopom Olympus BX43 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) s ciljem provjere podudarnosti morfoloških nalaza s arhiviranim patohistološkim nalazima. U sklopu revizije procjenjivani su tip lokalne upale (kronična ili kronična aktivna), intenzitet upalnog infiltrata (blag, umjeren ili jak) te prisutnost i procjena stupnja ranije opisanih morfoloških promjena (atrofije, intestinalne metaplazije i displazije) u skladu s dijagnostičkom kategorijom. Istodobno je provedena procjena dostatnosti biološkog materijala, pri čemu su ocjenjivani kvaliteta očuvanosti i količina reprezentativnog tkiva u parafinskim blokovima u odnosu na potrebe planiranih daljnjih analiza. U slučajevima dijagnostičke nesigurnosti ili sumnje na dodatne lezije analizirani su dublji rezovi iz parafinskih blokova. Uzorci kod kojih je tijekom histološke revizije utvrđena nepodudarnost s kriterijima uključenja ili nedostatna količina tkiva za daljnju obradu isključeni su iz daljnje analize. Konačna klasifikacija uzoraka temeljila se na revidiranom histološkom nalazu nakon evaluacije svih dostupnih rezova.

## 4.4 Imunohistokemijska analiza

### 4.4.1 Imunohistokemijsko određivanje prisutnosti *H. pylori* u biopatima sluznice želuca

Imunohistokemijska analiza provedena je na mikroskopskim preparatima i parafinskim blokovima pohranjenima u arhivi Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci te na dostavljenim parafinskim blokovima iz arhive Zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Uzorci tkiva prethodno su fiksirani u neutralno puferiranom formalinu i uklopljeni u parafinske blokove u sklopu rutinskog dijagnostičkog rada. U slučajevima u kojima imunohistokemijska detekcija *H. pylori* nije bila prethodno učinjena, iz odabranih parafinskih blokova izrađeni su parafinski rezovi debljine 4 µm. Rezovi su zatim podvrgnuti procesu deparafiniranja kroz dvije inkubacije u sredstvu za uklanjanje parafina Tissue-Tek u trajanju od po 5 minuta, nakon čega je slijedila postupna rehidracija kroz 2-propanol, 96 %-tni i 70 %-tni etanol te deioniziranu vodu, pri čemu je svaki korak trajao 5 minuta. Potom je slijedilo toplinski inducirano razotkrivanje antigena (engl. *antigen retrieval*) u uređaju PT-Link (Dako, Glostrup, Danska) uporabom otopine Target Retrieval Solution high pH (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Nakon razotkrivanja antigena blokirana je endogena peroksidazna aktivnost inkubacijom s EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Rezovi su potom inkubirani s primarnim protutijelom za detekciju *H. pylori* (poliklonsko zečje protutijelo, DakoCytomation, Glostrup, Danska; razrjeđenje 1:150 u EnVision FLEX Antibody Diluentu; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) u trajanju od 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Imunohistokemijsko bojanje provedeno je automatski na uređaju Autostainer Link 48 (Dako, Glostrup, Danska). Detekcija imunoreakcije provedena je polimernim sustavom EnVision FLEX/HRP (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) u trajanju od 20 minuta, a reakcija je vizualizirana uporabom EnVision FLEX DAB+ kromogena (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Kontrastno bojanje provedeno je EnVision FLEX hematoksilinom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Kao pozitivna kontrola korišten je uzorak s poznatom prisutnošću *H. pylori*, dok je negativna kontrola uključivala izostavljanje primarnog protutijela i njegovu zamjenu fosfatnim puferom (PBS). Interpretacija imunohistokemijskog nalaza provedena je prema kriterijima prethodno opisanim u radu iz našeg laboratorija (124).

### 4.4.2 Imunohistokemijsko određivanje izražaja COX-2 i nakupljanja 4-HNE-PA

Za imunohistokemijsko bojenje koristila su se primarna monoklonska protutijela na COX-2 i 4-HNE-PA, a samo bojenje provedeno je prema istom protokolu kao i za detekciju *H. pylori*, uz primjenu toplinski inducirano razotkrivanja antigena u otopini Target Retrieval Solution pH 9 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) te automatizirano bojanje na uređaju Dako Autostainer Link 48 (Agilent/Dako, Glostrup, Danska).

Za detekciju COX-2 primijenjena su dva monoklonska protutijela: klon SP21 (zečje monoklonsko protutijelo; Thermo Fisher Scientific; razrjeđenje 1:200 u EnVision FLEX Antibody Diluent, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), koji prepoznaje epitop u C-terminalnom dijelu COX-2 proteina (aminokiseline 513–604), te klon CX-294 (mišje monoklonsko protutijelo; DAKO/Agilent; razrjeđenje 1:100 u EnVision FLEX Antibody Diluent, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), koji prepoznaje kraći epitop (aminokiseline 580–598) specifičan za humani COX-2 protein.

4-HNE proteinski adukti (4-HNE-PA), kao pokazatelji lipidne peroksidacije, detektirani su primjenom monoklonskog protutijela HNEJ-2 (Abcam; razrjeđenje 1:350 u EnVision FLEX Antibody Diluent, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), uz primjenu istog imunohistokemijskog protokola kao za detekciju *H. pylori* i COX-2.

Kao pozitivne kontrole korišteni su uzorci kože za COX-2 te uzorci posteljice za 4-HNE-PA. Negativne kontrole uspostavljene su zamjenom primarnog protutijela fosfatnim puferom. Svi imunohistokemijski preparati analizirani su neovisno od strane dva specijalista patologije prema unaprijed definiranim i standardiziranim kriterijima očitavanja, a u slučaju odstupanja postignut je konsenzus zajedničkom reevaluacijom preparata.

#### 4.4.2.1 Standardizirani kriteriji očitavanja imunohistokemijskih nalaza

Radi osiguranja ujednačene interpretacije i povećanja međupromatračke podudarnosti, za svako korišteno protutijelo unaprijed su definirani standardizirani kriteriji očitavanja. Kriteriji su obuhvaćali preporučeno mikroskopsko povećanje, primarnu i dodatnu subcelularnu lokalizaciju bojenja, način bodovanja intenziteta te posebne interpretacijske napomene relevantne za pojedini marker. Inicijalni pregled preparata provodio se pri manjim povećanjima (4× ili 10×) radi procjene distribucije reakcije unutar žljezdanog epitela i identifikacije gradijenta bojenja, dok je detaljna procjena intenziteta i subcelularne lokalizacije provođena pri povećanju 20× ili, prema potrebi, 40×. Posebna pažnja posvećivala se prijelaznim zonama (npr. između uredne sluznice i intestinalne metaplazije), uz obveznu usporedbu s HE preparatom. Za COX-2 (klon CX-294) evaluirano je prvenstveno membransko bojenje (bazolateralno i/ili luminalno), uz bilježenje eventualne citoplazmatske ili perijejgrene komponente. COX-2 (klon SP21) procjenjivan je prema intenzitetu citoplazmatskog bojenja, uz zasebno bilježenje prisutnosti ili odsutnosti jezgrenog pozitiviteta. 4-HNE-PA (HNEJ-2) analiziran je prema intenzitetu citoplazmatske reakcije te mogućem vakuolarnom nakupljanju u vakuolama vrčastih stanica. U slučajevima izraženog gradijenta bojenja (za klonove SP21 i HNEJ-2) bilježen je dominantni uzorak. Kao interna kontrola za sva protutijela korištene su antralne žlijezde, koje su služile za procjenu tehničke valjanosti bojenja i relativnu usporedbu intenziteta reakcije između uzoraka. Detaljan usporedni prikaz kriterija očitavanja za pojedina protutijela prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Standardizirani kriteriji očitavanja imunohistokemijskih protutijela korištenih u istraživačkoj analizi. Tablica prikazuje usporedni pregled kriterija očitavanja za protutijela COX-2 (CX-294 i SP21) i 4-HNE-PA (HNEJ-2), uključujući preporučeno mikroskopsko povećanje, subcelularnu lokalizaciju bojenja, bodovni sustav, način bilježenja rezultata te ključne interpretacijske napomene.

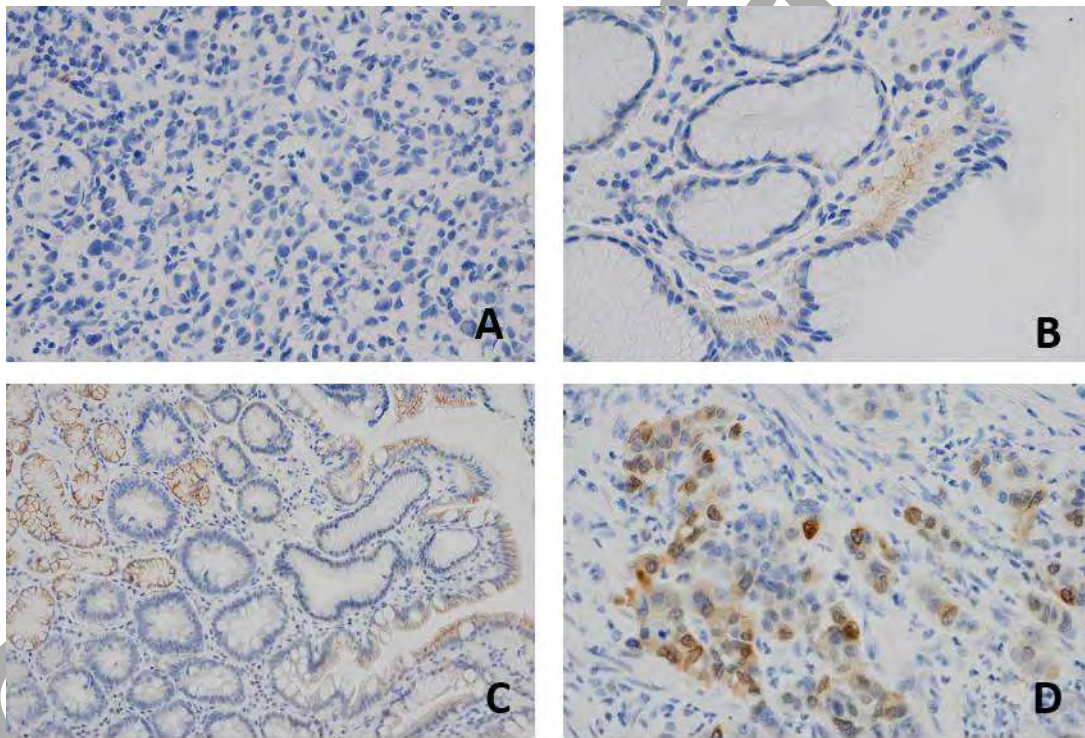
Parametar	COX-2 (CX-294)	COX-2 (SP21)	4-HNE-PA (HNEJ-2)
Primarno povećanje	20× (40× za detalje <sup>1</sup> )	4× ili 10× za pregled (40× za detalje <sup>2</sup> )	20× (40× za detalje <sup>3</sup> )
Primarna lokalizacija	Membransko (bazolateralno)	Citoplazmatsko	Citoplazmatsko
Dodatne lokalizacije	Citoplazmatsko/perijejzreno (> 1%)	Jezgri pozitivitet (≥3 pozitivne jezgre u analiziranom epitelu pri povećanju 40×)	Vakuole vrčastih stanica
Bodovanje primarna lokalizacija	0 = negativno 1B = Membransko (bazolateralno) 1L = Membransko (luminalno) 2 = Citoplazmatsko/perijejzreno	0 = vrlo slabo 1 = slabo homogeno 2 = miješano slabo + srednje/jako 3 = srednje/jako homogeno	1 = vrlo slabo 2 = slabo homogeno 3 = jače homogeno
Bodovanje dodatna lokalizacija	-	Jezgre: pozitivne/negativne	Vakuole: 0 = nema 1 = slabo 2 = jače
Način bilježenja	<i>Jedna varijabla:</i> 0, 1B, 1L, 2	<i>Dvije varijable</i> Citoplazma (0-3) + jezgre (da/ne)	<i>Dvije varijable</i> Citoplazma (1-3) + vakuole (0-2)
Unutrašnja kontrola	Antralne žlijezde		

<sup>1</sup>COX-2 (CX-294) - U slučajevima istodobne prisutnosti membranskog i vrlo slabog difuznog citoplazmatskog signala bilježen je dominantni obrazac (membranski), dok minimalni nespecifični citoplazmatski signal (<1 % analiziranih stanica) nije zasebno evidentiran. U prisutnosti izraženog gradijenta bojenja unutar iste foveole bilježen je dominantni uzorak izražaja. <sup>2</sup>COX-2 (SP21) - Procjena citoplazmatskog intenziteta uvijek je provedena uz korelaciju s odgovarajućim HE preparatom, osobito u prijelaznim zonama. U slučajevima heterogenog ili gradijentnog bojenja bilježen je prevladavajući intenzitet. <sup>3</sup>4-HNE-PA (HNEJ-2) - Diskretno bazalno citoplazmatsko bojenje, koje bi odgovaralo položaju endoplazmatskog retikuluma, interpretirano je kao fiziološka pojava.

#### 4.4.2.2 Evaluacija izražaja COX-2 detektiranog klonom CX-294

Analiza izražaja COX-2, provedena primjenom monoklonskog protutijela klona CX-294, bila je usmjerena prvenstveno na membranski izražaj, pri čemu je razlikovano bazolateralno i luminalno bojenje. Dodatno je evaluirana prisutnost citoplazmatskog i/ili perijejzrenog signala. Membranski obrazac klasificiran je kao negativan (0), bazolateralno pozitivan (1B) ili luminalno pozitivan (1L). Citoplazmatsko/perijejzreno bojenje bilježeno je kao zasebna kategorija (2) u slučajevima odsutnosti

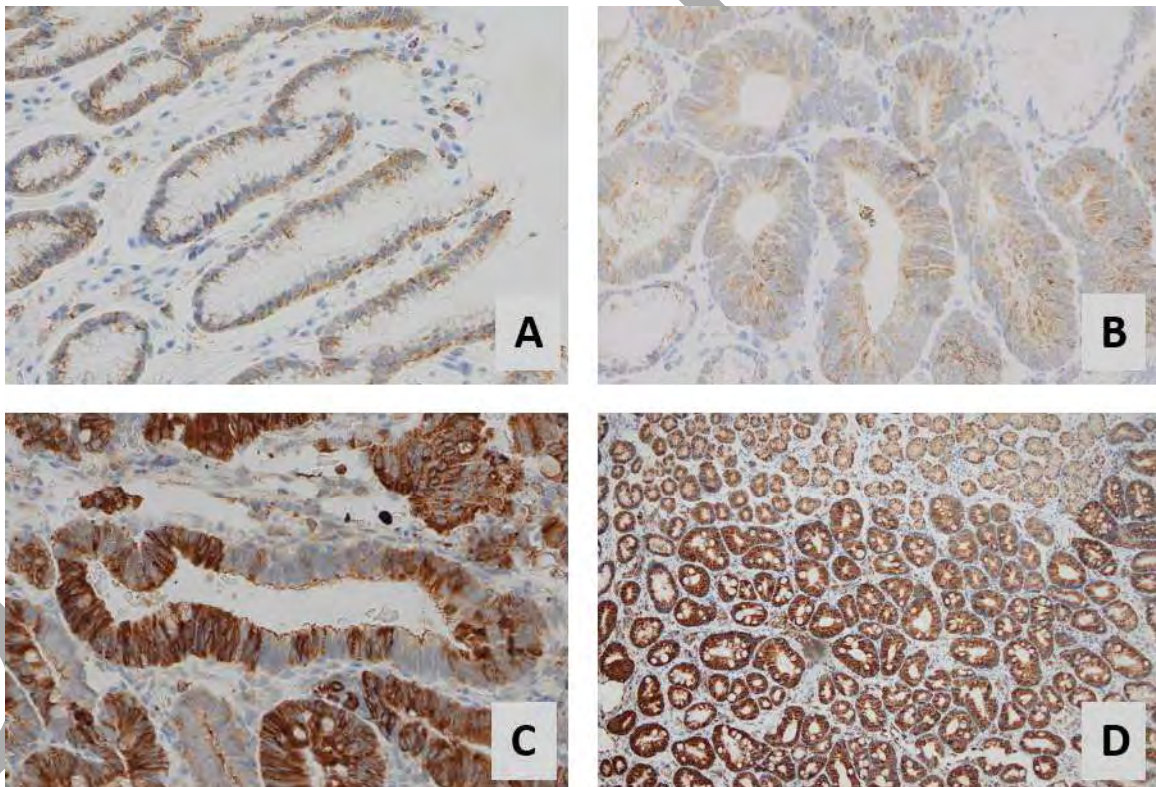
dominantnog membranskog obrasca (Slika 6). U uzorcima u kojima je zabilježen djelomičan gubitak bojenja u dubljim foveolarnim ili žljezdanim dijelovima inače uredne ili metaplastične sluznice takvo smanjenje nije smatrano aberantnim, budući da nije bio prisutan citoplazmatski niti periježgreni signal. Nasuprot tome, svaka prisutnost (>1 %) citoplazmatskog ili periježgrenog bojenja imala je prednost pred negativnim područjima pri određivanju konačnog obrasca, jer je predstavljala jasnu promjenu lokalizacije u odnosu na membranski obrazac divljeg tipa. S druge strane, potpuni izostanak bojenja (<1 %), potvrđen u odnosu na jasno pozitivne unutarnje i vanjske kontrole, interpretiran je kao aberantni nalaz (gubitak izražaja). Kao unutarnja kontrola korištene su antralne žlijezde. Primjeri pojedinih obrazaca prikazani su na Slici 6.



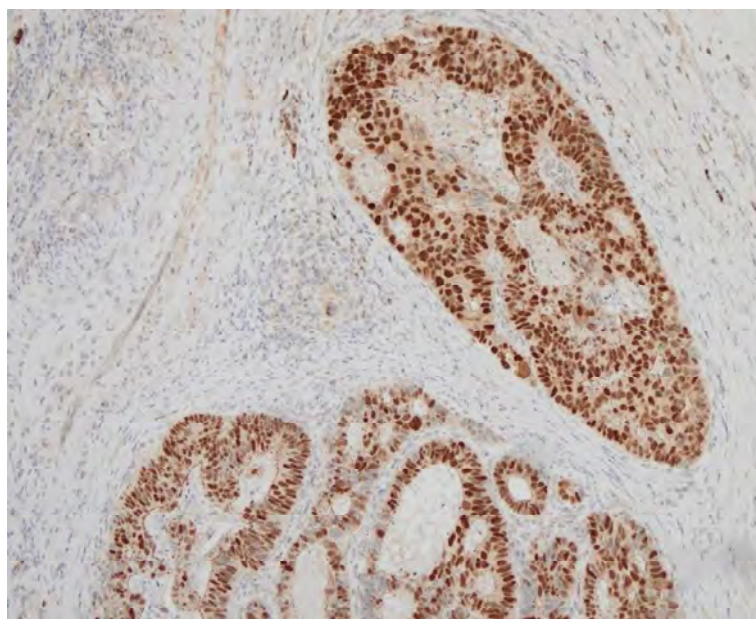
Slika 6. Reprezentativni obrasci izražaja COX-2 (klon CX-294). (A) Negativan uzorak bez membranske i citoplazmatske reakcije (IHK; 40×). (B) Membransko bazolateralno bojenje žljezdanog epitela (IHK; 40×). (C) Prijelaz između uredne želučane sluznice i intestinalne metaplazije, s bazolateralnim membranskim bojenjem (1B) u urednoj sluznici i luminalnim obrascem (1L) u području metaplazije; uočava se i gradijent izražaja unutar fovele (IHK; 20×). (D) Citoplazmatski/periježgreni obrazac izražaja bez dominantne membranske komponente (IHK; 40×). (\*Panel C ilustrira morfološku heterogenost izražaja unutar istog preparata, što predstavlja potencijalni interpretacijski izazov.)

#### 4.4.2.3 Evaluacija izražaja COX-2 detektiranog klonom SP21

Analiza izražaja COX-2 provedena je i monoklonskim protutijelom klon SP21. Primarni kriterij očitavanja odnosio se na intenzitet citoplazmatske reakcije u epitelu želučane sluznice, dok je jezgreni pozitivitet bilježen zasebno kao dodatna varijabla. Citoplazmatski intenzitet bodovan je semikvantitativno na ljestvici 0-3: 0 - vrlo slaba reakcija, 1 - slaba homogena reakcija, 2 - miješana slaba homogena uz žarišta srednje jake do jake reakcije, te 3 - srednje jaka do jaka homogena reakcija (Slika 7). Jezgreni pozitivitet definiran je kao prisutnost  $\geq 3$  jasno pozitivne jezgre u području neoplastičnog epitela, pri čemu se bilježio kao negativan (0) ili pozitivan (1) (Slika 8). Očitavanje je provedeno uz obveznu korelaciju s odgovarajućim HE obojenim preparatom, pri čemu su evaluirane morfološki relevantne strukture (foveole i žlijezdolike nakupine) koje odgovaraju području lezije. U slučaju gradijentnog ili heterogenog bojenja unutar istog preparata bilježen je dominantni intenzitet unutar analizirane morfološke jedinice. Kao interna kontrola korištene su antralne žlijezde.



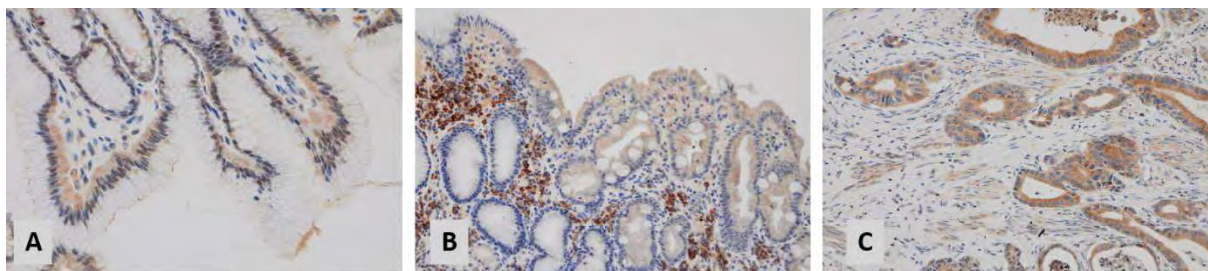
Slika 7. Reprezentativni obrasci citoplazmatskog izražaja COX-2 (klon SP21). (A) Vrlo slaba citoplazmatska reakcija (stupanj 0) bez jezgrenog pozitiviteta (IHK; 40 $\times$ ). (B) Slaba homogena citoplazmatska reakcija (stupanj 1) bez jezgrenog pozitiviteta (IHK; 40 $\times$ ). (C) Miješana citoplazmatska reakcija sa slabim bojenjem i žarištima srednje jakog izražaja (stupanj 2), bez jezgrenog pozitiviteta (IHK; 40 $\times$ ). (D) Primjer heterogenosti intenziteta citoplazmatskog izražaja unutar istog preparata, s jačom reakcijom u području intestinalne metaplazije i srednje jakom reakcijom u dubljim foveolama (stupanj 3) (10 $\times$ ).



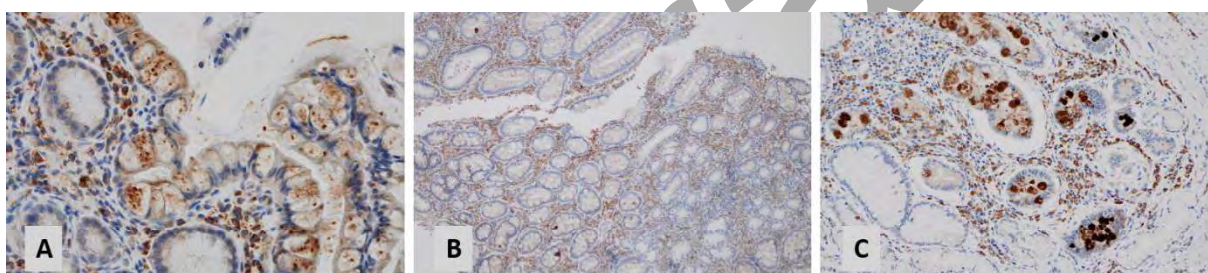
Slika 8. Primjer jezgrenog pozitiviteta COX-2 (klon SP21), definiranog kao prisutnost  $\geq 3$  jasno pozitivne jezgre u analiziranom području lezije (IHK; 20 $\times$ ). U prethodnoj slici svi prikazani primjeri bili su bez jezgrenog pozitiviteta (Slika 7B).

#### 4.4.2.4 *Evaluacija nakupljanja 4-HNE-PA detektiranih klonom HNEJ-2*

Analiza je bila usmjerena na citoplazmatsku reakciju unutar epitelnih stanica želučane sluznice, uz zasebnu procjenu nakupljanja 4-HNE-PA u vakuolama vrčastih stanica. Očitavanje je provedeno u morfološki definiranoj leziji prema odgovarajućem HE preparatu. Intenzitet citoplazmatskog bojenja procjenjivan je semikvantitativno na trostupanjskoj ljestvici (1-3), pri čemu je stupanj jedan označavao vrlo slabu, pretežno bazalnu reakciju, stupanj dva slabo homogeno bojenje, a stupanj tri jače homogeno citoplazmatsko bojenje (Slika 9). Nalaz je smatran pozitivnim ukoliko je reakcija bila prisutna u  $\geq 5$  % analizirane morfološke komponente. U slučajevima heterogenog ili gradijentnog rasporeda bojenja bilježen je dominantni intenzitet unutar analizirane lezije. Nakupljanje 4-HNE-PA u vakuolama vrčastih stanica procjenjivano je kao zasebna varijabla, neovisno o citoplazmatskom intenzitetu bojenja. Očitavanje je provedeno na trostupanjskoj ljestvici od nula do dva, pri čemu je nula označavalo odsutnost nakupljanja, jedan diskretno nakupljanje, a dva izraženije nakupljanje unutar vakuola vrčastih stanica (Slika 10). U uzorcima bez prisutne intestinalne metaplazije vrijednost ove varijable uvijek je bila nula.



Slika 9. Citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA (klon HNEJ-2) u epitelu želučane sluznice. (A) Vrlo slabo, pretežno bazalno citoplazmatsko bojenje (stupanj 1; IHK; 40×). (B) Slabo homogeno citoplazmatsko bojenje (stupanj 2; IHK; 20×), bez nakupljanja u vakuolama vrčastih stanica. (C) Jače homogeno citoplazmatsko bojenje (stupanj 3; IHK; 20×).



Slika 10. Obrasci vakuolarnog nakupljanja 4-HNE-PA u vrčastim stanicama intestinalne metaplazije. (A) Stupanj 1 - difuzno, diskretno nakupljanje u pojedinačnim vakuolama (40×). (B) Stupanj 1 - žarišno raspoređene, intenzivnije pozitivne vakuole, bez zahvaćanja više stanica unutar pojedinačne foveole (10×). (C) Stupanj 2 - izraženije nakupljanje s prisutnošću više intenzivno obojenih vakuola unutar iste foveole (20×). Odsutnost nakupljanja (stupanj 0) prikazana je u prethodnoj slici.

#### 4.5 Uzgoj staničnih linija

Svi eksperimenti sa staničnim kulturama provedeni su u sterilnim uvjetima unutar biološkog zaštitnog kabineta klase II. U istraživanju je korištena humana stanična linija adenokarcinoma želuca AGS. AGS stanice su uzgajane u bocama za staničnu kulturu (TC Flask T75, Vented Cap; Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) u DMEM mediju (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) uz dodatak 10 % fetalnog telećeg seruma (FCS, engl. *Fetal Calf Serum*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) pri 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> u vlažnoj atmosferi. Hranjivi medij mijenjan je svaka dva do tri dana. Nakon postizanja približno 80-90 % konfluencije adherentne stanice odvajane su enzimatskim tretmanom tripsinom-EDTA (1 %; Kemika, Zagreb, Hrvatska). Nakon uklanjanja medija stanice su isprane fosfatnim puferom (PBS, engl. *Phosphate-buffered saline*; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl i 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Grammol, Zagreb, Hrvatska) te inkubirane s otopinom tripsina-EDTA približno 5 minuta. Reakcija je zaustavljena dodatkom hranjivog medija, a stanice su centrifugirane 5 minuta pri

1100 rpm. Dobiveni stanični talog resuspendiran je u svježem mediju. Broj vijabilnih stanica određen je metodom isključivanja tripanskog modrila (Trypan Blue; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Suspenzija stanica pomiješana je s tripanskim modrilom u omjeru 1:10, a broj živih (neobojenih) stanica utvrđen je prebrojavanjem u Bürker-Türk komorici pomoću invertnog mikroskopa (Axiovert 25; ZEISS, Oberkochen, Njemačka).

#### 4.5.1 Ispitivanje citotoksičnosti 4-hidroksinonenala (4-HNE)

Za procjenu citotoksičnosti 4-HNE korišten je MTT test, koji se temelji na sposobnosti metabolički aktivnih stanica da reduciraju žutu tetrazolijevu sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) u netopive ljubičaste kristale formazana djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza gdje je intenzitet nastale boje proporcionalan broju živih, metabolički aktivnih stanica (125).

Za potrebe ispitivanja citotoksičnosti stanice su prije tretmana inkubirane u mediju bez seruma. Stanice su nasađene u prozirne mikrotitarske pločice s 96 bunarića (TPP, Trasadingen, Švicarska) u gustoći od 10 000 stanica po jažici u 180  $\mu$ L medija te inkubirane 24 sata radi adherencije. Nakon toga dodano je 20  $\mu$ L otopine 4-HNE u različitim koncentracijama (0, 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40 i 50  $\mu$ M), nakon čega su stanice inkubirane 24 ili 48 sati. Kontrolne jažice nisu sadržavale 4-HNE. Po završetku inkubacije medij je uklonjen, a stanice su inkubirane s MTT otopinom (5 mg/mL u PBS-u) tijekom 2 sata pri 37 °C. Nastali kristali formazana otopljeni su dodatkom dimetilsulfoksida (DMSO, engl. *Dimethyl sulfoxide*; Supelco, Merck, Darmstadt, Njemačka), a apsorbancija je izmjerena na spektrofotometru Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, Shanghai, Kina) pri valnoj duljini od 570 nm uz referentnu valnu duljinu od 650 nm. Rezultati su izraženi kao postotak kontrole nakon normalizacije unutar svakog biološkog ponavljanja. Eksperimenti su provedeni u tri neovisna biološka ponavljanja, uz šest tehničkih replikata.

#### 4.5.2 Ispitivanje učinka 4-HNE na stvaranje ROS-a u stanicama karcinoma želuca

Stvaranje unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) određeno je fluorescentnom probom 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetatom (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Prilikom ulaska u stanice, DCFH-DA se pod djelovanjem staničnih estera deacetilira u nefluorescentni diklorodihidrofluorescein (DCFH), koji se u prisutnosti ROS-a oksidira u fluorescentni diklorofluorescein (DCF), a intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta (126). AGS stanice nasađene su u crne mikrotitarske pločice s 96 bunarića (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija) u gustoći od 10 000 stanica u 200  $\mu$ L medija po bunariću, u pet tehnička replikata za svaki tretman. Nakon adherencije preko noći stanice su tretirane s 0, 5, 10 i 30  $\mu$ M 4-HNE- u kako bi se ispitao njegov akutni i produljeni učinak na unutarstanično stvaranje ROS-a. Porast fluorescencijskog signala ne mora nužno odražavati isključivo povećanu ROS-a, već može biti posljedica

autofluorescencije uzorka, nespecifične oksidacije probe i drugih izvora nespecifičnog signala. Stoga su u analizu su uključeni i odgovarajući nebojani uzorci radi procjene pozadinskog signala.

#### 4.5.2.1 Akutni (time-course) učinak 4-HNE

Za procjenu ranog stvaranja ROS-a, stanice su najprije tretirane s 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA tijekom 30 minuta u mraku pri 37 °C. Nakon uklanjanja viška sonde dodan je bezbojni medij koji je sadržavao 4-HNE u koncentracijama 0, 5, 10 i 30  $\mu\text{M}$ . Fluorescencija je mjerena fluorimetrom Spark (Tecan, Austrija) pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 500 nm i emisijskoj valnoj duljini od 529 nm nakon 1, 2 i 4 sata inkubacije, kako bi se procijenila dinamika stvaranja ROS-a tijekom vremena.

#### 4.5.2.2 Učinak 24-satnog tretmana 4-HNE

Za procjenu učinka produljene izloženosti, stanice su tretirane 4-HNE-om (0, 5, 10 i 30  $\mu\text{M}$ ) tijekom 24 sata. Po završetku inkubacije stanice su inkubirane s 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA tijekom 30 minuta u mraku nakon čega je medij zamijenjen svježim bezbojnim medijem. Fluorescencija je izmjerena fluorimetrom pod istim uvjetima (500/529 nm). Rezultati su izraženi kao postotak kontrole nakon normalizacije unutar svakog biološkog ponavljanja. Svi eksperimenti su provedeni u najmanje tri neovisna biološka ponavljanja, uz tehničke triplikate, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška sredine (engl. *standard error of the mean*; SEM).

#### 4.5.3 Procjena migracijske sposobnosti AGS stanica - test ogrebotine (engl. *scratch test*)

Utjecaj 4-HNE na migracijsku sposobnost AGS stanica procijenjen je metodom testa ogrebotine, koji se temelji na praćenju zatvaranja umjetno stvorene ogrebotine u konfluentnom monosloju stanica. AGS stanice nasadene su u prozirne 96-jažične mikrotitarske pločice u gustoći od 10 000 stanica u 200  $\mu\text{L}$  medija po jažici te inkubirane do formiranja konfluentnog monosloja. Nakon adherencije i postizanja odgovarajuće konfluencije, stanice su tretirane različitim koncentracijama 4-HNE (5 i 10  $\mu\text{M}$ ), dok su kontrolne stanice ostavljene netretirane. Nakon tretmana, medij je uklonjen, a stanice su inkubirane s mitomicinom C (Mitomycin C; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) u koncentraciji od 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  u mediju bez seruma tijekom 2 sata radi inhibicije proliferacije, kako bi se migracija stanica mogla procijeniti neovisno o njihovoj proliferativnoj aktivnosti. U svakom monosloju stanica napravljen je linearni zarez sterilnim vrhom pipete. Stanice su potom isprane fosfatnim puferom (PBS) radi uklanjanja odvojenih stanica, nakon čega je dodan svježi medij sa serumom. Fotografije ogrebotine snimljene su neposredno nakon stvaranja zarez (0 sati) te u više vremenskih točaka tijekom inkubacije (10, 20 i 30 sati) pomoću Holomonitor M4 uređaja (PHI, Sweden). Migracija stanica kvantificirana je analizom primjenom Holomonitor App Suite 4.0.2. softvera, pri čemu su određivani širina ogrebotine (engl. *gap width*,  $\mu\text{m}$ ), površina prekrivena stanicama (engl. *cell-covered area*; % i  $\mu\text{m}^2$ ) te površina bez stanica (engl. *cell-free area*; % i  $\mu\text{m}^2$ ). S obzirom na tehničku varijabilnost početne širine ogrebotine, za

primarnu analizu korištena je varijabla površina bez stanica (%), koja je dodatno normalizirana na početno stanje za svako pojedino vidno polje. Za svako vidno polje izračunata je relativna promjena površine bez stanica kroz vrijeme u odnosu na vrijednost u 0. satu, čime je omogućena usporedba dinamike zatvaranja rane neovisno o početnoj veličini ogrebotine. Za svaki tretman i vremensku točku analizirano je više vidnih polja, a pojedinačna mjerenja dobivena analizom mikrofotografija predstavljala su tehničke replike unutar istog eksperimentalnog uvjeta. Dinamika migracije procijenjena je kroz vremenski tijek promjena normalizirane vrijednosti površine bez stanica, kao i putem sažetih pokazatelja, uključujući nagib linearne regresije promjene kroz vrijeme te površinu ispod krivulje (engl. *area under the curve*, AUC). Dodatno, analizirane su razlike između skupina u unaprijed definiranim vremenskim točkama (20 i 30 sati).

#### 4.5.4 Imunocitokemija

Imunocitokemijska analiza izražaja COX-2 provedena je na adherentnim AGS stanicama uzgojenima u osmerokomornim mikroskopskim staklima s ugrađenim komorama za staničnu kulturu (engl. *chamber slides*). Stanice su nakon tretmana 10  $\mu$ M 4-HNE-om i odgovarajuće inkubacije fiksirane te obrađene prema modificiranom imunohistokemijskom protokolu prilagođenom staničnoj kulturi. Zbog tehničkih ograničenja korištenih komornih stakalaca toplinski inducirano razotkrivanje antigena nije provedeno. Nakon fiksacije i ispiranja u fosfatnom puferu (PBS) blokirana je endogena peroksidazna aktivnost inkubacijom s EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagentom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) tijekom 5 minuta. Primijenjena su dva monoklonska protutijela za COX-2: klon CX-294 (Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Danska; razrjeđenje 1:100) i klon SP21 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD; razrjeđenje 1:200), razrijeđena u EnVision FLEX Antibody Diluentu (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Inkubacija s primarnim protutijelima trajala je 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Detekcija imunoreakcije provedena je polimernim sustavom EnVision FLEX/HRP (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) tijekom 20 minuta, a reakcija je vizualizirana uporabom EnVision FLEX DAB+ kromogena (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Kontrastno bojanje provedeno je Mayerovim hematoksilinom (Dako, Glostrup, Danska). Kao negativna kontrola korišteni su preparati obrađeni istim protokolom uz izostavljanje primarnog protutijela. Kao pozitivna kontrola korišteni su parafinski rezovi prethodno potvrđenih COX-2 pozitivnih uzoraka, obrađeni istim protokolom bez razotkrivanja antigena.

#### 4.6 Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka obuhvatila je deskriptivnu i analitičku biostatistiku te regresijsko modeliranje, a provedena je u programskom okruženju R (127). Numeričke varijable opisane su

srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom ili medijanom i interkvartilnim rasponom (engl. *interquartile range*, IQR), ovisno o distribuciji podataka, dok su kategoričke varijable prikazane apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike između nezavisnih skupina za numeričke varijable analizirane su analizom varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) ili Kruskal-Wallisovim testom kada pretpostavke normalne raspodjele nisu bile zadovoljene. Monotoni trendovi kontinuiranih varijabli kroz stadije Correa kaskade procijenjeni su Jonckheere-Terpstra testom, uz primjenu permutacijskog pristupa ( $n_{perm} = 10\ 000$ ) zbog prisutnosti vezanih vrijednosti i manjih poduzoraka. Usporedbe između dviju skupina ordinalnih varijabli provedene su Wilcoxonovim testom. Za usporedbu kategoričkih varijabli korišten je  $\chi^2$ -test, a u slučajevima malih očekivanih frekvencija Fisherov egzaktni test. Povezanost između ordinalnih ili ne-normalno raspodijeljenih varijabli procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije rangova. Nedostajuće vrijednosti rješavane su metodom parnog isključivanja (engl. *pairwise deletion*), dok su za apsolutni broj neutrofila i limfocita imputirane vrijednosti medijanom unutar odgovarajuće histopatološke kategorije (stadija Correa kaskade), čime je očuvana distribucija varijabli unutar pojedinih skupina. Na temelju tih vrijednosti izračunat je N/L omjer, koji je zbog asimetrične distribucije transformiran prirodnim logaritmom prije uključivanja u regresijske modele. Distribucija imunohistokemijskih obrazaca bojenja između histoloških skupina analizirana je odgovarajućim neparametrijskim i kategorijskim testovima, uključujući Pearsonov  $\chi^2$  test, Fisherov egzaktni test i Kruskal-Wallisov test, uz procjenu veličine učinka (Cramerov V i epsilon-kvadrat,  $\epsilon^2$ ). U slučaju statistički značajnih globalnih testova provedene su post-hoc parne usporedbe primjenom Dunnovog ili Fisherovog testa uz korekciju za višestruka testiranja (Holm ili Benjamini-Hochberg metoda). Za kontingencijske tablice s malim očekivanim frekvencijama p-vrijednosti su procijenjene Monte Carlo simulacijom. Povezanost imunohistokemijskih biomarkera s kliničko-patološkim i laboratorijskim parametrima procijenjena je Spearmanovom rang-korelacijom za kontinuirane i ordinalne varijable, dok je za binarne varijable korišten Wilcoxonov test. Kako bi se kontrolirao rizik lažno pozitivnih nalaza zbog višestrukog testiranja, p-vrijednosti su korigirane Benjamini-Hochberg metodom kontrole stope lažnih otkrića (engl. *false discovery rate*, FDR).

Regresijski modeli korišteni su s ciljem kvantificiranja povezanosti između imunohistokemijskih biomarkera, kliničko-patoloških parametara i stadija bolesti te procjene njihove potencijalne uloge u progresiji želučane karcinogeneze. Progresija želučane karcinogeneze kroz Correa kaskadu modelirana je ordinalnim i logističkim regresijskim pristupima. Primarni analitički okvir predstavljao je model susjednih kategorija (engl. *adjacent-category logit model*) primijenjen na šestostupanjsku Correa kaskadu, uz primjenu metode redukcije pristranosti zbog parcijalne separacije podataka. Radi provjere robusnosti nalaza provedena je multinomijalna logistička regresija, a modeli su uspoređeni prema informacijskim kriterijima (engl. *Akaike information criterion*, AIC; *Bayesian information criterion*, BIC),

logaritamskoj funkciji vjerodostojnosti i McFaddenovu pseudo-koeficijentu determinacije. Dodatno je analiziran trostupanjski prikaz progresije bolesti istim pristupom. Za procjenu rizika malignog ishoda konstruiran je binarni logistički model uz penaliziranu logističku regresiju prema Firthu (128). Diskriminacijska sposobnost binarnog modela procijenjena je analizom krivulje odnosa specifičnosti i osjetljivosti klasifikatora (engl. *receiver operating characteristic*, ROC) izračunom površine ispod krivulje (engl. *area under the curve*, AUC) DeLong metodom uz 95 % interval pouzdanosti, dok je optimalni prag klasifikacije određen Youdenovim indeksom. Interna validacija modela provedena je bootstrap postupkom (1000 ponavljanja), kalibracija modela procijenjena je grafički i numerički (kalibracijski presjek i nagib), ukupna prediktivna pogreška kvantificirana je Brierovim indeksom, a klinička korisnost dodatno analizirana metodom krivulje odluke. Statistička značajnost određena je pri razini  $p < 0,05$ , a rezultati su, gdje je bilo primjenjivo, interpretirani uz procjenu veličine učinka i 95 % intervale pouzdanosti.

Podaci dobiveni u eksperimentima na staničnim kulturama analizirani su na razini bioloških ponavljanja, pri čemu su tehničke replike agregirane u srednju vrijednost. U MTT testu citotoksičnosti učinak koncentracije 4-HNE procijenjen je linearnim mješovitim modelom (LMM) s koncentracijom kao fiksnim efektom i eksperimentom kao slučajnim interceptom, dok su post-hoc usporedbe koncentracija s kontrolom provedene Dunnettovim kontrastima uz Holm korekciju. Polumaksimalna inhibitorna koncentracija ( $IC_{50}$ ) procijenjena je četveroparametarskim log-logističkim modelom (engl. *four-parameter log-logistic model*, 4PL). Analiza produkcije reaktivnih kisikovih vrsta provedena je linearnim mješovitim modelom s koncentracijom i vremenom inkubacije kao fiksnim efektima te eksperimentom kao slučajnim efektom, uz procjenu značajnosti analizom varijance tipa III (engl. *type III analysis of variance*) i Satterthwaiteovom aproksimacijom stupnjeva slobode. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM, a veličina učinka procijenjena je Hedgesovim g koeficijentom. Dodatno, migracijska sposobnost stanica procijenjena testom ogrebotine analizirana je na razini bioloških ponavljanja, pri čemu su tehničke replike (pojedinačna vidna polja) prethodno agregirane u srednje vrijednosti za svako biološko ponavljanje, skupinu i vremensku točku. Za svako vidno polje izračunat je postotak zatvaranja rane na temelju normalizirane površine bez stanica u odnosu na početno stanje (0 h), čime je omogućena usporedba dinamike zatvaranja rane neovisno o početnoj širini ogrebotine. Kao sažeti pokazatelji migracije analizirani su nagib linearne regresije promjene zatvaranja rane kroz vrijeme te površina ispod krivulje (AUC), izračunati za svako biološko ponavljanje. Dodatno, razlike između skupina analizirane su u pojedinim vremenskim točkama tijekom inkubacije (10, 20 i 30 sati) primjenom Kruskal–Wallisova testa, uz post hoc Dunnovu analizu s Holmovom korekcijom za višestruka testiranja.

## 5 REZULTATI

### 5.1 Deskriptivna analiza uzorka

Demografska i klinička obilježja ispitanika čiji su uzorci uključeni u studiju prikazani su u Tablici 3. Prosječna dob ispitanika u ukupnom uzorku iznosila je  $67,2 \pm 11,2$  godine. Uočene su statistički značajne razlike u dobi među skupinama (ANOVA;  $p < 0,001$ ), pri čemu su bolesnici s karcinomom želuca bili najstariji ( $72,4 \pm 9,1$  godina), dok su najmlađi ispitanici bili u skupini uredne sluznice ( $53,7 \pm 10,8$  godina). Statistička analiza monotonog trenda dodatno je potvrdila značajan rast dobi kroz stadije Correa kaskade (Jonckheere-Terpstra test;  $p < 0,001$ ). U pogledu distribucije prema spolu, žene su činile 41,2 %, a muškarci 58,8 % ukupnog uzorka. Iako je u skupini karcinoma zabilježen veći udio muškaraca (77,5 %), razlike u spolnoj distribuciji među skupinama nisu dosegnule statističku značajnost ( $\chi^2$ -test;  $p = 0,06$ ). Podatak o pušenju bio je dostupan za 121 ispitanika (NA = 27). Među njima je 35 ispitanika (28,9 %) bilo aktivnih pušača, dok je 86 (71,1 %) bilo nepušača. Učestalost pušenja nije se značajno razlikovala među skupinama Correa kaskade (Fisherov egzaktni test;  $p = 0,86$ ). Podaci o uzimanju NSAID bili su dostupni za 134 ispitanika (NA = 14). Redovito ili povremeno uzimanje NSAID-a navelo je 33 ispitanika (24,6 %), dok 101 ispitanik (75,4 %) nije uzimao ovu terapiju. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti uzimanja NSAID-a među skupinama (Fisherov egzaktni test;  $p = 0,75$ ). Vrijednosti C-reaktivnog proteina (CRP) bile su dostupne za 110 ispitanika (NA = 38). Uočen je postupni porast CRP-a duž Correa kaskade, s najvišim vrijednostima u skupini karcinoma (medijan = 16,1 mg/L; IQR = 2,9-44,9). Razlike među skupinama bile su statistički značajne (Kruskal-Wallis;  $p = 0,01$ ), a dodatno je potvrđen i značajan rastući trend kroz stadije bolesti (Jonckheere-Terpstra test;  $p = 0,02$ ), što upućuje na progresivno izraženije sustavno upalno stanje u osoba s malignom bolešću. Slično tomu, N/L omjer, dostupan za 123 ispitanika (NA = 25), bio je značajno viši u skupini karcinoma (medijan = 3,6; IQR = 2,7-5,3) u usporedbi s ostalim skupinama (Kruskal-Wallis;  $p = 0,006$ ). Također je utvrđen značajan rastući trend N/L omjera kroz Correa kaskadu (Jonckheere-Terpstra test;  $p = 0,001$ ), dodatno potvrđujući postupno jačanje sustavne upale u uznapredovalim lezijama. Podaci o serumskom željezu (Fe) bili su dostupni za 45 ispitanika, uz velik broj nedostajućih vrijednosti (NA = 103). Uočen je trend smanjenja koncentracije željeza prema naprednijim lezijama, s najnižim vrijednostima u skupini karcinoma (medijan = 4,3  $\mu\text{mol/L}$ ; IQR = 2,7-6,7). Iako razlike među skupinama nisu dosegnule statističku značajnost u globalnoj usporedbi (Kruskal-Wallis;  $p = 0,07$ ), Jonckheere-Terpstra test pokazao je značajan opadajući trend ( $p = 0,003$ ), što upućuje na postupne metaboličke promjene povezane s progresijom bolesti. Infekcija bakterijom *H. pylori* pokazala je statistički značajne razlike među skupinama ( $p = 0,015$ ; Fisherov egzaktni test). Infekcija je bila najčešća u skupini atrofije (42,9 %) i karcinoma (25 %), dok su svi uzorci uredne sluznice bili očekivano negativni na *H. pylori*.

Tablica 3. Demografska, klinička i laboratorijska obilježja uzorka prema skupinama Correa kaskade

Varijabla	Svi uzorci (N=148)	Uredni (n = 20)	Atrofija (n = 14)	Metaplazija (n = 31)	Atrofija + metaplazija (n = 22)	Displazija (n = 21)	Karcinom (n = 40)	p (među skupinama)	p (trend)
<b>Dob (godine)</b>	67.2 ± 11.2	53.7 ± 10.8	66.9 ± 8.4	69.0 ± 8.6	66.6 ± 12.8	68.4 ± 8.9	72.4 ± 9.1	<0.001*** (ANOVA)	<0.001***
<b>Spol (Ž/M)</b>	61 (41.2) / 87 (58.8)	8 / 12	8 / 6	13 / 18	13 / 9	10 / 11	9 / 31	0.06 ( $\chi^2$ )	—
<b>Pušenje (da)</b>	35 (28.9)	7 (36.8)	3 (21.4)	10 (34.5)	5 (25.0)	3 (20.0)	7 (29.2)	0.86 (Fisher)	—
<b>NSAID (da)</b>	33 (24.6)	4 (20.0)	4 (30.8)	9 (30.0)	3 (15.0)	5 (33.3)	8 (22.2)	0.75 (Fisher)	—
<b>CRP (mg/L)</b>	3.9 (1.6-15.1)	3.0 (1.7-8.4)	4.6 (2.6-12.0)	2.7 (1.2-7.1)	3.2 (1.7-4.5)	2.6 (1.1-4.3)	16.1 (2.9-44.9)	0.01* (KW)	0.020*
<b>N/L omjer</b>	2.6 (1.8-3.8)	2.0 (1.7-2.7)	3.0 (1.7-3.9)	2.3 (1.7-3.6)	2.6 (1.7-3.6)	1.9 (1.6-3.2)	3.6 (2.7-5.3)	0.006**(KW)	0.001**
<b>Serumsko Fe (<math>\mu</math>mol/L)</b>	12.0 (4.5-15.8)	15.8 (10.0-21.1)	14.2 (9.2-15.8)	13.5 (7.7-16.2)	14.2 (6.7-16.3)	12.5 (10.4-16.5)	4.3 (2.7-6.7)	0.07 (KW)	0.003**
<b>H. pylori (pozitivan)</b>	29 (19.6)	0 (0)	6 (42.9)	5 (16.1)	6 (27.3)	2 (9.5)	10 (25.0)	0.015* (Fisher)	—

Napomena: Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ili medijan (interkvartilni raspon). Kategorijske varijable prikazane su kao broj (postotak). ANOVA - analiza varijance; KW - Kruskal-Wallis test;  $\chi^2$  - hi-kvadrat test; Fisher - Fisherov egzaktni test. p (trend) dobiven je Jonckheere-Terpstra testom. Analiza je provedena na dostupnim podacima (pairwise deletion). (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)

U dodatnoj analizi isključeni su uzorci uredne sluznice, a usporedba je provedena između skupina atrofije, intestinalne metaplazije, kombinirane atrofije i metaplazije, displazije te karcinoma (Tablica 4). Nakon isključenja urednih uzoraka, razlike u dobi među skupinama više nisu bile statistički značajne (ANOVA;  $p = 0,14$ ), iako je skupina karcinoma i dalje imala najvišu prosječnu dob. Distribucija ispitanika prema spolu pokazala je statistički značajnu razliku u globalnoj analizi ( $\chi^2$  test;  $p = 0,03$ ), međutim post hoc analiza nije identificirala statistički značajne razlike između pojedinih skupina, što upućuje na neujednačenu raspodjelu bez jasnog obrasca između susjednih stadija. Učestalost pušenja i uzimanja NSAID nije se značajno razlikovala među skupinama (Fisherov egzaktni test;  $p = 0,86$  i  $p = 0,66$ ).

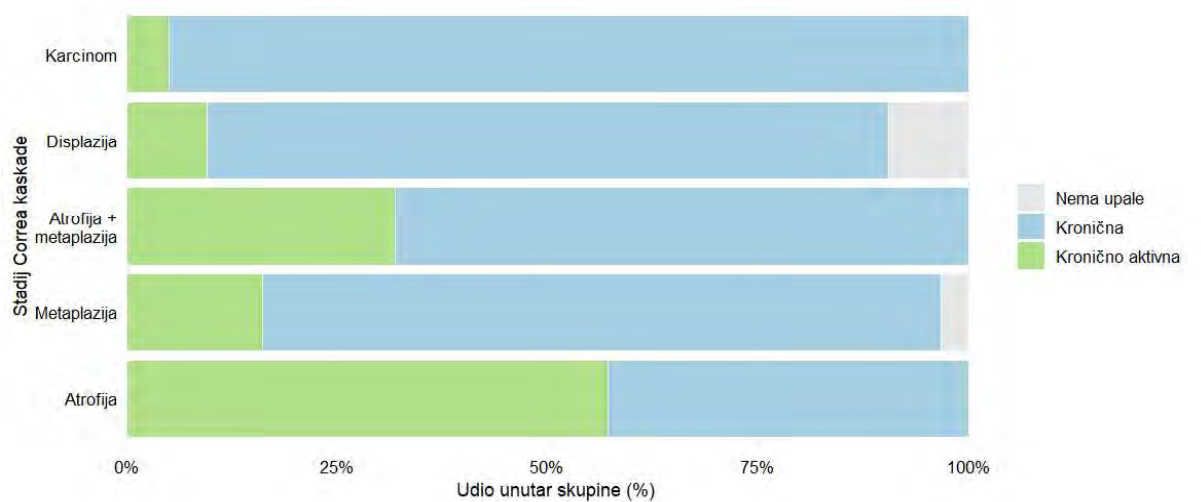
Vrijednosti serumskog željeza pokazale su postupno smanjenje prema naprednijim lezijama, s najnižim koncentracijama u skupini karcinoma (medijan =  $4,3 \mu\text{mol/L}$ ; IQR =  $2,7-6,7$ ). Iako razlike među skupinama nisu dosegnule statističku značajnost u globalnoj usporedbi (Kruskal-Wallis;  $p = 0,07$ ), dodatna analiza monotonog trenda potvrdila je značajan opadajući trend kroz stadije bolesti (Jonckheere-Terpstra test;  $p = 0,010$ ). Suprotno tome, vrijednosti CRP bile su značajno više u skupini karcinoma (medijan =  $16,1 \text{ mg/L}$ ; IQR =  $2,9-44,9$ ) u usporedbi s ostalim skupinama (Kruskal-Wallis;  $p = 0,006$ ), uz potvrđen značajan rastući trend kroz stadije bolesti (Jonckheere-Terpstra test;  $p = 0,022$ ), što upućuje na progresivno izraženije sustavno upalno stanje u malignim lezijama. Post hoc analiza pokazala je da su razlike prvenstveno prisutne između skupina s karcinomom i displazijom te između karcinoma i intestinalne metaplazije. Sličan obrazac uočen je i za N/L omjer, koji je bio značajno viši u karcinomima (medijan =  $3,6$ ; IQR =  $2,7-5,3$ ; Kruskal-Wallis;  $p = 0,011$ ), uz statistički značajan rastući trend kroz Correa kaskadu (Jonckheere-Terpstra test;  $p = 0,006$ ). Post hoc analiza pokazala je statistički značajnu razliku između skupina s karcinomom i displazijom. Za razliku od analize koja je uključivala uredne uzorke, prisutnost infekcije *H. pylori* nije se značajno razlikovala među skupinama nakon njihova isključenja (Fisherov test;  $p = 0,18$ ), iako je najviša učestalost zabilježena u skupini atrofije ( $42,9\%$ ).

Tablica 4. Deskriptivna analiza i usporedba demografskih, kliničkih i upalnih parametara među skupinama Correa kaskade nakon isključenja urednih uzoraka

Varijabla	Atrofija	Metaplazija	Atrofija + metaplazija	Displazija	Karcinom	p (među skupinama)	p (trend)
<b>Dob (godine)</b>	66.9 ± 8.4	69.0 ± 8.6	66.6 ± 12.8	68.4 ± 8.9	72.4 ± 9.1	0.14 (ANOVA)	—
<b>Spol (Ž/M) (%)</b>	8 (57.1) / 6 (42.9)	13 (41.9) / 18 (58.1)	13 (59.1) / 9 (40.9)	10 (47.6) / 11 (52.4)	9 (22.5) / 31 (77.5)	0.03* ( $\chi^2$ )	—
<b>NSAID (da) (%)</b>	4 (30.8)	9 (30.0)	3 (15.0)	5 (33.3)	8 (22.2)	0.66 (Fisher)	—
<b>Pušenje (da) (%)</b>	3 (21.4)	10 (34.5)	5 (25.0)	3 (20.0)	7 (29.2)	0.86 (Fisher)	—
<b>Serumsko Fe (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	14.2 (9.2-15.8)	13.5 (7.7-16.2)	14.2 (6.7-16.3)	12.5 (10.4-16.5)	4.3 (2.7-6.7)	0.07 (KW)	0.010*
<b>CRP (mg/L)</b>	4.6 (2.6-12.0)	2.7 (1.2-7.1)	3.2 (1.7-4.5)	2.6 (1.1-4.3)	16.1 (2.9-44.9)	0.006** (KW)	0.022*
<b>N/L omjer</b>	3.0 (1.7-3.9)	2.3 (1.7-3.6)	2.6 (1.7-3.6)	2.0 (1.6-3.2)	3.6 (2.7-5.3)	0.011* (KW)	0.006**
<b><i>H. pylori</i> (pozitivan (%))</b>	6 (42.9)	5 (16.1)	6 (27.3)	2 (9.5)	10 (25.0)	0.18 (Fisher)	—
<b>Aktivnost upale</b>	1: 42.9; 2: 57.1	0: 3.2; 1: 80.6; 2: 16.1	1: 68.2; 2: 31.8	0: 9.5; 1: 81.0; 2: 9.5	1: 95.0; 2: 5.0	<0.001*** (Fisher)	—
<b>Mononuklearni infiltrat (0-3)</b>	2 (2-3)	2 (1.5-3)	2 (2-3)	2 (1-2)	2 (1-3)	0.19 (KW)	—
<b>Neutrofili (0-3)*</b>	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	2.0 (1.5-2.0)	1.0 (1.0-1.0)	2.0 (1.5-2.5)	0.53 (KW)	—

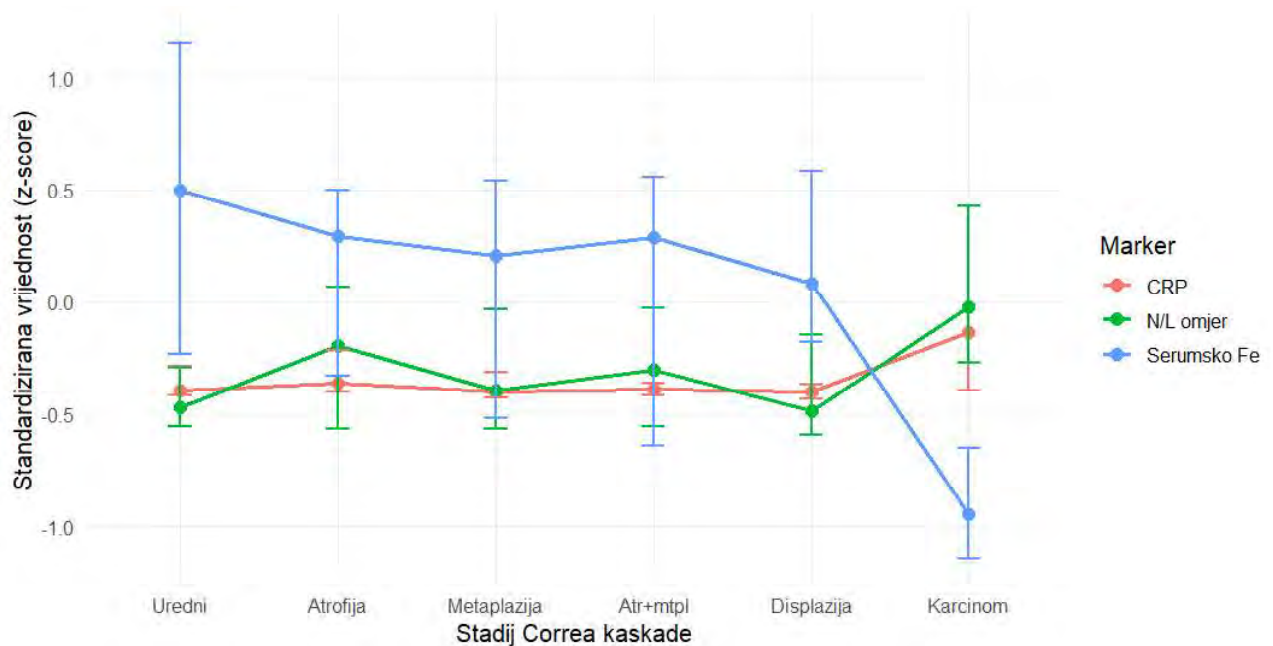
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ili medijan (interkvartilni raspon). Kategorijske varijable prikazane su kao broj (postotak). ANOVA - analiza varijance; KW - Kruskal-Wallis test;  $\chi^2$  - hi-kvadrat test; Fisher - Fisherov egzaktni test. p (trend) dobiven je Jonckheere-Terpstra testom (permutacijski pristup, nperm = 10 000). Analiza je provedena na dostupnim podacima (pairwise deletion). \* Analiza provedena samo u poduzorku s kronično aktivnom upalom. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)

Analiza lokalne upale pokazala je statistički značajne razlike u aktivnosti upale među skupinama (Fisherov egzaktni test;  $p < 0,001$ ). Kronična aktivna upala bila je najčešće prisutna u skupini atrofije (57,1 %), dok je u ostalim skupinama dominirala kronična upala (Slika 11). U skupini karcinoma kronično aktivna komponenta bila je rijetka (5 %), što upućuje na promjenu obrasca lokalne upalne reakcije u uznapredovalim lezijama. Nasuprot tomu, stupanj mononuklearnog infiltrata nije se značajno razlikovao među skupinama (Kruskal-Wallisov test;  $p = 0,19$ ). Analiza neutrofilnog infiltrata dodatno je provedena u poduzorku s kronično aktivnom upalom ( $n = 24$ ), pri čemu nisu utvrđene statistički značajne razlike u jačini infiltrata neutrofilnih granulocita među skupinama (Kruskal-Wallisov test;  $p = 0,53$ ). Ovakav obrazac lokalne upale razlikuje se od sustavnih upalnih pokazatelja, koji pokazuju progresivni porast prema uznapredovalim stadijima bolesti.



Slika 11. Distribucija kategorija aktivnosti lokalne upale unutar skupina Correa kaskade nakon isključenja urednih uzoraka.

Usporedba rezultata dobivenih analizom cjelokupnog uzorka i analizom nakon isključenja uredne sluznice pokazuje visoku razinu konzistentnosti u obrascu promjena ključnih kontinuiranih parametara. Dok je u analizi koja uključuje uredne uzorke uočen jasan monotoni trend promjena kroz cijelu Correa kaskadu, dodatna analiza ograničena na patološke stadije potvrđuje da se ti trendovi zadržavaju i unutar samog spektra bolesti. Posebno je važno da su rastući trendovi CRP-a i N/L omjera te opadajući trend serumskog željeza ostali statistički značajni i nakon isključenja urednih uzoraka, što upućuje na to da uočene promjene ne odražavaju isključivo razliku između normalne i patološki promijenjene sluznice, već kontinuiranu progresiju upalnih i metaboličkih poremećaja tijekom razvoja bolesti (Slika 12).



Slika 12. Integrativni prikaz standardiziranih vrijednosti CRP-a, N/L omjera i serumskog željeza kroz stadije Corree kaskade. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon (IQR) standardiziranih z-vrijednosti. Graf služi deskriptivnom prikazu općih trendova biomarkera kroz stadije bolesti, dok su statističke usporedbe i rezultati testiranja prikazani u tekstu.

## 5.2 Izražaj biomarkera duž Corree kaskade

### 5.2.1 Izražaj COX-2 detektiran klonom CX-294

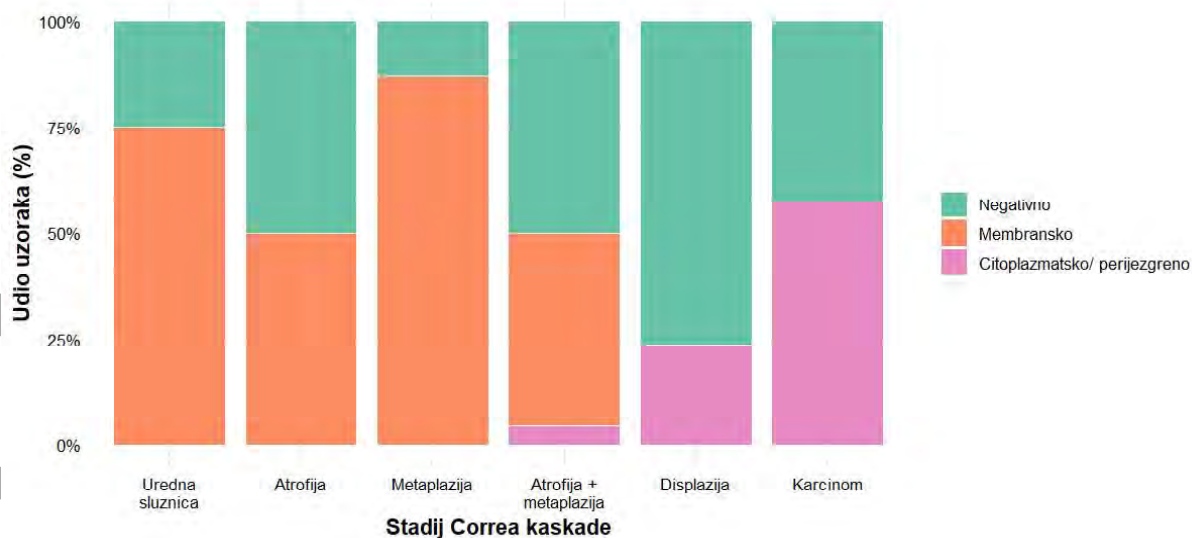
#### 5.2.1.1 Trostupanjska klasifikacija obrasca bojenja COX-2

Imunohistokemijski izražaj COX-2, detektiran primjenom klona CX-294, analiziran je u šest histoloških skupina duž Corree kaskade primjenom trostupanjske klasifikacije (0 - negativno bojenje, 1 - membransko bojenje, 2 - citoplazmatsko/perijezgreno bojenje). Raspodjela obrazaca bojenja značajno se razlikovala između pojedinih histoloških stadija (Pearsonov  $\chi^2$  test s Monte Carlo simuliranom p-vrijednošću;  $\chi^2 = 107,6$ ;  $p < 0,001$ ; Cramerov  $V = 0,603$ ), što upućuje na snažnu povezanost obrasca bojenja s razvojnim stadijem lezije (Tablica 5, Slika 13). U ranim stadijima Corree kaskade, odnosno u urednoj sluznici i intestinalnoj metaplaziji, dominirao je membranski izražaj COX-2, dok je u displazijama i karcinomima zabilježen gubitak membranske lokalizacije uz porast citoplazmatsko/perijezgrenog izražaja, pri čemu je u displaziji dodatno uočen povećani udio negativnih uzoraka ( $p < 0,001$ ;  $\chi^2 = 107,6$ ). U urednoj želučanoj sluznici i intestinalnoj metaplaziji prevladavao je membranski obrazac bojenja (75,0 % odnosno 87,1 %), uz manji udio negativnih uzoraka i bez citoplazmatsko/perijezgrene lokalizacije.

Tablica 5. Distribucija obrazaca bojenja COX-2 (klon CX-294; 3 kategorije) u histološkim stadijima Corree kaskade

Histološki stadij	Ukupan broj uzoraka, N	negativno bojenje, n (%)	membransko bojenje, n (%)	citoplazmatsko/perijejzreno bojenje, n (%)
Uredna sluznica	20	5 (25,0)	15 (75,0)	0 (0,0)
Atrofija	14	7 (50,0)	7 (50,0)	0 (0,0)
Metaplazija	31	4 (12,9)	27 (87,1)	0 (0,0)
Atrofija i metaplazija	22	11 (50,0)	10 (45,5)	1 (4,5)
Displazija	21	16 (76,2)	0 (0,0)	5 (23,8)
Karcinom	40	17 (42,5)	0 (0,0)	23 (57,5)

Atrofični uzorci i skupina atrofije s metaplazijom pokazivali su mješoviti obrazac, s približno podjednakim udjelom negativnog i membranskog bojenja, pri čemu je citoplazmatsko/perijejzreni izražaj zabilježen samo sporadično. U displazijama je zabilježen izražen porast udjela negativnih uzoraka (76,2 %), uz potpuni izostanak membranskog izražaja i pojavu citoplazmatsko/perijejzrene lokalizacije u manjem broju slučajeva (23,8 %). U karcinomima je dominirao citoplazmatsko/perijejzreni obrazac (57,5 %), uz potpuni izostanak membranskog bojenja, dok je preostali dio uzoraka bio negativan.



Slika 13. Distribucija obrazaca bojenja COX-2 (klon CX-294; 3 kategorije) u stadijima Corree kaskade.

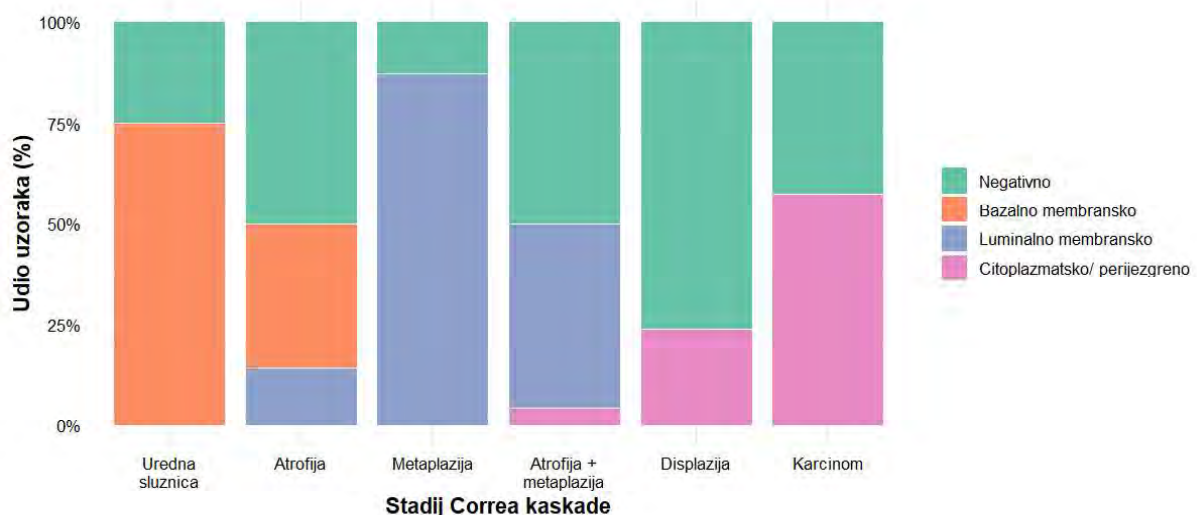
Post-hoc analiza standardiziranih reziduala potvrdila je da ukupnoj statističkoj razlici osobito pridonose povećani udio membranskog bojenja u urednoj sluznici i intestinalnoj metaplaziji te izražen porast citoplazmatsko/perijejzrene lokalizacije u karcinomima, uz istodobni manjak membranskog izražaja u displazijama i karcinomima (Holm-korekcija,  $p < 0,05$ ; vidi Dodatak, Tablica D1). Ukupno gledano, u

uznapredovalim stadijima bolesti uočava se progresivni gubitak membranske lokalizacije COX-2 uz porast citoplazmatsko/periježgrenog izražaja.

S obzirom na to da je trostupanjska klasifikacija bojenja klonom CX-294 (0 - negativno, 1 - membransko, 2 - citoplazmatsko/ periježgreno) u ovoj disertaciji poslužila je kao inicijalni analitički okvir. Detaljnijom re-evaluacijom imunohistokemijskih preparata uočena je razlika između bazalne i luminalne membranske lokalizacije, koja u prethodnoj trostupanjskoj klasifikaciji nije bila razdvojena. Budući da bi takva razlika mogla imati biološko i prognostičko značenje, provedena je dodatna analiza primjenom četverostupanjske klasifikacije bojenja.

#### 5.2.1.2 Četverostupanjska klasifikacija obrasca bojenja COX-2

Imunohistokemijska analiza obrasca izražaja COX-2, učinjena primjenom klona CX-294, provedena je u šest histoloških skupina duž Correa kaskade, jednako kao i u prethodno opisanoj trostupanjskoj analizi, pri čemu je bojenje razvrstano u četiri obrasca: 0 - negativno, 1b - bazalno membransko, 1c - luminalno membransko te 2 - citoplazmatsko/periježgreno. Distribucija četiriju kategorija bojenja značajno se razlikovala između histoloških skupina (Pearsonov  $\chi^2$  test s Monte Carlo simulacijom;  $\chi^2 = 204,3$ ;  $p < 0,001$ ), uz velik učinak povezanosti (Cramerov  $V = 0,678$ ) (Slika 14, Tablica 6). U ranim stadijima Correa kaskade dominirao je membranski izražaj COX-2, i to bazalni u urednoj sluznici, a luminalni u intestinalnoj metaplaziji, dok je u uznapredovalim stadijima uočava potpuni gubitak membranske lokalizacije uz dominaciju citoplazmatsko/periježgrenog izražaja ( $\chi^2 = 204,3$ ;  $p < 0,001$ ).



Slika 14. Distribucija obrazaca bojenja COX-2 (klon CX-294; 4 kategorije) u stadijima Correa kaskade.

U urednoj sluznici dominiralo je bazalno membransko bojenje, koje je prema post-hoc analizi standardiziranih reziduala bilo značajno češće nego u ostalim skupinama (Holm-korekcija,  $p < 0,05$ ). U atrofiji nije uočen dominantan obrazac bojenja, već podjednaka zastupljenost negativnog i

membranskog obrasca, uz izostanak citoplazmatsko/periježgrena lokalizacije. Intestinalna metaplazija pokazala je izraženu dominaciju luminalnog membranskog bojenja, koje je također bilo značajno prekomjerno zastupljeno ( $p < 0,05$ ), uz istodobno smanjen udio negativnih uzoraka. U skupini atrofije s metaplazijom zabilježena je mješovita raspodjela, s prevladavajućim luminalno membranskim obrascem i sporadičnom pojavom citoplazmatsko/periježgrena lokalizacije. Displastične lezije obilježene su značajnim porastom negativnih uzoraka ( $p < 0,05$ ) uz potpuni izostanak membranskog izražaja. U karcinomima je citoplazmatsko/periježgreno bojenje bilo značajno prekomjerno zastupljeno ( $p < 0,05$ ), uz istodobni značajan manjak luminalno membranskog obrasca (post-hoc analiza standardiziranih reziduala; vidi Dodatak, Tablica D2).

Tablica 6. Distribucija obrazaca bojenja COX-2 (klon CX-294; 4 kategorije) u histološkim stadijima Correa kaskade

Histološki stadij	Ukupan broj uzoraka, N	Negativno bojenje, n (%)	Bazalno membransko bojenje, n (%)	Luminalno membransko bojenje, n (%)	Citoplazmatsko / periježgreno bojenje, n (%)
Uredna sluznica	20	5 (25,0)	15 (75,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Atrofija	14	7 (50,0)	5 (35,7)	2 (14,3)	0 (0,0)
Metaplazija	31	4 (12,9)	0 (0,0)	27 (87,1)	0 (0,0)
Atrofija i metaplazija	22	11 (50,0)	0 (0,0)	10 (45,5)	1 (4,5)
Displazija	21	16 (76,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (23,8)
Karcinom	40	17 (42,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	23 (57,5)

Četverostupanjska analiza tako je omogućila razlučivanje bazalne i luminalne membranske lokalizacije COX-2. Dok je u ranim stadijima zabilježeno prevladavanje bazalnog membranskog izražaja u urednoj sluznici i luminalnog membranskog izražaja u intestinalnoj metaplaziji, u uznapredovalim stadijima prisutan je potpuni izostanak membranske lokalizacije, dok je citoplazmatsko/periježgrena lokalizacija zabilježena u dijelu displazija i dominirala u karcinomima.

## 5.2.2 Izražaj COX-2 detektiran protutijelom SP21

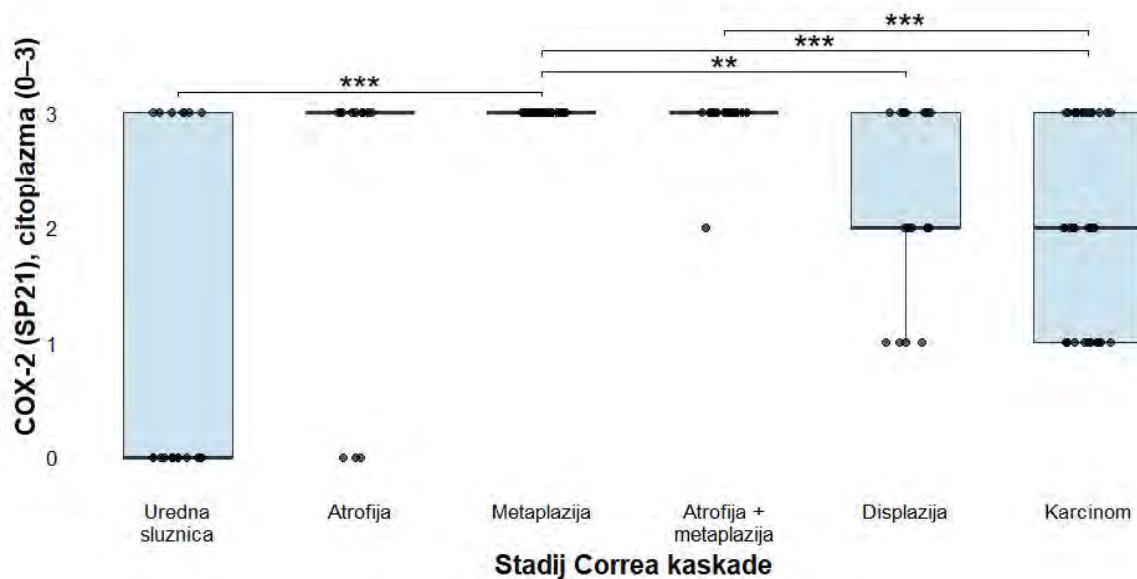
### 5.2.2.1 Citoplazmatski izražaj COX-2

Imunohistokemijski izražaj proteina COX-2 detektiran protutijelom SP21, također je analiziran u šest histoloških skupina duž Correa kaskade (uredna sluznica, atrofija, intestinalna metaplazija, atrofija s metaplazijom, displazija i karcinom). Citoplazmatski izražaj ocjenjen je semikvantitativno prema intenzitetu bojenja na skali od 0 do 3 (0 - vrlo slaba reakcija, 1 - slaba homogena reakcija, 2 - miješana slaba reakcija, 3 - srednje jaka do jaka reakcija). S obzirom na ordinalnu prirodu varijable, razlike između histoloških skupina analizirane su Kruskal-Wallisovim testom. Utvrđene su statistički značajne razlike u razini citoplazmatskog izražaja između histoloških skupina ( $\chi^2 = 53,6$ ;  $df = 5$ ;  $p < 0,001$ ), uz velik učinak ( $\epsilon^2 = 0,331$ ), što upućuje na snažnu povezanost razine izražaja COX-2 sa stadijem lezije. Deskriptivna raspodjela vrijednosti citoplazmatskog bojenja prikazana je u Tablici 7. U urednoj sluznici zabilježene su niske medijanske vrijednosti izražaja, uz širok raspon vrijednosti. U atrofiji, intestinalnoj metaplaziji i atrofiji s metaplazijom uočene su visoke vrijednosti izražaja (medijan = 3), uz uski interkvartilni raspon. U displazijama i karcinomima zabilježen je pad medijanskih vrijednosti u odnosu na metaplastične lezije, uz veći raspon vrijednosti, osobito u karcinomima.

Tablica 7. Raspodjela citoplazmatskog izražaja COX-2 (SP21) u histološkim stadijima Correa kaskade

Histološka skupina	Broj uzoraka, n	Medijan (IQR)
Uredna sluznica	20	0,0 (0,0-3,0)
Atrofija	14	3,0 (3,0-3,0)
Metaplazija	31	3,0 (3,0-3,0)
Atrofija s metaplazijom	22	3,0 (3,0-3,0)
Displazija	21	2,0 (2,0-3,0)
Karcinom	40	2,0 (1,0-3,0)

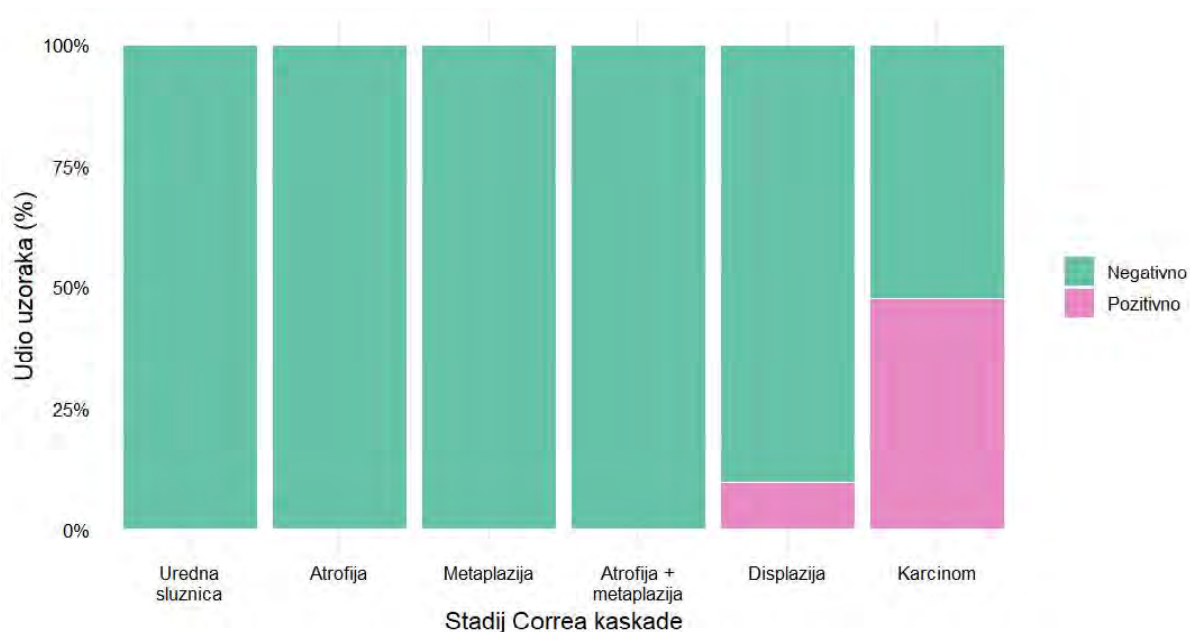
Post-hoc Dunnova analiza uz Benjamini-Hochberg korekciju za višestruka testiranja pokazala je da se uredna sluznica statistički značajno razlikuje od atrofije ( $p < 0,01$ ), intestinalne metaplazije ( $p < 0,001$ ), atrofije s metaplazijom ( $p < 0,001$ ) te displazije ( $p < 0,05$ ), dok razlika između uredne sluznice i karcinoma nije bila statistički značajna. Intestinalna metaplazija pokazala je značajno više vrijednosti citoplazmatskog izražaja u usporedbi s displazijom ( $p < 0,01$ ) i karcinomom ( $p < 0,001$ ). Također, atrofija s metaplazijom imala je više vrijednosti u odnosu na displaziju ( $p < 0,05$ ) i karcinom ( $p < 0,001$ ). Razlike između displazije i karcinoma nisu dosegle statističku značajnost (Slika 15; vidi Dodatak, Tablica D3).



Slika 15. Citoplazmatski izražaj COX-2 (SP21) u histološkim stadijima Correa kaskade. Prikazane su samo statistički značajne razlike između odabranih skupina (Dunnov test uz Benjamini-Hochberg korekciju; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 5.2.2.2 Jezgrena izražaj COX-2

Uz citoplazmatski izražaj, analizirana je i jezgrena (nuklearna) lokalizacija COX-2 bojenja protutjelom SP21. Pozitivnost je bilježena binarno (0 - negativno, 1 - pozitivno). Distribucija jezgrene pozitivnosti prema histološkim skupinama prikazana je na Slici 16. Jezgrena pozitivnost SP21 bila je rijetka ili potpuno odsutna u urednoj sluznici i neinvazivnim lezijama želučane sluznice. Nije zabilježena u urednoj sluznici, atrofiji, intestinalnoj metaplaziji niti u kombiniranim lezijama atrofije s metaplazijom. U displazijama je jezgreno bojenje zabilježeno u malom udjelu uzoraka (2/21; 9,5 %), dok je u karcinomima bilo prisutno u gotovo polovici analiziranih slučajeva (19/40; 47,5 %). Ukupna usporedba histoloških skupina provedena Fisherovim egzaktnim testom pokazala je statistički značajne razlike u učestalosti jezgrene pozitivnosti ( $p < 0,001$ ). Post-hoc parne usporedbe uz Holmovu korekciju p-vrijednosti pokazale su da karcinomi imaju statistički značajno višu učestalost jezgrenog bojenja u odnosu na metaplaziju, atrofijsku metaplaziju i urednu sluznicu ( $p < 0,001$ ), kao i u odnosu na atrofiju ( $p < 0,01$ ) te displaziju ( $p < 0,05$ ), dok među neinvazivnim lezijama nisu zabilježene statistički značajne razlike (Tablica D4).

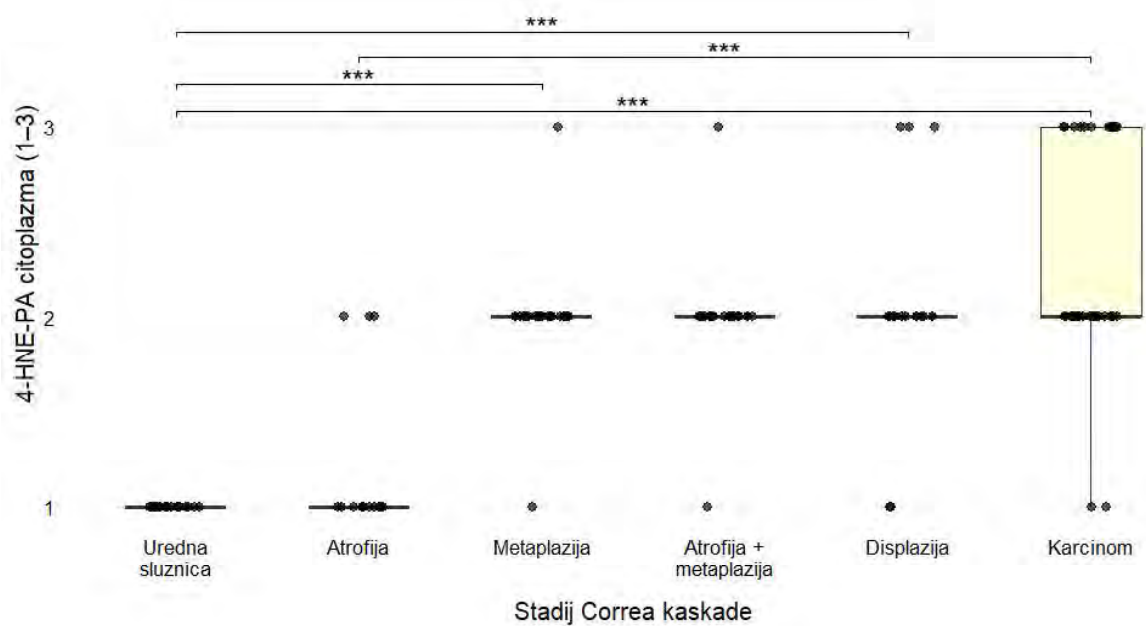


Slika 16. Učestalost jezgrene lokalizacije COX-2 pri bojenju protutijelom SP21 duž histoloških stadija Correa kaskade. Karcinomi pokazuju statistički značajno višu učestalost jezgrenog bojenja u odnosu na sve ostale skupine ( $p < 0,05$ ), dok među neinvazivnim lezijama nisu utvrđene statistički značajne razlike.

### 5.2.3 4-HNE-PA detektirani klonom HNEJ-2

#### 5.2.3.1 Citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA

Intenzitet citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA analiziran je u šest histoloških skupina duž Corraove kaskade te je semikvantitativno ocijenjen u tri razine: (1) vrlo slabo, pretežno bazalno bojenje, (2) slabo homogeno citoplazmatsko bojenje i (3) izraženije homogeno citoplazmatsko bojenje. U rijetkim pojedinačnim slučajevima zabilježeno je izraženije nakupljanje unutar izoliranih tumorskih stanica, i to isključivo u tkivu karcinoma. Zbog vrlo niske učestalosti (3/147 uzoraka), takvi obrasci nisu izdvajani kao zasebna kategorija u analizi. Ukupna usporedba intenziteta citoplazmatskog bojenja među histološkim skupinama, provedena Kruskal-Wallisovim testom, pokazala je statistički značajne razlike ( $\chi^2 = 86,3$ ;  $df = 5$ ;  $p < 0,001$ ), uz velik učinak razlika među skupinama ( $\epsilon^2 = 0,553$ ) (Slika 17). Dobiveni rezultati upućuju na izraženu heterogenost intenziteta citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA duž progresije Corraove kaskade. Uredna sluznica i atrofija pokazale su statistički značajno niži intenzitet bojenja u odnosu na intestinalnu metaplaziju, kombinirane lezije atrofije i metaplazije, displaziju i karcinom (sve  $p < 0,001$ ), dok razlika između uredne sluznice i atrofije nije bila statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Radi preglednosti na Slici 17 su prikazane samo najrelevantnije statistički značajne parne usporedbe, dok su potpuni rezultati post-hoc Dunnove analize prikazani u Dodatku (Tablica D5).



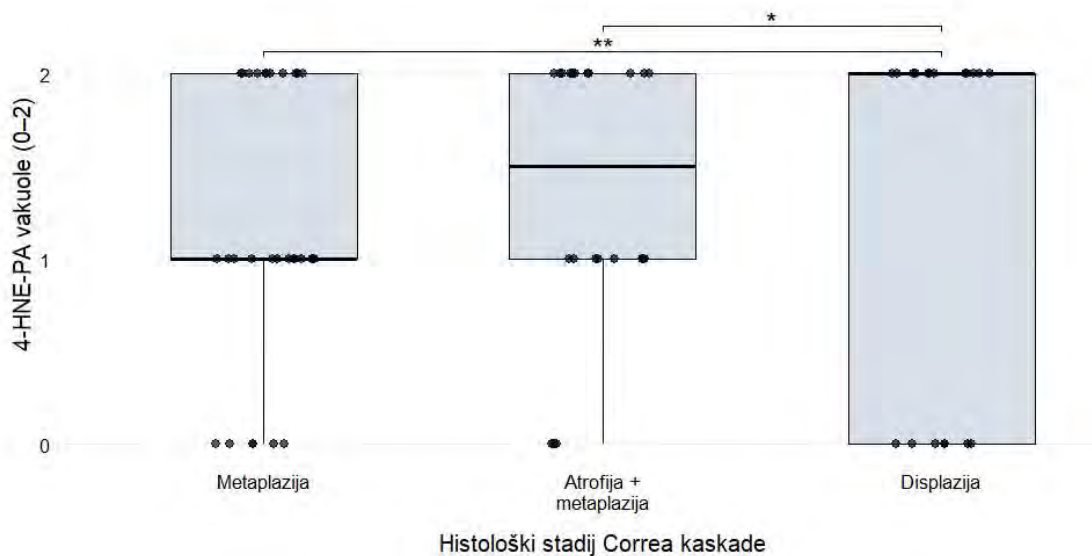
Slika 17. Raspodjela intenziteta citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA detektiranih klonom HNEJ-2 u histološkim skupinama duž Correa kaskade. Prikazane su statistički značajne razlike u odnosu na urednu sluznicu te u odnosu na atrofiju (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Post-hoc Dunnove usporedbe uz kontrolu lažne stope otkrića (FDR) primjenom Benjamini-Hochbergove korekcije pokazale su da se uredna sluznica statistički značajno razlikuje od intestinalne metaplazije, kombiniranih lezija atrofije i metaplazije, displazije i karcinoma (sve  $p < 0,001$ ), dok razlika između uredne sluznice i atrofije nije bila statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Atrofija je također pokazala statistički značajno niži intenzitet citoplazmatskog bojenja u odnosu na sve uznapredovale lezije (intestinalna metaplazija, atrofija i metaplazija, displazija i karcinom) (sve  $p < 0,001$ ). Nasuprot tome, razlike među uznapredovalim lezijama nisu bile statistički značajne (sve  $p > 0,05$ ) (Dodatak, Tablica D5).

### 5.2.3.2 Nakupljanje 4-HNE-PA u vakuolama vrčastih stanica

Dodatna analiza nakupljanja 4-HNE-PA u vakuolama vrčastih stanica provedena je u lezijama s intestinalnom metaplazijom, uključujući intestinalnu metaplaziju, kombinirane lezije atrofije i metaplazije te displaziju, s obzirom na to da su vrčaste stanice prisutne isključivo u tim lezijama. Nakupljanje je semikvantitativno ocijenjeno u tri kategorije: 0 - odsutno, 1 - slabo i 2 - jako. Globalni Fisherov egzaktni test uz Monte Carlo simulaciju pokazao je statistički značajnu razliku u raspodjeli kategorija nakupljanja 4-HNE-PA među analiziranim skupinama ( $p = 0,002$ ). Post-hoc parne usporedbe uz Holmovu korekciju pokazale su da je u stadiju displazije jako nakupljanje 4-HNE-PA u vakuolama vrčastih stanica bilo statistički značajno češće u odnosu na intestinalnu metaplaziju ( $p < 0,01$ ) i

kombinirane lezije atrofije i metaplazije ( $p < 0,05$ ), dok razlika između intestinalne metaplazije i kombiniranih lezija nije bila statistički značajna ( $p > 0,05$ ) (Slika 18).



Slika 18. Raspodjela nakupljanja 4-HNE-PA u vakuolama vrčastih stanica u lezijama s intestinalnom metaplazijom. Prikazane su statistički značajne razlike između skupina (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Suprotno tome, Kruskal-Wallisov test nije pokazao statistički značajnu razliku u rangovima intenziteta nakupljanja među skupinama ( $\chi^2 = 1,59$ ;  $p = 0,45$ ), što upućuje na izostanak razlika u središnjoj tendenciji intenziteta. Ovaj nalaz, u kombinaciji sa značajnim rezultatima Fisherova egzaktnog testa, sugerira da se razlike među skupinama prvenstveno očituju u raspodjeli kategorija nakupljanja, a ne u kontinuiranom porastu intenziteta.

### 5.3 Analiza biomarkera unutar pojedinih skupina Correea kaskade

#### 5.3.1 Atrofija

Atrofične promjene želučane sluznice utvrđene su u 36 od ukupno 148 uzoraka (24,3%). U analizu su uključeni uzorci s izoliranom atrofijom ( $n = 14$ ) te atrofijom udruženom s intestinalnom metaplazijom ( $n = 22$ ). Raspodjela prema stupnju atrofije prikazana je u Tablici 8. Najčešće je bio zastupljen stupanj 2 (50%), slijedi stupanj 1 (38,9%), dok je stupanj 3 bio rjeđi (11,1%). Povezanost biomarkera sa stupnjem atrofije analizirana je neparametrijskim metodama zbog ordinalne prirode varijabli i malog broja uzoraka u pojedinim skupinama. Citoplazmatski izražaj COX-2 procijenjen klonom SP21 nije pokazao značajnu povezanost s stupnjem atrofije (Spearman  $\rho = 0,26$ ;  $p = 0,13$ ).

Tablica 8. Raspodjela uzoraka prema stupnju atrofije

Stupanj atrofije	n	%
1	14	38,9
2	18	50,0
3	4	11,1

Slično tome, citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA pokazalo je blagu tendenciju porasta s višim stupnjem atrofije ( $p = 0,28$ ), no bez statističke značajnosti ( $p = 0,1$ ). Nadalje, Fisherov egzaktni test nije pokazao statistički značajnu povezanost između obrazaca lokalizacije COX-2 procijenjenih klonom CX-294 i stupnja atrofije ( $p = 0,68$ ). Dodatna analiza Kruskal-Wallisovim testom nije pokazala statistički značajne razlike u intenzitetu citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA među stupnjevima atrofije ( $p = 0,11$ ), niti u izražaju COX-2 (SP21) ( $p = 0,30$ ).

### 5.3.2 Intestinalna metaplazija

Intestinalna metaplazija utvrđena je u 53 od ukupno 148 uzoraka (35,8%). Prema histološkom tipu, kompletna intestinalna metaplazija bila je zastupljenija te je zabilježena u 39 slučajeva (73,6%), dok je inkompletna metaplazija utvrđena u 14 slučajeva (26,4%). Kompletna metaplazija dominirala je i u izoliranim metaplastičnim lezijama i u metaplaziji udruženoj s atrofijom. Raspodjela prema tipu metaplazije prikazana je u Tablici 9.

Tablica 9. Raspodjela uzoraka prema tipu intestinalne metaplazije

Tip metaplazije	n	%
Kompletna	39	73,6
Inkompletna	14	26,4

Prema stupnju proširenosti, intestinalna metaplazija pokazivala je relativno uravnoteženu raspodjelu gradusa. Stupanj 1 zabilježen je u 39,6% slučajeva, stupanj 2 u 32,1%, a stupanj 3 u 28,3% slučajeva (Tablica 10).

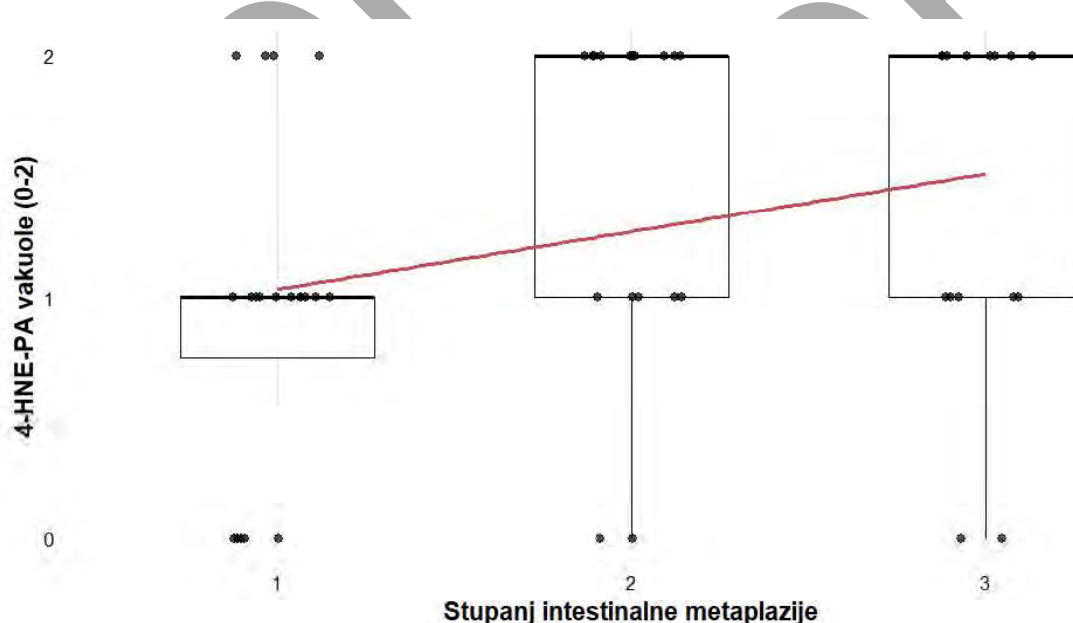
Tablica 10. Raspodjela uzoraka prema stupnju intestinalne metaplazije

Stupanj metaplazije	n	%
1	21	39,6
2	17	32,1
3	15	28,3

Usporedbom izražaja biomarkera između kompletne i inkompletne intestinalne metaplazije nisu utvrđene statistički značajne razlike. Citoplazmatski izražaj COX-2 procijenjen klonom SP21 pokazao je visoke i ujednačene vrijednosti u obje skupine (medijan 3 u obje skupine;  $p = 0,58$ ). Analiza lokalizacije COX-2 prema klonu CX-294 također nije pokazala razliku u raspodjeli negativnog, membranskog i citoplazmatskog izražaja između tipova metaplazije ( $p = 0,64$ ). Citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA nije se razlikovalo između kompletne i inkompletne metaplazije (medijan 2 u obje skupine;  $p = 0,27$ ), kao ni prisutnost 4-HNE-PA pozitivnih nakupina ( $p = 0,76$ ).

Dodatna analiza prema stupnju intestinalne metaplazije nije pokazala statistički značajne razlike u citoplazmatskom izražaju COX-2 procijenjenom klonom SP21 (Kruskal-Wallisov test,  $p = 0,47$ ), što je potvrđeno i analizom korelacije (Spearman  $\rho = 0,15$ ;  $p = 0,27$ ). Također, nije utvrđena statistički značajna povezanost između stupnja metaplazije i obrasca izražaja COX-2 prema klonu CX-294 ( $\rho = 0,10$ ;  $p = 0,49$ ), niti između stupnja metaplazije i citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA (Kruskal-Wallisov test,  $p = 0,48$ ; Spearman  $\rho = 0,17$ ;  $p = 0,23$ ).

Nasuprot tome, prisutnost 4-HNE-PA pozitivnih nakupina u vakuolama vrčastih stanica pokazala je slab, ali statistički značajan pozitivan trend s porastom stupnja metaplazije (Spearman  $\rho = 0,29$ ;  $p = 0,04$ ) (Slika 19), dok je globalna usporedba između stupnjeva bila granično statistički značajna (Kruskal-Wallisov test,  $p = 0,051$ ).

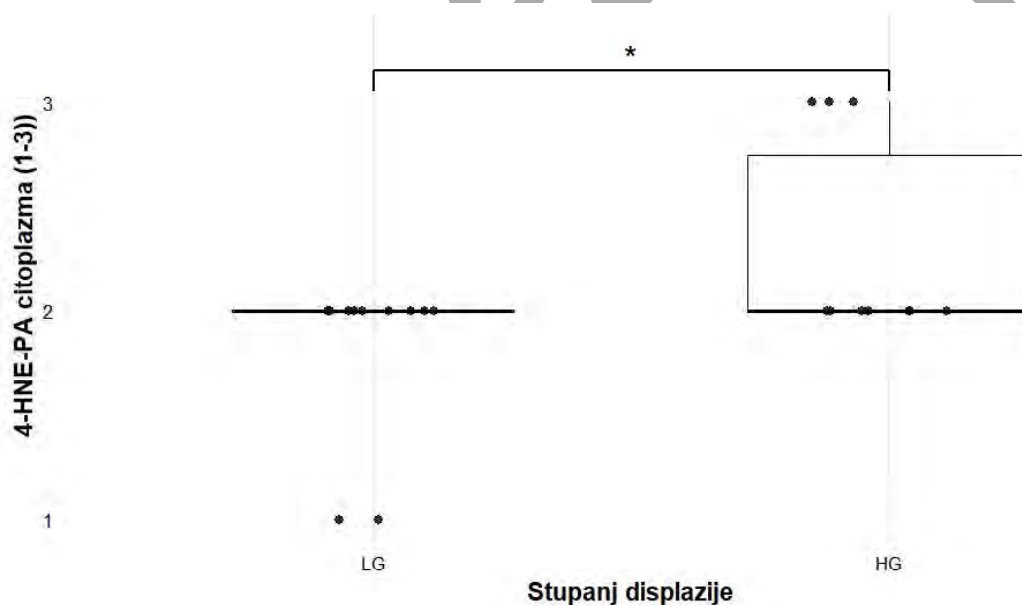


Slika 19. Povezanost stupnja intestinalne metaplazije i nakupljanja 4-HNE-PA u vakuolama vrčastih stanica. Crvena linija prikazuje procijenjeni linearni trend, koji upućuje na pozitivnu povezanost između nakupljanja 4-HNE-PA s povećanjem stupnja intestinalne metaplazije (Spearman  $\rho = 0,29$ ;  $p = 0,04$ ).

### 5.3.3 Displazija

U analizu je uključeno ukupno 21 uzorak displazije, od čega je 11 (52,4%) klasificirano kao displazija niskog stupnja (engl. *low grade*, LG), a 10 (47,6%) kao displazija visokog stupnja (engl. *high grade*, HG). Usporedbom biomarkera između displazije niskog i visokog stupnja nisu utvrđene statistički značajne razlike u distribuciji COX-2 procijenjenoj klonom CX-294 (Fisherov egzaktni test,  $p = 0,635$ ). Citoplazmatski izražaj COX-2 procijenjen klonom SP21 pokazao je trend nižih vrijednosti u HG displazijama u usporedbi s LG displazijama (medijan: LG 3 (2-3) vs. HG 2 (1,25-2,75)), no razlika nije dosegla statističku značajnost (Wilcoxonov test,  $p = 0,117$ ). Za razliku od COX-2, citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA bilo je statistički značajno viša u displazijama visokog stupnja u usporedbi s displazijama niskog stupnja (Wilcoxonov test,  $p = 0,03$ ). Iako je medijan citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA iznosio 2 u oba stupnja displazija, utvrđen je nešto viši i širi interkvartilni raspon u skupini displazija visokog stupnja (Slika 20).

Nadalje, 4-HNE-PA pozitivne nakupine bile su prisutne u 54,5% uzoraka s niskim i 80,0% uzoraka s visokim stupnjem displazije, no ta razlika nije bila statistički značajna (Fisherov egzaktni test,  $p = 0,36$ ).



Slika 20. Citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA u displazijama niskog (LG) i visokog stupnja (HG). Prikazane su statistički značajne razlike između skupina (\*  $p < 0,05$ ).

Dodatno, kako bi se procijenila neovisna povezanost analiziranih biomarkera sa stupnjem displazije, provedena je penalizirana logistička regresija prema Firthu zbog relativno malog broja uzoraka. U multivarijantnom modelu viši intenzitet citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA pokazao je povezanost s displazijom višeg stupnja koja nije dosegla statističku značajnost, ali je bila blizu razine značajnosti (OR = 18,03; 95% CI: 0,64-510,25;  $p = 0,090$ ), dok COX-2, neovisno o korištenom klonu, nije pokazao

neovisnu povezanost sa stupnjem displazije (Tablica 11). Dobiveni rezultati upućuju na moguću neovisnu povezanost 4-HNE-PA s višim stupnjem displazije, no široki interval pouzdanosti ukazuje na ograničenu preciznost procjene.

Tablica 11. Penalizirana logistička regresija prema Firthu za predikciju displazije visokog stupnja (HG vs LG displazija)

Varijabla	OR (95% CI)	p
COX-2 (CX-294)	0,90 (0,07-11,60)	0,93
SP21 (citoplazmatski)	0,30 (0,06-1,46)	0,14
4-HNE-PA (citoplazmatski)	18,03 (0,64-510,25)	0,09

## 5.4 Karcinom želuca

### 5.4.1 Deskriptivna analiza skupine karcinoma

U analizu je uključeno ukupno 40 karcinoma želuca. Medijan dobi bolesnika iznosio je 73,5 godina (IQR 65,8-79,2). U uzorku je zabilježena izražena predominacija muškaraca (31/40; 77,5%) u odnosu na žene (9/40; 22,5%). Podatak o patološkom T-stadiju (pT) bio je dostupan u 19 od 40 slučajeva (47,5%). Među tim uzorcima dominirali su uznapredovali stadiji (pT3-pT4), prisutni u 15 od 19 slučajeva (78,9%), dok su rani stadiji (pT1b-pT2) bili rjeđi (4/19; 21,1%). Podatak o metastatskom statusu bio je dostupan u 37 od 40 slučajeva (92,5%), pri čemu su metastaze zabilježene u 26 slučajeva (70,3%), dok je 11 uzoraka (29,7%) bilo bez metastaza.

Prema stupnju diferencijacije, dobro diferencirani tumori činili su 16 od 40 slučajeva (40%), umjereno diferencirani 18 slučajeva (45%), a slabo diferencirani 6 slučajeva (15%). Za potrebe analitičkog dijela diferencijacija je dodatno pojednostavljena na dobro diferencirane tumore nasuprot skupini umjereno i slabo diferenciranih (16/40; 40% naspram 24/40; 60%). Izražaj COX-2 procijenjen klonom CX-294 bio je raspodijeljen između kategorija 0 (17/40; 42,5%) i 2 (23/40; 57,5%). Jezgreni pozitivitet COX-2 detektiran klonom SP21 zabilježen je u 19 od 40 slučajeva (47,5%), dok je u 21 slučaju (52,5%) bio negativan. Nadalje, medijan citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA iznosio je 2 (IQR 2-3), dok je medijan citoplazmatskog izražaja COX-2 (klon SP21) također iznosio 2, ali s nešto širim rasponom (IQR 1-3). Distribucija kliničko-patoloških karakteristika i biomarkera prikazana je u Tablici 12.

Tablica 12. Kliničko-patološke karakteristike i biomarkeri u karcinomima želuca (n = 40)

Varijabla	Vrijednost
<b>Demografski podaci</b>	
Dob, medijan (IQR)	73,5 (65,8-79,2)
Muškarci	31/40 (77,5%)
Žene	9/40 (22,5%)
<b>Tumorske karakteristike</b>	
<u>pT stadij*</u>	19/40 (47,5%)
└ pT1b-2	4/19 (21,1%)
└ pT3-4	15/19 (78,9%)
<u>Metastaze*</u>	37/40 (92,5%)
└ prisutne	26/37 (70,3%)
└ nisu prisutne	11/37 (29,7%)
<b>Diferencijacija tumora</b>	
Dobro diferencirani	16/40 (40,0%)
Umjereno diferencirani	18/40 (45,0%)
Slabo diferencirani	6/40 (15,0%)
<b>Biomarkeri</b>	
COX-2 (CX-294) negativan	17/40 (42,5%)
COX-2 (CX-294) citoplazmatski/perijezgrena	23/40 (57,5%)
COX-2 (SP21) jezgrena pozitivan	19/40 (47,5%)
COX-2 (SP21) jezgrena negativan	21/40 (52,5%)
4-HNE-PA (citopl.), medijan (IQR)	2 (2-3)
COX-2 (SP21, citopl.), medijan (IQR)	2 (1-3)

\*Podatak o pT stadiju nedostajao je u 21 slučaju (52,5%), dok podatak o metastatskom statusu nije bio dostupan u 3 slučaja (7,5%).

#### 5.4.2 Povezanost biomarkera s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma

Analiza biomarkera u odnosu na kliničko-patološke karakteristike karcinoma nije pokazala statistički značajne razlike (Tablica 13). U usporedbi ranih (pT1b-pT2) i uznapredovalih karcinoma (pT3-pT4) nije utvrđena značajna razlika u distribuciji izražaja COX-2 analiziranog klonom CX-294 (Fisherov egzaktni test,  $p = 1$ ). Također, citoplazmatski izražaj COX-2 (klon SP21) ( $p = 0,39$ ), kao ni jezgrena pozitivitet COX-2 (klon SP21) ( $p = 0,25$ ), nisu se značajno razlikovali između pT skupina, a jednako tako nije utvrđena razlika ni u citoplazmatskom nakupljanju 4-HNE-PA (Wilcoxonov test,  $p = 0,76$ ). Usporedba metastatskih i lokaliziranih karcinoma također nije pokazala statistički značajne razlike u izražaju ispitivanih biomarkera, uključujući COX-2 (CX-294) ( $p = 0,73$ ), jezgrena pozitivitet COX-2 (klon SP21) ( $p = 1$ ), citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA ( $p = 0,43$ ) i citoplazmatski izražaj COX-2 (klon SP21) ( $p = 0,25$ ). Slično tome, analiza prema stupnju diferencijacije tumora nije pokazala značajne razlike u izražaju

biomarkera, pri čemu niti jedan biomarker nije bio povezan s binarno kategoriziranom diferencijacijom tumora (dobro naspram umjereno i slabo; svi  $p > 0,05$ ).

Tablica 13. Povezanost izražaja biomarkera s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma želuca

Biomarker	pT (rani vs. uznapredovali)	Metastaze (ne vs. da)	Diferencijacija (dobro vs. umjereno i slabo)
COX-2 (CX-294)	1	0,73	1
COX-2 (SP21, jezgreni)	0,25	1	0,35
COX-2 (SP21, citoplazmatski)	0,39	0,25	0,59
4-HNE-PA (citoplazmatski)	0,76	0,43	0,69

*p*-vrijednosti dobivene Fisherovim egzaktnim testom za kategorijske varijable (CX-294, SP21 jezgreni) te Wilcoxonovim testom za ordinalne varijable (4-HNE-PA citoplazmatski i SP21 citoplazmatski).

#### 5.4.3 Međusobna povezanost biomarkera u karcinomu

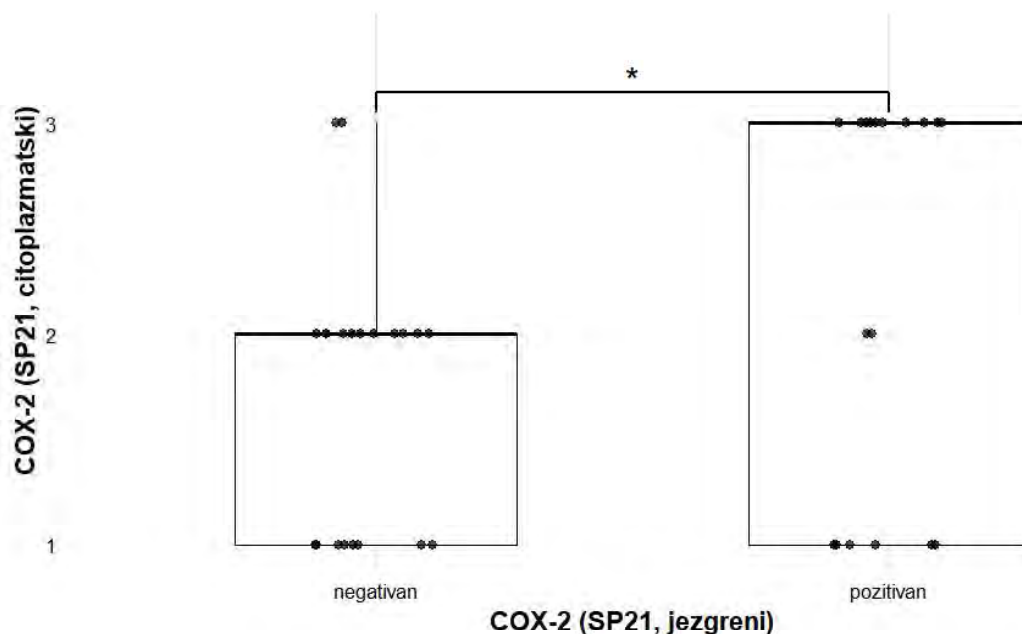
Analiza međusobnih odnosa biomarkera provedena je s ciljem ispitivanja potencijalne biološke povezanosti između markera oksidacijskog stresa i COX-2 signalizacije u karcinomima, neovisno o kliničko-patološkim karakteristikama tumora, a rezultati su prikazani u Tablici 14.

Tablica 14. Povezanost između biomarkera u karcinomima

Biomarker 1	Biomarker 2	Test	p
4-HNE-PA (citoplazmatski)	COX-2 (SP21, citoplazmatski)	Spearman	0,637
COX-2 (SP21, jezgreni)	COX-2 (SP21, citoplazmatski)	Wilcoxon	0,041*
COX-2 (SP21, jezgreni)	4-HNE-PA (citoplazmatski)	Wilcoxon	0,774
COX-2 (CX-294)	COX-2 (SP21, citoplazmatski)	Wilcoxon	0,331
COX-2 (CX-294)	4-HNE-PA (citoplazmatski)	Wilcoxon	0,412
COX-2 (SP21, jezgreni)	COX-2 (CX-294)	Fisher	0,538

(\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Između ordinalnih biomarkera, citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA i citoplazmatskog izražaja COX-2 procijenjenog klonom SP21, nije utvrđena statistički značajna korelacija (Spearmanov  $p = 0,077$ ;  $p = 0,637$ ). Nasuprot tome, analiza odnosa jezgrenog pozitiviteta COX-2 procijenjenog klonom SP21 i njegovoga citoplazmatskog izražaja pokazala je statistički značajnu razliku (Slika 21). Tumori s jezgrenim pozitivitetom COX-2 (SP21) imali su viši citoplazmatski izražaj u usporedbi s jezgreno negativnim tumorima (medijan 3 naspram 2; Wilcoxonov test,  $p = 0,041$ ). Ovaj nalaz upućuje na moguću povezanost subcelularne lokalizacije COX-2 i razine njegovog citoplazmatskog izražaja.



Slika 21. Odnos jezgrenog pozitiviteta COX-2 i citoplazmatskog izražaja COX-2 pri bojenju protutijelom SP21 u karcinomima želuca. Prikazane su statistički značajne razlike između skupina u odnosu na prisutnost COX-2 u jezgri (Wilcoxonov test, \* $p < 0,05$ ).

S druge strane, jezgreni pozitivitet COX-2 (SP21) nije bio povezan s citoplazmatskim nakupljanjem 4-HNE-PA (Wilcoxonov test,  $p = 0,774$ ). Također, izražaj COX-2 procijenjen klonom CX-294 nije pokazao značajnu povezanost niti s citoplazmatskim izražajem COX-2 (SP21) ( $p = 0,331$ ) niti s nakupljanjem 4-HNE-PA ( $p = 0,412$ ). Konačno, nije utvrđena značajna povezanost između jezgrenog pozitiviteta COX-2 (SP21) i izražaja COX-2 procijenjenog klonom CX-294 (Fisherov egzaktni test,  $p = 0,538$ ).

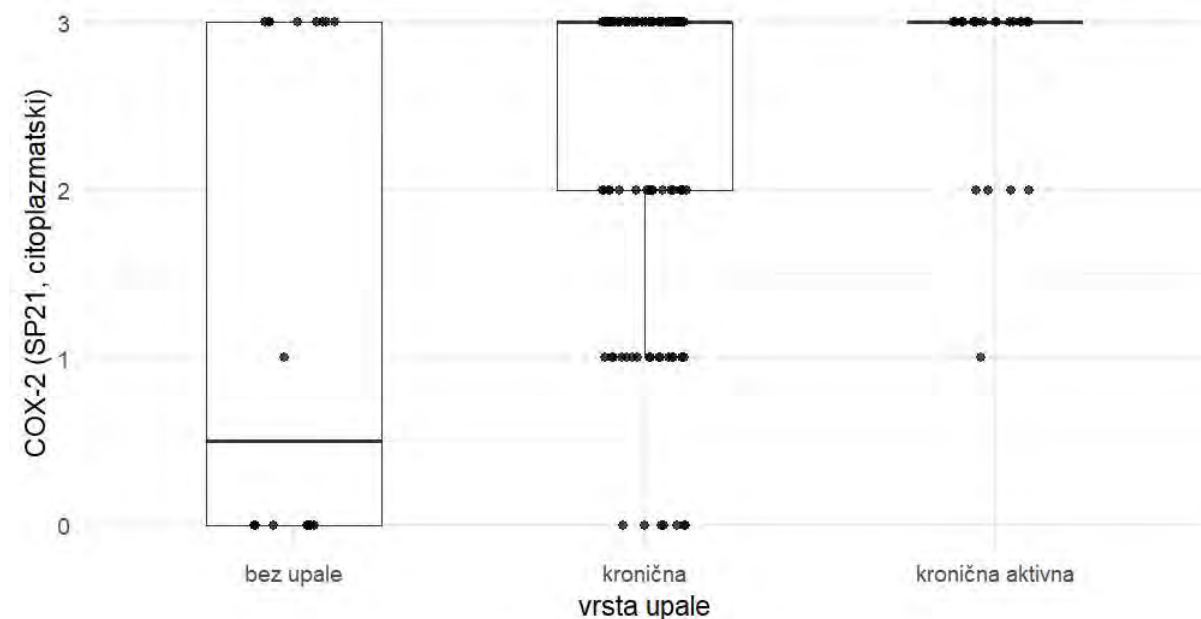
## 5.5 Eksplorativna analiza povezanosti biomarkera s kliničko-patološkim parametrima

### 5.5.1 COX-2 detektiran klonom CX-294

U eksplorativnoj analizi povezanosti izražaja COX-2 procijenjenog klonom CX-294 s kliničko-patološkim parametrima nisu utvrđene statistički značajne povezanosti. Spearmanove korelacije s kontinuiranim varijablama bile su niskog intenziteta i bez konzistentnog obrasca, uključujući dob bolesnika ( $\rho = 0,115$ ;  $p = 0,16$ ;  $n = 148$ ), aktivnost upale ( $\rho = -0,075$ ;  $p = 0,37$ ;  $n = 148$ ), vrijednosti CRP-a ( $\rho = 0,070$ ;  $p = 0,47$ ;  $n = 110$ ) te N/L omjer ( $\rho = -0,046$ ;  $p = 0,61$ ;  $n = 123$ ). Slično tome, nije utvrđena značajna povezanost s parametrima metabolizma željeza, odnosno koncentracijom serumskog željeza (serumsko Fe:  $\rho = -0,066$ ;  $p = 0,67$ ;  $n = 45$ ). Analiza kategorijskih varijabli također nije pokazala statistički značajne razlike u distribuciji izražaja COX-2 između skupina definiranih pušenjem ( $p = 0,58$ ), primjenom NSAID ( $p = 0,66$ ) te statusom infekcije bakterijom *H. pylori* ( $p = 0,45$ ).

### 5.5.2 Citoplazmatski izražaj COX-2 detektirana klonom SP21

Citoplazmatski izražaj COX-2 procijenjen klonom SP21 pokazao je selektivnu povezanost s lokalnim upalnim statusom želučane sluznice. Spearmanova korelacija između izražaja COX-2 i aktivnosti upale bila je statistički značajna ( $\rho = 0,267$ ;  $p = 0,01$ ;  $n = 148$ ), što upućuje na slabu do umjerenu pozitivnu povezanost između intenziteta upalne aktivnosti i citoplazmatske akumulacije ovog biomarkera (Slika 22).

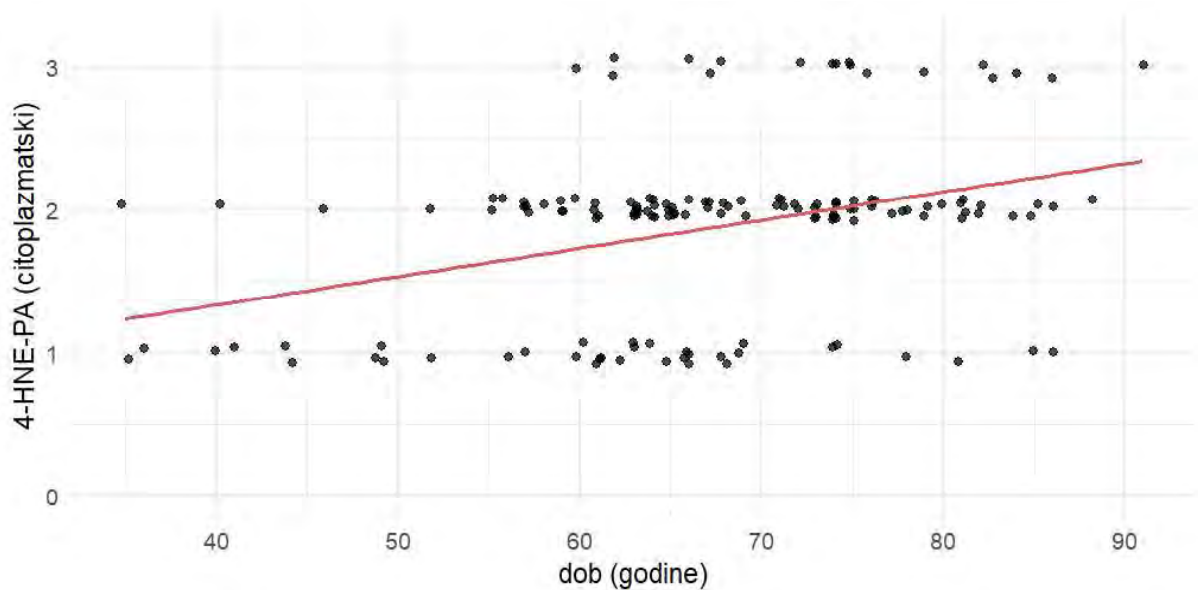


Slika 22. Citoplazmatski izražaj COX-2 (SP21) prema kategorijama upale u želučanoj sluznici. Uočena je statistički značajna pozitivna korelacija između aktivnosti upale i citoplazmatskog izražaja COX-2 (SP21) (Spearman  $\rho = 0,267$ ;  $p = 0,01$ ).

Za ostale analizirane varijable nisu utvrđene statistički značajne povezanosti nakon korekcije za višestruka testiranja. Korelacije su bile niske i neznačajne za dob ( $\rho = 0,08$ ;  $p = 0,34$ ;  $n = 148$ ), CRP ( $\rho = -0,06$ ;  $p = 0,56$ ;  $n = 110$ ), N/L omjer ( $\rho = 0,08$ ;  $p = 0,40$ ;  $n = 123$ ) i serumsko željezo ( $\rho = -0,21$ ;  $p = 0,17$ ;  $n = 45$ ). Također, nisu zabilježene značajne razlike u izražaju COX-2 s obzirom na pušenje ( $p = 0,80$ ), primjenu NSAID ( $p = 0,86$ ) ni status infekcije bakterijom *H. pylori* ( $p = 0,06$ ), uz naznaku mogućeg trenda povezanosti.

### 5.5.3 4-HNE-PA

Citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA pokazalo je najizraženije i najkonzistentnije povezanosti s analiziranim kliničko-patološkim parametrima. Utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija s dobi bolesnika ( $\rho = 0,35$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 148$ ) (Slika 23) te s N/L omjerom ( $\rho = 0,27$ ;  $p = 0,02$ ;  $n = 123$ ).



Slika 23. Povezanost citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA i dobi bolesnika. Raspršenje vrijednosti citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA prikazano je u odnosu na dob bolesnika, pri čemu svaka točka predstavlja pojedinačni uzorak. Crvena linija označava linearni trend.

Također je utvrđena statistički granična pozitivna povezanost s histološkom aktivnošću upale ( $p = 0,21$ ;  $p = 0,05$ ;  $n = 148$ ). Suprotno tome, koncentracija serumskog željeza pokazala je statistički značajnu negativnu korelaciju s intenzitetom citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA ( $\rho = -0,40$ ;  $p = 0,04$ ;  $n = 45$ ) (Tablica 15). Za ostale varijable nisu utvrđene statistički značajne povezanosti nakon korekcije za višestruka testiranja, uključujući vrijednosti CRP-a ( $p = 0,05$ ;  $p = 0,59$ ;  $n = 110$ ), pušenje ( $p = 0,51$ ), primjenu NSAID ( $p = 0,71$ ) te status infekcije bakterijom *H. pylori* ( $p = 0,36$ ).

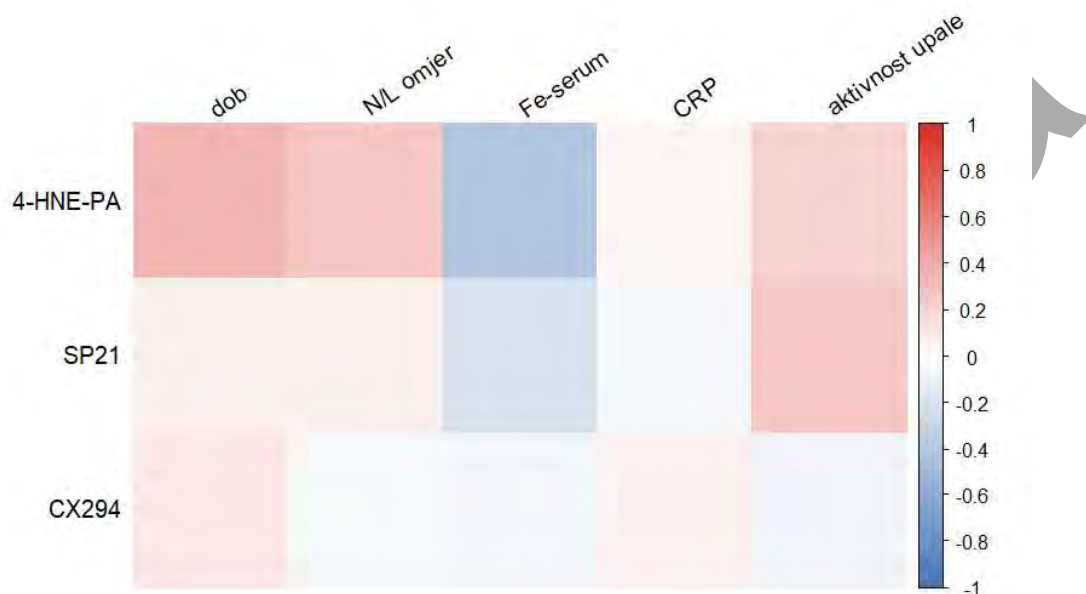
Tablica 15. Povezanost citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA s kliničko-patološkim parametrima

Varijabla	$\rho^*$	p	n
serumsko Fe	-0,40	0,04*	45
Dob	0,35	<0,001***	148
N/L omjer	0,27	0,02*	123
Aktivnost upale	0,21	0,05*	148
CRP	0,05	0,59	110

\*Korelacije su procijenjene Spearmanovim koeficijentom rang-korelacije. p-vrijednosti prikazane su nakon korekcije za višestruka testiranja metodom Benjamini-Hochberg. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Za cjelovit prikaz međusobnih odnosa između analiziranih biomarkera i kliničko-patološkim parametara izrađena je korelacijska matrica temeljena na Spearmanovim koeficijentima (Slika 24). U korelacijsku matricu uključene su kontinuirane i ordinalne varijable, dok kategorijske varijable (spol i status *H. pylori* infekcije), zbog metodoloških ograničenja i izostanka značajnih povezanosti, nisu uključene u ovaj prikaz. Vizualni prikaz potvrđuje nalaz izraženije povezanosti citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA s

dobi, N/L omjerom, koncentracijom serumskog željeza i aktivnošću upale, dok su korelacije za COX-2 (SP21) ograničene pretežno na aktivnost upale, a za COX-2 (CX-294) nisu uočene značajne povezanosti.



Slika 24. Korelacijska matrica biomarkera i kliničko-patoloških parametara. Prikazane su Spearmanove korelacije između citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA, COX-2 (SP21) i COX-2 (CX-294) te kliničko-patoloških varijabli. Boja označava smjer i jačinu korelacije (crveno - pozitivna, plavo - negativna, bijelo - odsutnost ili slaba povezanost).

#### 5.5.3.1 Multivarijatna analiza citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA

Nakon eksplorativne analize povezanosti biomarkera s kliničko-patološkim i laboratorijskim parametrima, za citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA primijenjena je ordinalna logistička regresija (proportional odds model, logit link), s obzirom na ordinalnu prirodu imunohistokemijskog skora. Zbog velikog broja nedostajućih vrijednosti za serumsko željezo, provedena je analiza osjetljivosti (engl. *sensitivity analysis*), pri čemu je ta varijabla isključena iz modela radi povećanja veličine analitičkog uzorka. U model analize osjetljivosti uključene su dob (kontinuirana) i aktivnost upale (ordinalna), uz veličinu uzorka  $n = 148$ . Pretpostavka proporcionalnih izgleda provjerena je testom nominalnih učinaka bez dokaza o njezinu kršenju ( $p > 0,05$  za sve prediktore).

U dobivenom ordinalnom regresijskom modelu utvrđeno je da su dob i aktivnost upale statistički značajno povezane s višim citoplazmatskim nakupljanjem 4-HNE-PA (Tablica 16). Porast dobi bio je povezan s većom vjerojatnošću višeg 4-HNE-PA skora (OR = 1,05 po godini; 95% CI 1,01-1,09;  $p = 0,008$ ). Aktivnost upale također je pokazala značajan učinak. Linearna komponenta upućivala je na porast nakupljanja 4-HNE-PA s povećanjem aktivnosti upale (OR = 3,76; 95% CI 1,33-12,50;  $p = 0,018$ ), dok je

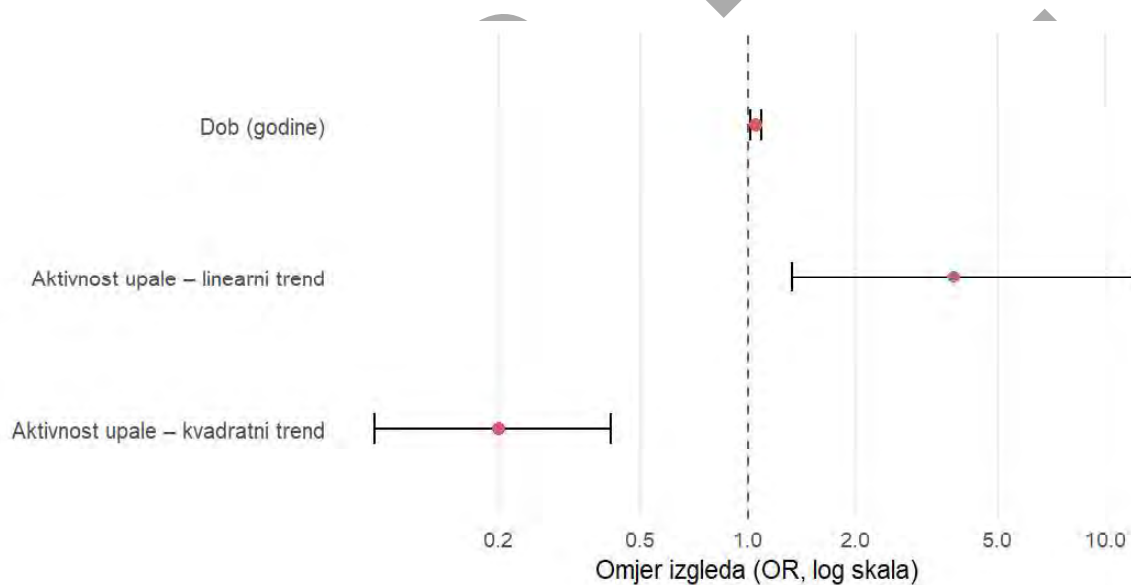
istodobno zabilježen i značajan kvadratni komponentni učinak (OR = 0,20; 95% CI 0,09-0,41; p < 0,001), što upućuje na nelinearan odnos između aktivnosti upale i akumulacije 4-HNE-PA.

Tablica 16. Ordinalna logistička regresija citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA (analiza osjetljivosti)

Prediktor	OR	95 % CI	p
Dob (po godini)	1,05	1,01 - 1,09	0,008**
Aktivnost upale - linearni trend	3,76	1,33 - 12,50	0,018*
Aktivnost upale - kvadratni trend	0,20	0,09 - 0,41	<0,001***

Model: ordinalna logistička regresija (proportional odds model). Ishod: citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA. n = 148. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)

Rezultati ordinalne logističke regresije dodatno su prikazani forest grafom, koji ilustrira omjere izgleda s 95% intervalima pouzdanosti za pojedine prediktore (Slika 25).



Slika 25. Forest graf ordinalne logističke regresije citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA. Prikazani su omjeri izgleda s 95 % intervalima pouzdanosti za pojedine prediktore. Vertikalna isprekidana linija označava vrijednost OR = 1 (odsutnost učinka).

## 5.6 Modeliranje progresije duž Correa kaskade

Radi integrirane procjene povezanosti histoloških biomarkera i kliničkih čimbenika s razvojnim stadijima intestinalnog tipa želučane karcinogeneze provedeno je multivarijatno regresijsko modeliranje progresije kroz faze Correa kaskade na ukupnom uzorku od 148 uzoraka. S obzirom na prirodni poredak promatranih stadija (uredna sluznica → atrofija → metaplazija → atrofija s metaplazijom → displazija → karcinom), primijenjeni su modeli koji omogućuju procjenu prijelaza prema uznapredovalijim lezijama uz istodobnu kontrolu za više prediktora. U šestostupanjskoj analizi korišten je ordinalni model susjednih kategorija (engl. *adjacent-category logit model*) bez proporcionalnog ograničenja, čime je omogućena procjena učinaka prediktora specifično za pojedine prijelaze između susjednih razvojnih stadija. Analiza je provedena u tri razine granularnosti ishoda: (1) šestostupanjski model koji obuhvaća sve histološke faze, (2) model s redukcijom na tri klinički relevantne kategorije: uredni; prekanceroza (atrofija, metaplazija, atrofija i metaplazija); maligno (displazija, karcinom), te (3) binarni model usmjeren na diskriminaciju benignih (uredna sluznica, atrofija, metaplazija, atrofija s metaplazijom) i malignih lezija (displazija, karcinom). U svim analizama primijenjen je pristup redukcije pristranosti (engl. *bias-reduction*; AS\_median) radi stabilizacije procjena u uvjetima manjih podskupina i potencijalne separacije. Ovakav višerazinski analitički okvir omogućuje istodobno razumijevanje globalnog trenda progresije bolesti, fazno-specifičnih učinaka pojedinih biomarkera te kliničke diskriminacijske sposobnosti modela u procjeni malignog potencijala.

### 5.6.1 Šestostupanjski model progresije

Za procjenu povezanosti prediktora sa svih šest stadija Correa kaskade testirano je više regresijskih specifikacija, uključujući multinomijalne i ordinalne modele s različitim skupovima prediktora. Ordinalni modeli procijenjeni su pristupom susjednih kategorija (engl. *adjacent-category logit model*) bez proporcionalnog ograničenja, dok su multinomijalni modeli korišteni kao analiza osjetljivosti i dodatna provjera robusnosti dobivenih zaključaka.

Pod pojmom *biomarkeri* podrazumijevane su varijable koje odražavaju histomorfološke i imunohistokemijske karakteristike želučane sluznice, uključujući morfološku prisutnost i aktivnost upale, imunohistokemijski izražaj COX-2 (klonovi CX-294 i SP21), citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA te prisutnost infekcije bakterijom *H. pylori*. Prošireni skup kliničkih varijabli obuhvaćao je demografske (spol, dob), anamnestičke (pušenje, uzimanje NSAID) te biokemijske pokazatelje sistemske upale (CRP i N/L omjer). Budući da CRP i N/L omjer odražavaju sličan patofiziološki konstrukt sistemske upalne aktivnosti, u konačne modele uključen je samo N/L omjer. Ovaj odabir temeljen je na većoj potpunosti podataka i manjem udjelu nedostajućih vrijednosti u odnosu na CRP, čime je omogućena stabilnija procjena modela i zadržavanje većeg broja ispitanika u analizi. Serumsko željezo (Fe) nije uključeno u

modele zbog visokog udjela nedostajućih podataka, što bi značajno smanjilo veličinu uzorka i moglo dovesti do nestabilnosti procjena. Zbog uočene nekonzistentnosti u dijelu anamnestičkih podataka (npr. varijabilno definirano pušenje ili uzimanje NSAID-a), definiran je podskup *klinički pouzdanih varijabli* koji uključuje spol, dob i N/L omjer. Ovaj podskup korišten je u reduciranim modelima s ciljem povećanja metodološke stabilnosti i olakšavanja interpretacije rezultata.

Rezultati u tablici 17 prikazuju usporedbu ordinalnih i multinomijalnih regresijskih modela za procjenu šestostupanjske Correa kaskade. Modeli su se razlikovali prema tipu regresije (ordinalni naspram multinomijalni) te prema uključenom skupu prediktora (biomarkeri; biomarkeri uz klinički pouzdane varijable; biomarkeri uz prošireni skup kliničkih varijabli). Usporedba je temeljena na log-vjerojatnosti, informacijskim kriterijima (AIC, BIC) i McFaddenovu pseudo- $R^2$ . Unutar multinomijalnih modela, model koji uključuje jedino biomarkere pokazao je najnižu vrijednost AIC-a, ujedno i najnižu među svim analiziranim modelima. Međutim, ordinalni modeli omogućuju modeliranje prijelaza između uzastopnih, prirodno poredanih razvojnih stadija te su stoga konceptualno prikladniji za opis biološkog kontinuuma Correa kaskade. Među ordinalnim specifikacijama, najbolju ravnotežu između prilagodbe i složenosti pokazao je model koji uključuje biomarkere i klinički pouzdane varijable. Uključivanje proširenog skupa kliničkih varijabli rezultiralo je povećanjem broja parametara i složenosti modela bez odgovarajućeg poboljšanja informacijskih kriterija. Nadalje, usporedba ordinalnih i multinomijalnih modela s istim skupom prediktora pokazala je konzistentan smjer i relativnu važnost ključnih učinaka, što upućuje na stabilnost zaključaka neovisno o odabranom regresijskom okviru.

S obzirom na prirodni poredak razvojnih stadija i mogućnost procjene prijelaza između susjednih faza, kao i povoljnu ravnotežu između prilagodbe i složenosti, ordinalni model s biomarkerima i klinički pouzdanim varijablama odabran je kao primarni model za daljnju analizu progresije kroz Correa kaskadu. Iako je multinomijalni model s biomarkerima ostvario najnižu vrijednost AIC-a, ordinalni pristup omogućuje biološki smisleniju interpretaciju progresije bolesti.

Tablica 17. Usporedba i odabir regresijskih modela za procjenu progresije kroz šestostupanjsku Correa kaskadu

Tip modela <sup>a</sup>	Prediktori	logLik	df	AIC <sup>b</sup>	BIC <sup>b</sup>	Mcfadden R <sup>2</sup>	Status
Ordinalni	Biomarkeri + Klinički pouzdane varijable	-92.3	60	<b>305</b>	<b>484</b>	0.641	<b>Primarni model</b>
Ordinalni	Biomarkeri	-113.0	40	306	426	0.560	Analiza osjetljivosti
Ordinalni	Biomarkeri + Prošireni skup kliničkih varijabli	-84.1	80	328	568	0.673	Odbačen (povećana složenost)
Multinomijalni	Biomarkeri + Klinički pouzdane varijable	-92.8	60	306	485	0.639	Analiza osjetljivosti
Multinomijalni	Biomarkeri	-101.0	45	<b>292</b>	<b>427</b>	0.606	Analiza osjetljivosti
Multinomijalni	Biomarkeri + Prošireni skup kliničkih varijabli	-84.8	80	330	569	0.670	Odbačen (povećana složenost)

<sup>a</sup> Ordinalni modeli procijenjeni su logit modelom susjednih kategorija bez proporcionalnog ograničenja uz primjenu metode redukcije pristranosti, dok su multinomijalni modeli procijenjeni multinomijalnom regresijom s primjenom metode redukcije pristranosti. <sup>b</sup> Informacijski kriteriji (AIC, BIC) interpretirani su primarno unutar istog tipa modela; usporedba ordinalnog i multinomijalnog pristupa korištena je kao analiza osjetljivosti i provjera robusnosti zaključaka.

#### 5.6.1.1 Rezultati primarnog šestostupanjskog ordinalnog modela

U ovom modelu omjeri izgleda (OR) interpretiraju se kao relativna promjena vjerojatnosti prijelaza iz pojedinog stadija u neposredno uznapređovaliji stadij Correa kaskade, uz kontrolu za ostale varijable uključene u model. Rezultati primarnog ordinalnog modela, prikazani u Tablici 18 i na Slici 26, ukazuju na fazno-specifične učinke pojedinih biomarkera, pri čemu se obrazac povezanosti razlikuje ovisno o stadiju progresije.

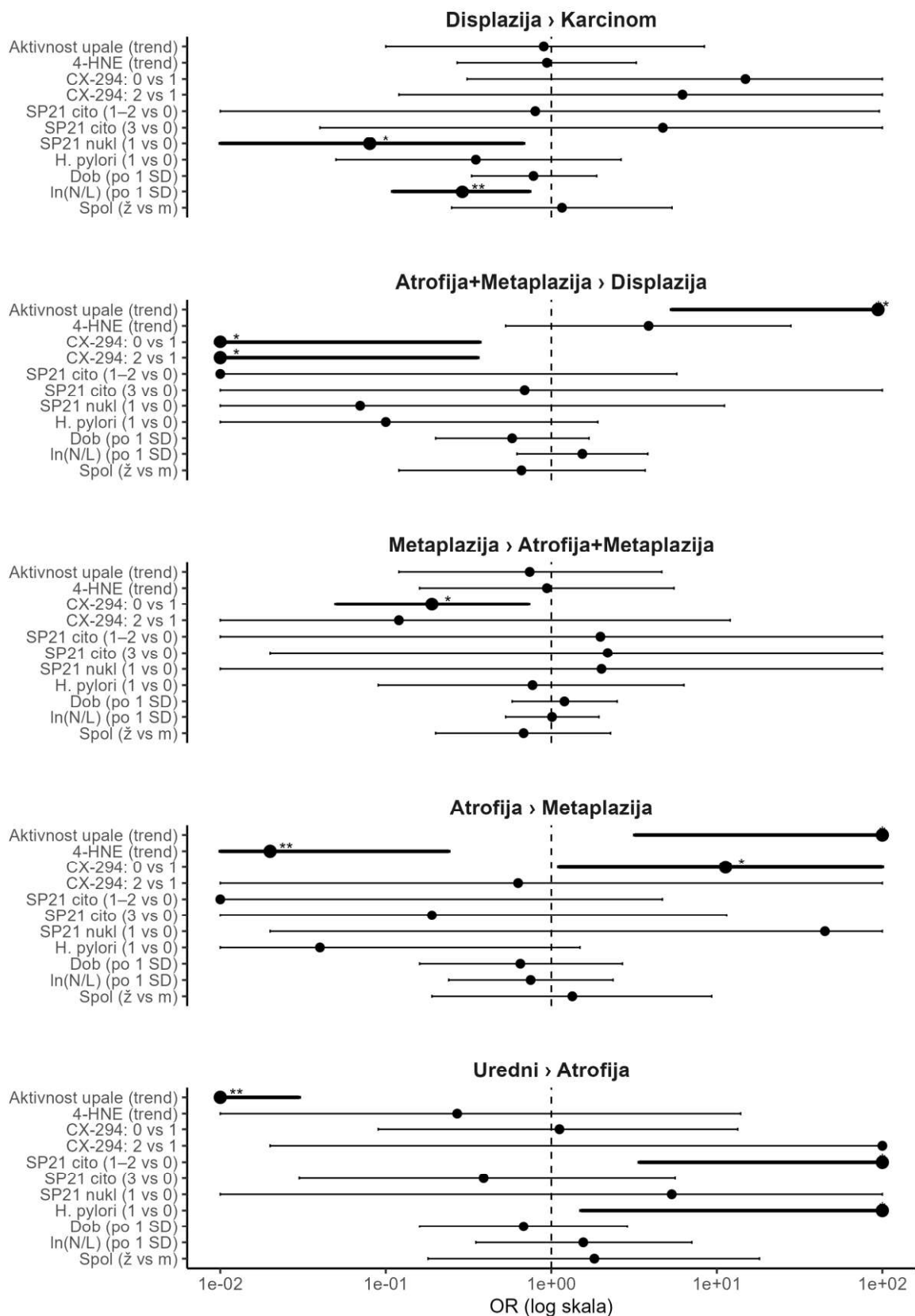
U prijelazu iz uredne sluznice u atrofiju značajni učinci zabilježeni su za aktivnost upale (OR < 0,01;  $p < 0,001$ ), citoplazmatski izražaj COX-2 detektiran klonom SP21 (1-2 vs 0;  $p = 0,022$ ) te prisutnost *H. pylori* ( $p = 0,035$ ). U prijelazu iz atrofije u metaplaziju značajni prediktori bili su aktivnost upale (OR 135,08;  $p = 0,010$ ), citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA (OR 0,02;  $p = 0,002$ ) te izražaj CX-294 (0 vs 1;  $p = 0,040$ ). U daljnjem prijelazu iz metaplazije u stadij atrofije s metaplazijom statističku značajnost zadržao je samo CX-294 (0 vs 1;  $p = 0,016$ ). Prijelaz iz stadija atrofije s metaplazijom u displaziju obilježen je značajnim učinkom aktivnosti upale (OR 94,13;  $p = 0,002$ ) te kategorija CX-294 (0 vs 1;  $p = 0,011$ ; 2 vs 1;  $p = 0,018$ ). U završnom prijelazu iz displazije u karcinom značajni prediktori bili su jezgri izražaj COX-2 detektiran klonom SP21 (OR 0,08;  $p = 0,020$ ) te N/L omjer (OR 0,29;  $p = 0,009$ ). Ostali prediktori u pojedinim prijelazima nisu dosegli statističku značajnost.

Ukupno gledano, statistički značajni učinci razlikovali su se među pojedinim prijelazima, pri čemu nijedan prediktor nije pokazao konzistentnu značajnost kroz sve faze progresije. Ovakav obrazac upućuje na to da pojedini biomarkeri imaju različitu ulogu u različitim fazama progresije bolesti te podupire koncept fazno-specifične biološke dinamike Correa kaskade.

Tablica 18. Omjeri izgleda za prijelaze između susjednih stadija Correa kaskade, primarni ordinalni model

Prediktor	Uredni → Atrofija OR (95% CI)	Atrofija → Metaplazija OR (95% CI)	Metaplazija → Atrofija s Metaplazijom OR (95% CI)	Atrofija s Metaplazijom → Displazija OR (95% CI)	Displazija → Karcinom OR (95% CI)
<b>Aktivnost upale (trend)</b>	<0,01 (0,00-0,03); p < 0,001***	135,08 (3,19-5724,22); p = 0,010**	0,74 (0,12-4,65); p = 0,748	94,13 (5,32-1666,17); p = 0,002**	0,90 (0,10-8,41); p = 0,927
<b>4-HNE-PA (citopl., trend)</b>	0,27 (0,01-13,93); p = 0,511	0,02 (0,00-0,24); p = 0,002**	0,94 (0,16-5,51); p = 0,943	3,87 (0,53-28,01); p = 0,181	0,94 (0,27-3,26); p = 0,924
<b>CX-294: 0 vs 1</b>	1,12 (0,09-13,37); p = 0,928	11,29 (1,11-114,64); p = 0,040*	0,19 (0,05-0,73); p = 0,016*	<0,01 (0,00-0,37); p = 0,011*	14,89 (0,31-708,19); p = 0,171
<b>CX-294: 2 vs 1</b>	119,75 (0,02->1000); p = 0,270	0,63 (0,00->1000); p = 0,904	0,12 (0,00-12,04); p = 0,371	<0,01 (0,00-0,36); p = 0,018*	6,20 (0,12-323,93); p = 0,366
<b>SP21 (citopl.) 1-2 vs 0</b>	>1000 (3,40->1000); p = 0,022*	<0,01 (0,00-4,69); p = 0,112	1,98 (0,00->1000); p = 0,839	<0,01 (0,00-5,73); p = 0,165	0,80 (0,01-95,85); p = 0,929
<b>SP21 (citopl.) 3 vs 0</b>	0,39 (0,03-5,60); p = 0,491	0,19 (0,00-11,47); p = 0,423	2,19 (0,02-319,40); p = 0,757	0,69 (0,00-102,99); p = 0,886	4,72 (0,04-574,56); p = 0,527
<b>SP21 (jezgr.) 1 vs 0</b>	5,34 (0,00->1000); p = 0,662	45,00 (0,02->1000); p = 0,325	2,01 (0,00->1000); p = 0,826	0,07 (0,00-11,12); p = 0,308	0,08 (0,01-0,68); p = 0,020*
<b>H. pylori (1 vs 0)</b>	335,10 (1,51->1000); p = 0,035*	0,04 (0,00-1,49); p = 0,080	0,77 (0,09-6,33); p = 0,805	0,10 (0,01-1,91); p = 0,126	0,35 (0,05-2,64); p = 0,308
<b>Dob (po 1 SD)</b>	0,68 (0,16-2,88); p = 0,602	0,65 (0,16-2,69); p = 0,556	1,20 (0,58-2,50); p = 0,624	0,58 (0,20-1,69); p = 0,319	0,78 (0,33-1,88); p = 0,586
<b>N/L (po 1 SD)</b>	1,56 (0,35-7,06); p = 0,560	0,75 (0,24-2,36); p = 0,627	1,01 (0,53-1,94); p = 0,966	1,54 (0,62-3,83); p = 0,354	0,29 (0,11-0,74); p = 0,009**
<b>Spol (ž vs m)</b>	1,82 (0,18-18,10); p = 0,608	1,34 (0,19-9,31); p = 0,765	0,68 (0,20-2,28); p = 0,527	0,66 (0,12-3,69); p = 0,635	1,16 (0,25-5,36); p = 0,852

(\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)



Slika 26. Omjeri izgleda za prijelaze između susjednih stadija Correa kaskade u primarnom ordinalnom modelu susjednih kategorija (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

### 5.6.2 Trostupanjski model progresije

Radi procjene stabilnosti procjena i smanjenja fragmentacije podataka, šestostupanjska Correa kaskada reducirana je na trostupanjsku ordinalnu varijablu s razinama: uredna sluznica, prekancerozne lezije (atrofija, metaplazija, atrofija+metaplazija) i maligne lezije (displazija, karcinom). Ovakva operacionalizacija omogućuje očuvanje prirodnog poretka biološke progresije uz povećanje veličine pojedinih kategorija i smanjenje rizika parcijalne separacije. Kao i u prethodnoj analizi, modeliranje je provedeno ordinalnim logit modelom susjednih kategorija bez proporcionalnog ograničenja, uz primjenu metode redukcije pristranosti radi stabilizacije procjena. Multinomijalni modeli korišteni su kao analiza osjetljivosti radi provjere robusnosti dobivenih rezultata. Skup prediktora definiran je analogno šestostupanjskom modelu te je uključivao biomarkere (aktivnost upale, COX-2-klon CX-294, COX-2-klon SP21, citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA i prisutnost *H. pylori*) te klinički pouzdane varijable (spol, dob i N/L omjer).

Usporedba regresijskih modela trostupanjske Correa kaskade pokazala je da ordinalni model s isključivo biomarkerima ima najniže vrijednosti informacijskih kriterija (AIC = 94,2; BIC = 148,2) uz visoku vrijednost McFaddenova pseudo- $R^2$  (0,802) (Tablica 19). Dodavanje klinički pouzdanih varijabli rezultiralo je blagim poboljšanjem prilagodbe modela, ali uz istodobno povećanje složenosti i nepovoljnije informacijske kriterije. Uključivanje proširenog skupa kliničkih varijabli dodatno je povećalo broj parametara bez proporcionalnog poboljšanja prilagodbe modela. Multinomijalni modeli s istim skupovima prediktora pokazali su identične vrijednosti log-vjerojatnosti, informacijskih kriterija i pseudo- $R^2$ , što odražava matematičku ekvivalentnost ordinalnog i multinomijalnog pristupa kod trostupanjske varijable ishoda.

S obzirom na najniže vrijednosti informacijskih kriterija, parsimoniju i stabilnost procjena, ordinalni model s biomarkerima odabran je kao primarni model za daljnju analizu progresije kroz trostupanjsku Correa kaskadu. Iako su ordinalni i multinomijalni modeli pokazali identične mjere prilagodbe, ordinalni pristup odabran je kao primarni zbog mogućnosti interpretacije prijelaza između susjednih stadija bolesti.

Tablica 19. Usporedba regresijskih modela za trostupanjsku Correa kaskadu

Tip modela <sup>a</sup>	Prediktori	logLik	df	AIC <sup>b</sup>	BIC <sup>b</sup>	McFadden R <sup>2</sup>	Status
Ordinalni	Biomarkeri	-29.113	18	94.227	148.177	0.802	<b>Primarni model</b>
Ordinalni	Biomarkeri + Klinički pouzdane varijable	-26.507	24	101.015	172.948	0.820	Analiza osjetljivosti
Ordinalni	Biomarkeri + Prošireni skup kliničkih varijabli	-26.682	32	117.364	213.275	0.819	Odbačen (povećana složenost)
Multinomijalni	Biomarkeri	-29.113	18	94.227	148.177	0.802	Analiza osjetljivosti
Multinomijalni	Biomarkeri + Klinički pouzdane varijable	-26.507	24	101.015	172.948	0.820	Analiza osjetljivosti
Multinomijalni	Biomarkeri + Prošireni skup kliničkih varijabli	-26.682	32	117.364	213.275	0.819	Odbačen (povećana složenost)

<sup>a</sup> Ordinalni modeli procijenjeni su logit modelom susjednih kategorija bez proporcionalnog ograničenja uz primjenu metode redukcije pristranosti, dok su multinomijalni modeli procijenjeni multinomijalnom regresijom s redukcijom pristranosti. <sup>b</sup> Informacijski kriteriji (AIC, BIC) interpretirani su primarno unutar istog tipa modela; identične vrijednosti ordinalnih i multinomijalnih modela posljedica su njihove matematičke ekvivalentnosti kod trostupanjske varijable ishoda.

#### 5.6.2.1 Rezultati primarnog trostupanjskog ordinalnog modela

Radi procjene povezanosti histoloških biomarkera s pojednostavljenom trostupanjskom progresijom Correa kaskade procijenjen je ordinalni logit model susjednih kategorija bez proporcionalnog ograničenja uz primjenu metode redukcije pristranosti. Ishod je definiran kao ordinalna varijabla s trima razinama: uredna sluznica, prekancerozne promjene i maligne lezije. Omjeri izgleda interpretiraju se kao relativna promjena izgleda prijelaza između susjednih stadija progresije, uz istodobnu kontrolu za ostale prediktore uključene u model, čime se procjenjuju prijelazi uredni → prekanceroza i prekanceroza → maligno.

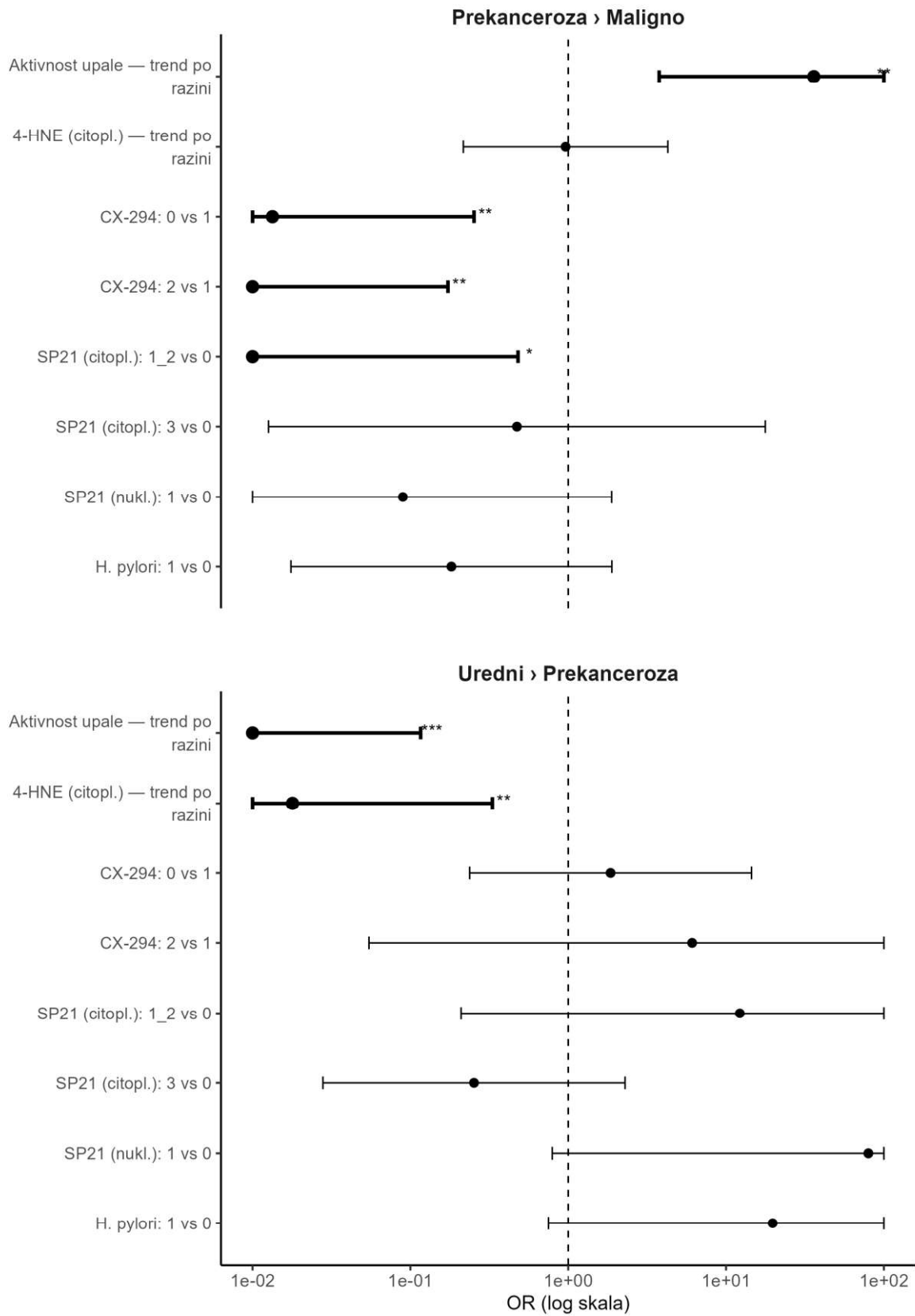
U prijelazu iz uredne sluznice u prekancerozni stadij statistički značajni učinci zabilježeni su za aktivnost upale i citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA (Slika 27, Tablica 20). Povećanje aktivnosti upale bilo je značajno povezano s prijelazom između stadija (OR 0,01; 95% CI 0,00-0,12;  $p < 0,001$ ), kao i citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA (OR 0,02; 95% CI 0,00-0,33;  $p = 0,007$ ). Ostali prediktori u ovom prijelazu nisu dosegli statističku značajnost. U prijelazu iz prekanceroznog u maligni stadij statistički značajni učinci utvrđeni su za aktivnost upale, kategorije izražaja COX-2 (klon CX-294) te citoplazmatski izražaj COX-2 (klon SP21). Aktivnost upale bila je značajno povezana s prijelazom između stadija (OR 35,98; 95% CI 3,77-343,43;  $p = 0,002$ ). Za CX-294 utvrđena je statistička značajnost u usporedbama 0 vs 1 (OR 0,01;  $p = 0,004$ ) i 2 vs 1 (OR 0,00;  $p = 0,006$ ), dok je i citoplazmatski izražaj SP21 (1-2 vs 0) pokazao značajnu povezanost (OR 0,00;  $p = 0,023$ ). Ostali prediktori nisu bili statistički značajni.

Ukupno gledano, statistički značajni učinci bili su prisutni u oba prijelaza, pri čemu se obrazac povezanosti razlikovao između ranog i kasnijeg stadija progresije, što upućuje na fazno-specifičnu ulogu pojedinih biomarkera u razvoju bolesti.

Tablica 20. Omjeri izgleda za prijelaze između susjednih stadija trostupanjske Correa kaskade, primarni ordinalni model

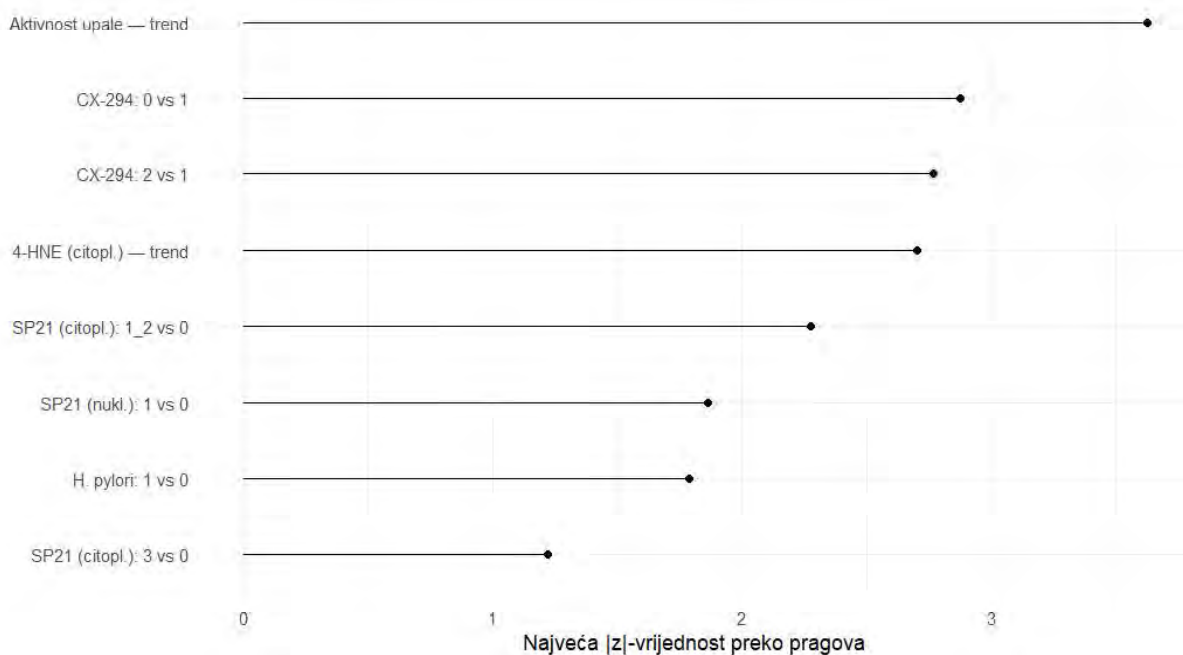
Prediktor	Uredni → Prekanceroza OR (95% CI)	Prekanceroza → Maligno OR (95% CI)
Aktivnost upale (trend)	0,01 (0,00-0,12); p < 0,001***	35,98 (3,77-343,43); p = 0,002**
4-HNE-PA (citopl., trend)	0,02 (0,00-0,33); p = 0,007**	0,96 (0,22-4,28); p = 0,960
CX-294: 0 vs 1	1,86 (0,24-14,50); p = 0,556	0,01 (0,00-0,25); p = 0,004**
CX-294: 2 vs 1	6,10 (0,05-679,93); p = 0,452	0,00 (0,00-0,17); p = 0,006**
SP21 (citopl.) 1-2 vs 0	12,22 (0,21-713,07); p = 0,228	0,00 (0,00-0,48); p = 0,023*
SP21 (citopl.) 3 vs 0	0,25 (0,03-2,29); p = 0,222	0,47 (0,01-17,73); p = 0,686
SP21 (jezgr.) 1 vs 0	79,72 (0,79-8024,94); p = 0,063	0,09 (0,00-1,88); p = 0,121
<i>H. pylori</i> (1 vs 0)	19,73 (0,75-519,02); p = 0,074	0,18 (0,02-1,89); p = 0,154

(\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)



Slika 27. Omjeri izgleda (OR) za prijelaze između susjednih stadija trostupanjске Correa kaskade u primarnom ordinalnom modelu susjednih kategorija. Zvezdicama su označeni statistički značajni učinci pojedinih prediktora (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Na temelju apsolutnih vrijednosti z-statistika iz bias-reduced ordinalnog modela (samo biomarkeri) izrađen je prikaz relativne važnosti pojedinih prediktora (Slika 28). Najveću apsolutnu z-vrijednost pokazala je aktivnost upale ( $|z|_{\max} = 3,62$ ), uz visoke vrijednosti u oba prijelaza modela. Slijede CX-294 u kontrastima 0 vs 1 ( $|z|_{\max} = 2,88$ ;  $p = 0,004$ ) i 2 vs 1 ( $|z|_{\max} = 2,77$ ;  $p = 0,006$ ) te citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA ( $|z|_{\max} = 2,70$ ;  $p = 0,007$ ). SP21 (citoplazmatski 1-2 vs 0) pokazao je umjeren doprinos ( $|z|_{\max} = 2,27$ ;  $p = 0,023$ ). SP21 (jezgreni) i *H. pylori* imali su niže maksimalne  $|z|$ -vrijednosti i nisu dosegli razinu statističke značajnosti, dok je SP21 (3 vs 0) pokazao najmanju apsolutnu z-vrijednost.



Slika 28. Rang važnosti biomarkera u trostupanjnom ordinalnom modelu. Grafički prikaz ilustrira relativnu važnost pojedinih prediktora u modelu, pri čemu duljina segmenta odgovara maksimalnoj apsolutnoj z-vrijednosti kroz procijenjene prijelaze.

### 5.6.3 Dvostupajnski (binarni) model progresije

Za procjenu čimbenika povezanih s malignim ishodom, definiranim kao displazija ili karcinom, primijenjena je binarna logistička regresija, uz korištenje metode redukcije pristranosti radi stabilizacije procjena i izbjegavanja problema separacije podataka. Ishod je definiran kao maligni (displazija/karcinom) u odnosu na benigni (uredna i prekancerozne skupine). Skup prediktora definiran je analogno šestostupanjskom i trostupanjskom modelu te je uključivao tri specifikacije: biomarkere, biomarkere uz klinički pouzdane varijable (spol, dob i N/L omjer) te biomarkere uz prošireni skup kliničkih i laboratorijskih varijabli. Usporedba modela temeljena je na log-vjerojatnosti, informacijskim kriterijima (AIC, BIC) i McFaddenovu pseudo-R<sup>2</sup>.

Tablica 21. Usporedba binarnih logističkih regresijskih modela za procjenu malignog ishoda (benigno vs. maligno)

Tip modela	Prediktori	logLik	df	AIC	BIC	McFadden R <sup>2</sup>	Status
Binarni (redukcija pristranosti)	Biomarkeri	-21.0	9	60.0	87.0	0.791	Analiza osjetljivosti
Binarni (redukcija pristranosti)	Biomarkeri + Prošireni skup kliničkih varijabli	-15.9	16	63.7	111.7	0.842	Odbačen (povećana složenost)
Binarni (redukcija pristranosti)	Biomarkeri + Klinički pouzdane varijable	-17.9	12	<b>59.8</b>	95.8	0.822	<b>Primarni model</b>

*logLik* - log-likelihood modela; *df* - broj procijenjenih parametara; *AIC* - Akaike informacijski kriterij; *BIC* - Bayesov informacijski kriterij; *McFadden R<sup>2</sup>* - pseudo-koeficijent determinacije;

Usporedba regresijskih modela pokazala je da model koji uključuje biomarkere i klinički pouzdane varijable ostvaruje najnižu vrijednost AIC-a (59,8), dok model s isključivo biomarkerima ima gotovo identičnu vrijednost (AIC = 60,0). Model s proširenim skupom kliničkih varijabli pokazao je više vrijednosti AIC i BIC, unatoč nešto višem pseudo-R<sup>2</sup>, što upućuje na povećanu složenost bez proporcionalnog poboljšanja prilagodbe (Tablica 21).

S obzirom na kriterije informacijske prilagodbe, parsimoniju i stabilnost procjena, kao primarni model odabran je model koji uključuje biomarkere i klinički pouzdane varijable. Relativno mala razlika u AIC vrijednostima između modela s i bez kliničkih varijabli upućuje na dominantnu ulogu biomarkera u diskriminaciji malignog ishoda, uz dodatni, ali ograničeni doprinos kliničkih čimbenika.

### 5.6.3.1 Rezultati primarnog binarnog modela

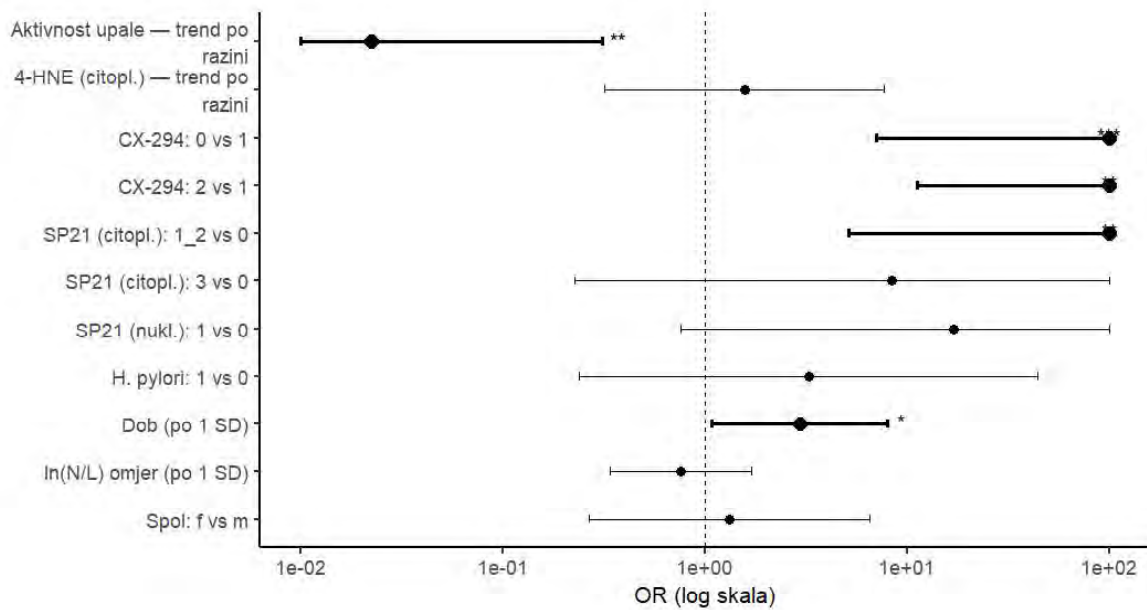
Rezultati primarnog binarnog modela, procijenjenog logističkom regresijom s redukcijom pristranosti, prikazani su u Tablici 22 i Slici 29. Ishod je definiran kao maligni (displazija/karcinom) u odnosu na benigni (uredna i prekancerozne skupine). Omjeri izgleda (OR) interpretiraju se kao relativna promjena izgleda malignog ishoda uz kontrolu za ostale varijable uključene u model.

Statistički značajni prediktori malignog ishoda bili su aktivnost upale, izražaj COX-2 detektiran klonom CX-294 (oba kontrasta), dob te citoplazmatski izražaj COX-2 detektiran klonom SP21 (1-2 vs 0). Aktivnost upale pokazala je značajnu povezanost s malignim ishodom (OR = 0,02; 95 % CI 0,00-0,31; p = 0,005). Za izražaj COX-2 detektiran klonom CX-294 utvrđena je snažna i konzistentna povezanost u oba smjera (0 vs 1: OR = 120,35; p < 0,001; 2 vs 1: OR = 556,55; p = 0,001), što upućuje na izraženu diskriminacijsku vrijednost ovog markera u razlikovanju benignih i malignih lezija. Dob (po 1 SD) također se pokazala kao značajan prediktor (OR = 2,93; 95 % CI 1,08-7,95; p = 0,034), dok je citoplazmatski izražaj COX-2 detektiran klonom SP21 (1-2 vs 0) bio snažno povezana s malignim ishodom (OR = 446,50; 95 % CI 5,15-38683,00; p = 0,007). Ostali prediktori, uključujući citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA, prisutnost *H. pylori*, N/L omjer, više kategorije citoplazmatskog i jezgrenog izražaja SP21 te spol, nisu dosegli razinu statističke značajnosti.

Tablica 22. Omjeri izgleda i p-vrijednosti za maligni u odnosu na benigni ishod - primarni binarni model

Prediktor	OR (95 % CI)	p-vrijednost
Aktivnost upale (trend)	0,02 (0,00-0,31)	0,005**
4-HNE-PA (citopl., trend)	1,56 (0,32-7,62)	0,582
CX-294: 0 vs 1	120,35 (6,99-2071,21)	< 0,001***
CX-294: 2 vs 1	556,55 (11,24-27567,74)	0,001***
SP21 (citopl.) 1-2 vs 0	446,50 (5,15-38683,00)	0,007**
SP21 (citopl.) 3 vs 0	8,33 (0,23-307,12)	0,249
SP21 (jezgr.) 1 vs 0	16,84 (0,76-372,12)	0,074
<i>H. pylori</i> (1 vs 0)	3,25 (0,24-43,94)	0,376
Dob (po 1 SD)	2,93 (1,08-7,95)	0,034*
N/L (po 1 SD)	0,76 (0,34-1,71)	0,504
Spol (ž vs m)	1,32 (0,27-6,49)	0,733

(\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)



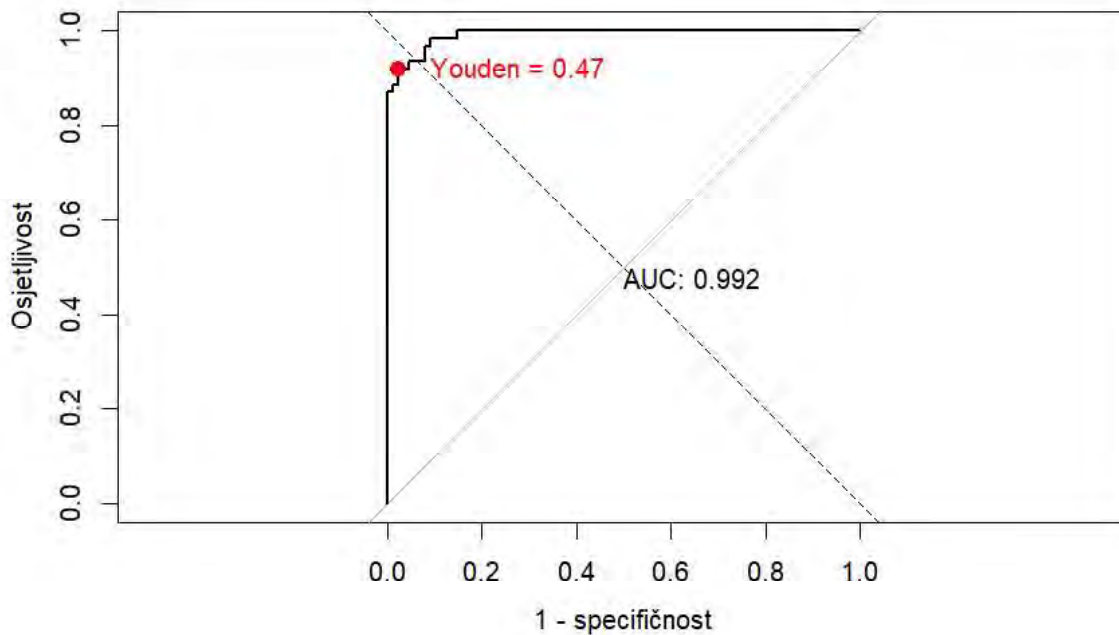
Slika 29. Forest graf omjera izgleda (OR) primarnog binarnog logističkog modela za maligni ishod (benigno vs. maligno)

Ocjena u tijeku

### 5.6.3.2 Procjena performansi primarnog binarnog modela

#### 5.6.3.2.1 ROC analiza, AUC, kalibracija i Brierov pokazatelj

Diskriminacijska sposobnost primarnog binarnog Modela 3 (biomarkeri + spol + dob + N/L omjer) procijenjena je analizom ROC krivulje (Slika 30). Površina ispod ROC krivulje (AUC) iznosila je 0,992 (95 % CI 0,983-1,000; DeLong metoda), što upućuje na iznimno visoku sposobnost modela u razlikovanju malignih (displazija/karcinom) od benignih nalaza (uredni/prekancerozni).

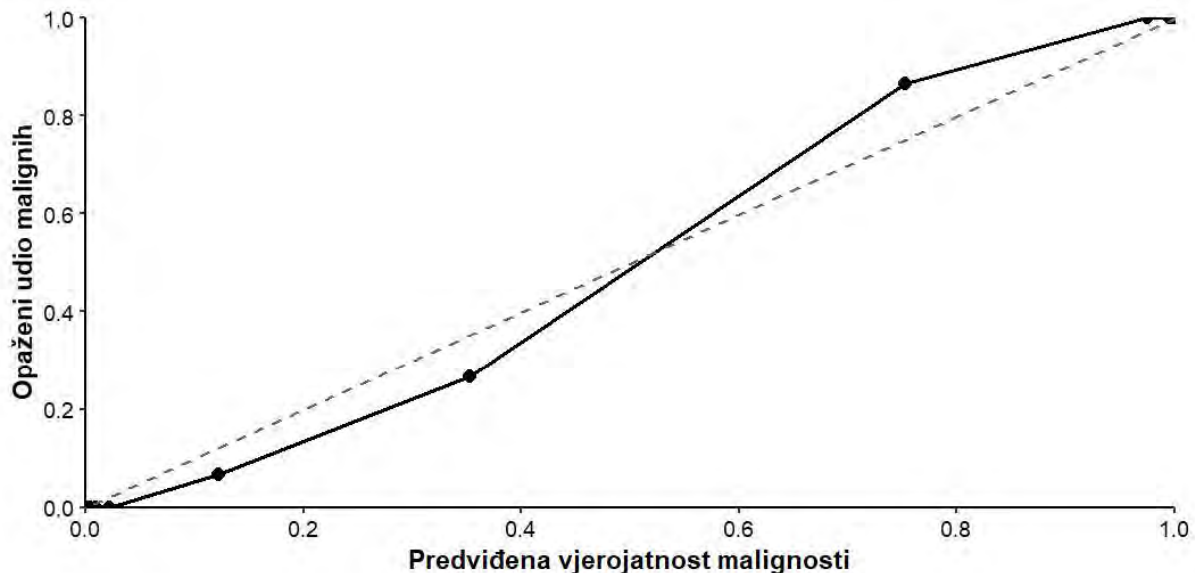


Slika 30. ROC krivulja binarnog Modela 3 za predikciju malignog ishoda (benigno vs. maligno)

U promatranom uzorku prevalencija malignih lezija iznosila je 41,2 % (61/148). Optimalni prag određen prema Youdenovu kriteriju iznosio je 0,473. Pri tom pragu osjetljivost modela bila je 91,8 %, specifičnost 97,7 %, pozitivna prediktivna vrijednost 96,6 %, a negativna prediktivna vrijednost 94,4 %. Ukupna točnost klasifikacije iznosila je 95,3 %, što potvrđuje vrlo visoku klasifikacijsku učinkovitost modela u promatranom uzorku. Radi procjene mogućeg optimizma provedena je interna validacija bootstrap postupkom (engl. *bootstrap internal validation*, B = 1000). Prosječni optimizam AUC-a iznosio je 0,012, dok je optimizmom korigirani AUC (engl. *optimism-corrected AUC*) iznosio 0,979, što potvrđuje zadržavanje vrlo visoke diskriminacijske sposobnosti i nakon korekcije.

Ukupna prediktivna pogreška bila je niska (Brierov pokazatelj = 0,036). Kalibracija modela procijenjena je decilnom kalibracijskom krivuljom, koja pokazuje dobro slaganje između predviđenih i opaženih udjela malignih lezija, uz blaga odstupanja u srednjem rasponu vjerojatnosti (Slika 31). Numerički pokazatelji kalibracije (presjek = 0,33; nagib = 2,03) upućuju na blagu sistematsku podcijenjenost rizika uz izraženiju „oštrinu“ predikcija.

Tijekom bootstrap validacije u pojedinim resampliranim uzorcima zabilježene su ekstremne procjene vjerojatnosti (bliske 0 ili 1) te povremena nekonvergencija algoritma, što je u skladu s pojavom (kvazi)separacije u prisutnosti snažnih prediktora. Stoga je konačni model procijenjen primjenom logističke regresije uz redukciju pristranosti, čime je osigurana stabilnost i robusnost procjena.

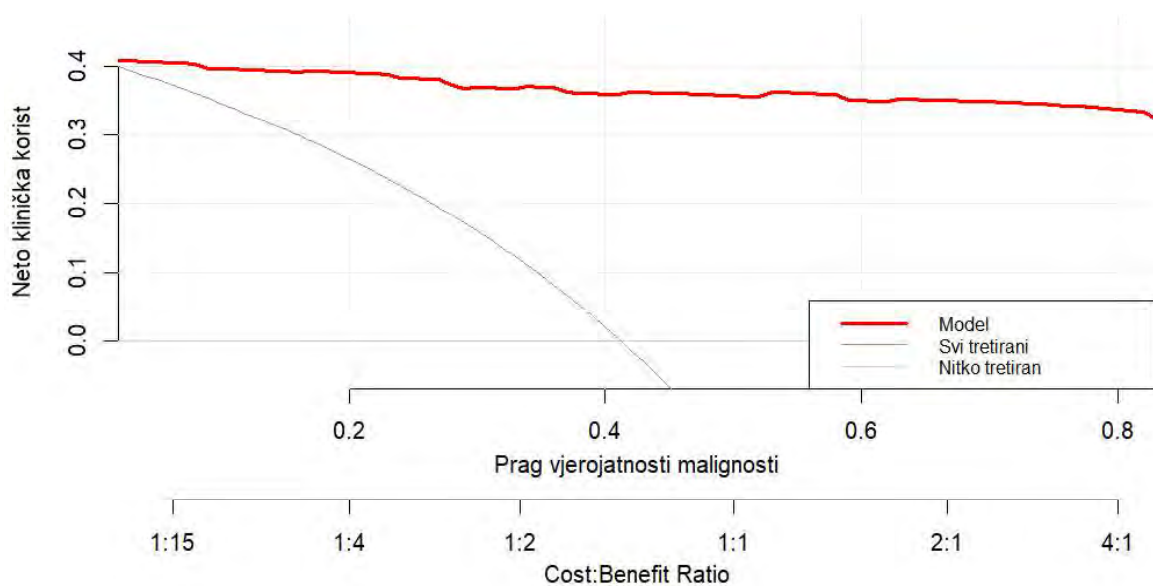


Slika 31. Kalibracijska krivulja primarnog binarnog modela. Prikazan je odnos između predviđene vjerojatnosti malignog ishoda i opaženog udjela malignih lezija po decilima predviđenog rizika. Isprekidana linija predstavlja idealnu kalibraciju modela.

#### 5.6.3.2.2 Analiza krivulje odluke

Klinička korisnost primarnog binarnog modela dodatno je procijenjena analizom krivulje odluke. Model je pokazao veću neto kliničku korist u odnosu na strategije „svi tretirani” i „nitko tretiran” kroz širok raspon pragova vjerojatnosti (približno 0,05-0,75), što upućuje na njegovu potencijalnu primjenjivost u donošenju kliničkih odluka (Slika 32).

Neto korist modela bila je stabilna kroz klinički relevantan raspon pragova, uz relativno uske intervale pouzdanosti, što dodatno potvrđuje robusnost procjene. Presjek strategije „svi tretirani” s linijom nulte koristi zabilježen je pri pragu vjerojatnosti približno 0,41, što odgovara prevalenciji malignih lezija u ispitivanom uzorku (41,2 %).



Slika 32. Analiza krivulje odluke primarnog binarnog modela. Prikazana je neto klinička korist Modela 3 u odnosu na referentne strategije „svi tretirani” i „nitko tretiran” kroz raspon pragova vjerojatnosti malignog ishoda. Crvena linija predstavlja model, sive linije referentne strategije, a tanke linije 95 % intervale pouzdanosti.

#### 5.6.3.2.3 Analize osjetljivosti binarnog modela

##### Analiza osjetljivosti bez urednih uzoraka

Radi procjene stabilnosti modela provedena je analiza osjetljivosti u kojoj su isključeni uzorci uredne želučane sluznice. Od ukupno 148 uzoraka uklonjeno je 20 urednih uzoraka, te je u analizu uključeno 128 uzoraka. U tom podskupu uspoređena su tri binarna logistička modela procijenjena metodom redukcije pristranosti: model s biomarkerima, model s klinički pouzdanim varijablama te model s proširenim skupom kliničkih varijabli. Model temeljen isključivo na biomarkerima pokazao je najbolju ravnotežu između prilagodbe i složenosti ( $\log\text{Lik} = -18,1$ ;  $\text{AIC} = 54,2$ ;  $\text{BIC} = 79,8$ ;  $\text{McFadden } R^2 = 0,796$ ). Dodavanje kliničkih varijabli rezultiralo je tek blagim povećanjem pseudo-koeficijenta determinacije ( $R^2 = 0,815$  i  $0,832$ ), ali uz pogoršanje informacijskih kriterija ( $\Delta\text{AIC} = 2,52$  i  $7,61$ ), što upućuje na ograničen dodatni doprinos tih varijabli modelu (Dodatak Tablica D6).

##### Analiza osjetljivosti bez urednih uzoraka i atrofije

Dodatna analiza provedena je i isključivanjem uzoraka uredne sluznice i atrofije, čime je modeliranje ograničeno na kasnije stadije Correa kaskade. U tom slučaju iz analize je isključeno ukupno 34 uzorka (20 urednih i 14 atrofije), te je uključeno 114 uzoraka. I u ovom podskupu uspoređena su ista tri modela, pri čemu je model temeljen na biomarkerima ponovno pokazao najniže vrijednosti informacijskih

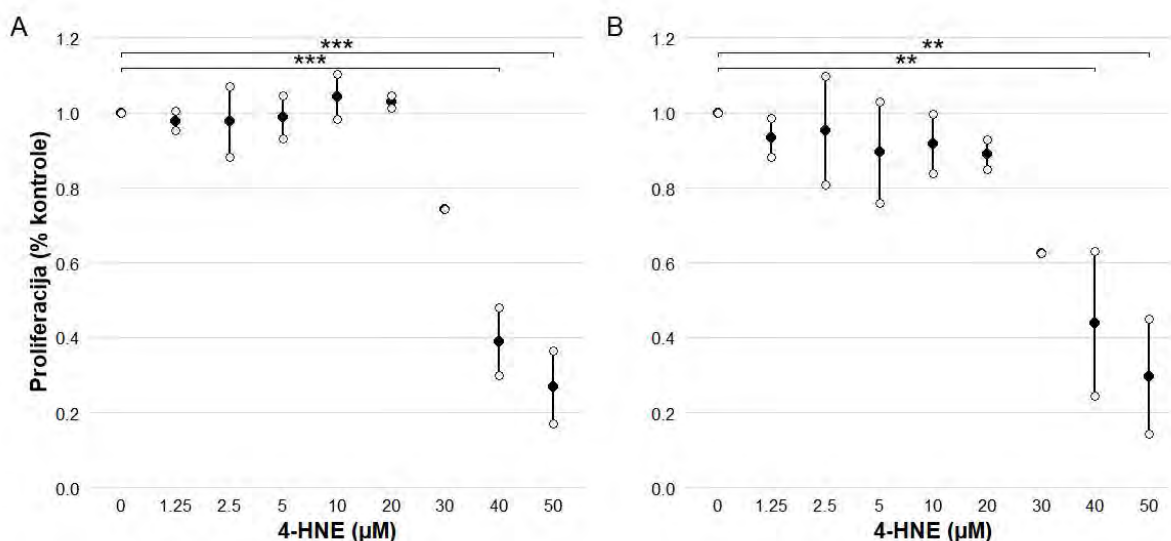
kriterija ( $\log\text{Lik} = -16,6$ ;  $\text{AIC} = 49,1$ ;  $\text{BIC} = 71,0$ ;  $\text{McFadden } R^2 = 0,790$ ). Modeli s dodatnim kliničkim varijablama imali su viši AIC i BIC ( $\Delta\text{AIC} = 3,18$  i  $8,83$ ), bez proporcionalnog poboljšanja prilagodbe (Dodatak Tablica D7).

U svim analiziranim konfiguracijama (primarni model te dvije analize osjetljivosti s postupnim isključivanjem ranih stadija) modeli temeljeni na imunohistokemijskim biomarkerima zadržali su stabilnu diskriminacijsku sposobnost i najpovoljniju ravnotežu između prilagodbe i složenosti. Ovi nalazi upućuju na robusnost dobivenih rezultata i konzistentnu prediktivnu vrijednost biomarkera neovisno o strukturi uzorka.

## 5.7 Stanične kulture

### 5.7.1 Ispitivanje citotoksičnosti 4-HNE-a na AGS stanice

Učinak koncentracije 4-HNE-a na vijabilnost stanica AGS analiziran je LMM modelom, pri čemu je doza modelirana kao fiksni efekt, a eksperiment kao slučajni efekt (random intercept) radi kontrole varijabilnosti između neovisnih bioloških ponavljanja. Nakon 24 sata inkubacije (Slika 33A) utvrđen je statistički značajan ukupni učinak koncentracije na vijabilnost ( $F(7,7)=37,8$ ;  $p<0,001$ ). Dunnettovim testom uz Holm korekciju za višestruka testiranja zabilježeno je značajno smanjenje vijabilnosti pri dozama  $40 \mu\text{M}$  ( $\Delta = -0,61$ ; 95% CI:  $-0,88$  do  $-0,34$ ;  $p = 0,0004$ ) i  $50 \mu\text{M}$  ( $\Delta = -0,73$ ; 95% CI:  $-1,01$  do  $-0,46$ ;  $p = 0,0001$ ), dok niže doze nisu pokazale statistički značajan učinak. Sličan obrazac opažen je i nakon 48 sati inkubacije (Slika 33B), pri čemu je također utvrđen značajan ukupni učinak doze ( $F(7,7)=16,0$ ;  $p=0,0008$ ). Statistički značajno smanjenje vijabilnosti zabilježeno je pri dozama  $40 \mu\text{M}$  ( $\Delta = -0,56$ ; 95% CI:  $-0,92$  do  $-0,21$ ;  $p = 0,0033$ ) i  $50 \mu\text{M}$  ( $\Delta = -0,7$ ; 95% CI:  $-1,06$  do  $-0,35$ ;  $p = 0,001$ ), dok niže doze nisu imale značajan učinak. Unatoč sličnim veličinama učinka pri višim dozama, varijabilnost između neovisnih eksperimenata bila je izraženija nakon 48 sati, što je rezultiralo nešto višim p-vrijednostima u odnosu na 24-satnu inkubaciju.



Slika 33. Učinak 4-HNE-a na vijabilnost stanica nakon 24 h (A) i 48 h (B). Vijabilnost je analizirana linearnim mješovitim modelom, pri čemu je eksperiment uključen kao slučajni efekt. Prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike utvrđene su između kontrolne skupine (0  $\mu\text{M}$ ) i koncentracija 40  $\mu\text{M}$  te 50  $\mu\text{M}$  nakon 24 i 48 sati inkubacije (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Napomena: koncentracija 30  $\mu\text{M}$  prikazana je deskriptivno, ali nije uključena u statističku analizu zbog nedostatnog broja neovisnih bioloških ponavljanja.

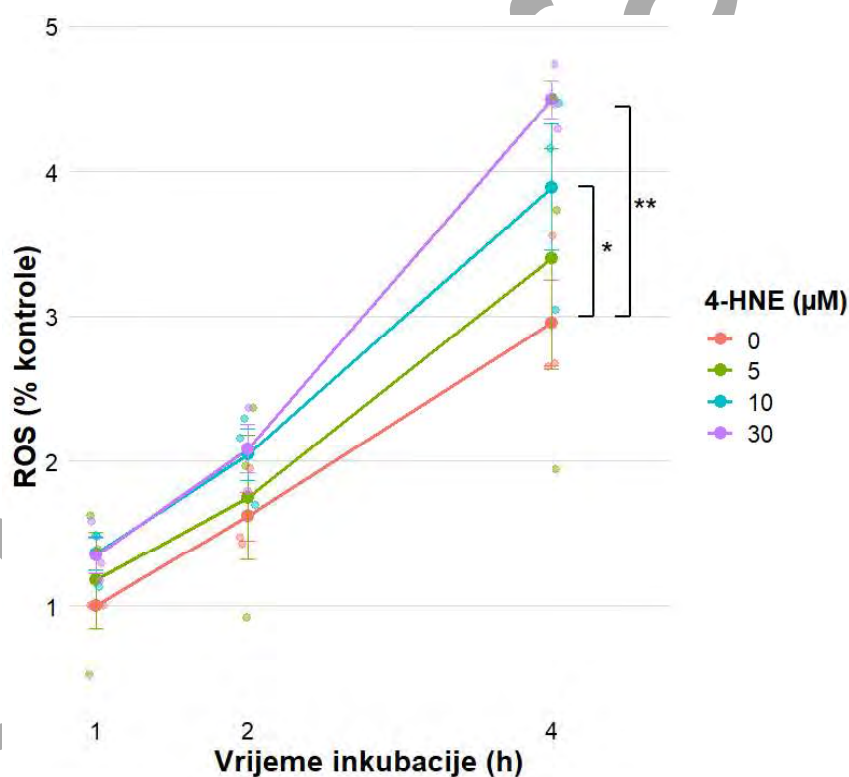
Tablica 23. Procjena polumaksimalne inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>) 4-HNE primjenom 4-parametarskog log-logističkog modela

Vrijeme	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	95% CI	SE ( $\mu\text{M}$ )
24 h	32.9	28.2-37.6	2.18
48 h	33.1	12.5-53.8	9.55

Farmakodinamička analiza provedena je primjenom 4-parametarskog log-logističkog modela (4PL) koje je, za razliku od inferencijske statističke analize, uključivalo i dozu od 30  $\mu\text{M}$ . Nakon 24 sata inkubacije procijenjeni IC<sub>50</sub> iznosio je 32,9  $\mu\text{M}$  (95% CI: 28,2-37,6  $\mu\text{M}$ ), uz izražen strm nagib krivulje (Hill = 8), što upućuje na nagli prijelaz u citotoksično područje. Nakon 48 sati inkubacije procijenjeni IC<sub>50</sub> iznosio je 33,1  $\mu\text{M}$  (95% CI: 12,5-53,8  $\mu\text{M}$ ). Iako je središnja vrijednost IC<sub>50</sub> bila usporediva s onom nakon 24 sata, procjena je pokazala veću standardnu pogrešku i širi interval pouzdanosti, što ukazuje na povećanu među-eksperimentalnu varijabilnost pri duljoj inkubaciji. Ukupno, rezultati upućuju da citotoksični prag 4-HNE ostaje stabilan između 24 i 48 sati inkubacije, uz smanjenu preciznost procjene parametara modela pri duljoj izloženosti (Tablica 23).

### 5.7.2 Akutni učinak 4-HNE-a na stvaranje unutarstaničnog ROS-a

Učinak koncentracije 4-HNE i vremena inkubacije na stvaranje unutarstaničnih ROS analiziran je linearnim mješovitim modelom, pri čemu je neovisno biološko ponavljanje (dan eksperimenta) uključeno kao slučajni efekt (Slika 34). Utvrđen je statistički značajan glavni učinak vremena inkubacije ( $F(2,22)=85,6$ ;  $p<0,001$ ) te značajan glavni učinak koncentracije 4-HNE ( $F(3,22)=4,76$ ;  $p=0,010$ ), dok interakcija koncentracije i vremena nije bila statistički značajna ( $p=0,429$ ). Post-hoc usporedbe (Dunnettov test uz Holm korekciju), prosječno preko svih vremenskih točaka, pokazale su značajno povećanje stvaranja ROS pri koncentracijama 10  $\mu\text{M}$  ( $\Delta=0,576$ ;  $p=0,036$ ) i 30  $\mu\text{M}$  ( $\Delta=0,785$ ;  $p=0,006$ ), dok koncentracija od 5  $\mu\text{M}$  nije pokazala statistički značajan učinak ( $p=0,279$ ). Učinak koncentracije bio je konzistentan kroz sve analizirane vremenske točke.

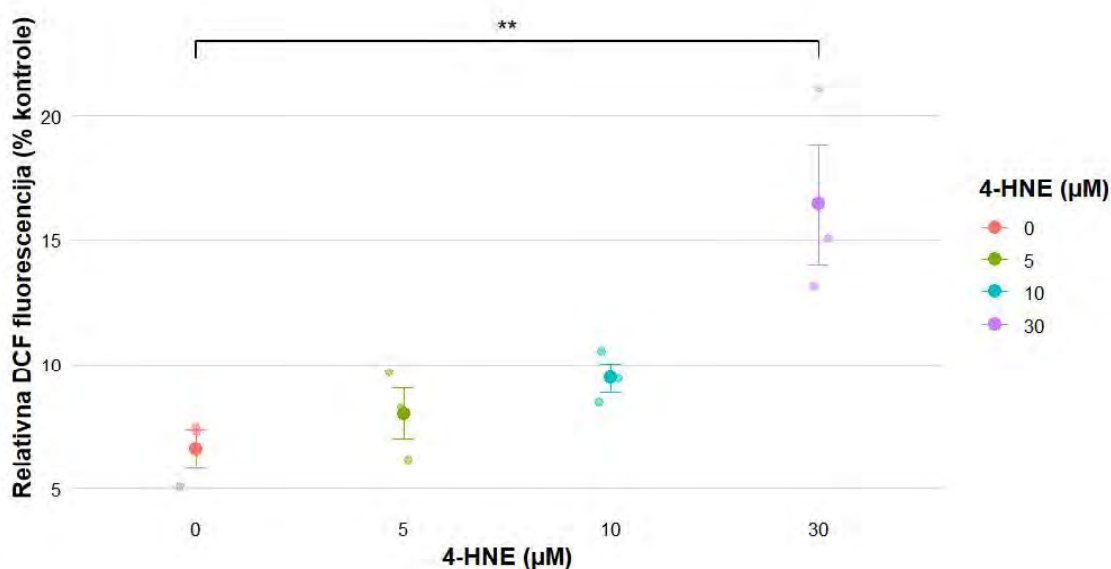


Slika 34. Akutni učinak 4-HNE-a na stvaranje unutarstaničnih ROS u AGS stanicama nakon 1, 2 i 4 sata inkubacije s 4-HNE-om (0, 5, 10 i 30  $\mu\text{M}$ ). Prikazane su pojedinačne vrijednosti neovisnih bioloških ponavljanja te srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Statistički značajno povećanje stvaranja ROS u odnosu na kontrolu utvrđeno je za koncentracije 10  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ , pri čemu su učinci prikazani prosječno kroz sve analizirane vremenske točke (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 5.7.3 Učinak 24-satnog tretmana 4-HNE-om na stvaranje unutarstaničnog ROS-a

Razina unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u AGS stanicama nakon 24-satnog tretmana 4-HNE analizirana je linearnim mješovitim modelom s koncentracijom kao fiksnim efektom, pri čemu je neovisno biološko ponavljanje (dan eksperimenta) uključeno kao slučajni efekt. Tehnički triplikati

prethodno su agregirani unutar svakog biološkog ponavljanja, čime je jedinica analize bilo neovisno biološko ponavljanje (n = 3). Utvrđen je statistički značajan učinak koncentracije 4-HNE na razinu ROS nakon 24 sata inkubacije ( $F(3,8) = 9,75$ ;  $p = 0,0048$ ) (Slika 35). Post-hoc usporedbe pojedinih koncentracija prema kontroli (0  $\mu\text{M}$ ), provedene Dunnettovim testom uz Holm korekciju za višestruka testiranja, pokazale su da je samo koncentracija od 30  $\mu\text{M}$  uzrokovala statistički značajan porast ROS-a u odnosu na kontrolu (razlika +9,83 %, 95 % CI 3,34 do 16,32;  $p=0,008$ ). Procijenjena veličina učinka za 30  $\mu\text{M}$  u odnosu na kontrolu bila je vrlo velika (Hedges'  $g = 2,54$ ). Koncentracije od 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (Tablica 24). Rezultati upućuju na koncentracijski ovisan učinak 4-HNE na oksidacijski stres, pri čemu se značajno povećanje ROS bilježi tek pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji.



Slika 35. Učinak 24-satnog tretmana 4-HNE-om na razinu unutarstaničnih ROS u AGS stanicama. Stanice su tretirane 4-HNE-om (0, 5, 10 i 30  $\mu\text{M}$ ) tijekom 24 sata, nakon čega je razina ROS određena DCFH-DA metodom. Podaci predstavljaju srednju vrijednost  $\pm$  SEM triju neovisnih bioloških ponavljanja, dok pojedinačne točke predstavljaju pojedina biološka ponavljanja. Prikazana je statistički značajna razlika između kontrolne skupine (0  $\mu\text{M}$ ) i skupine tretirane s 30  $\mu\text{M}$  4-HNE (\*\*  $p < 0,01$ ).

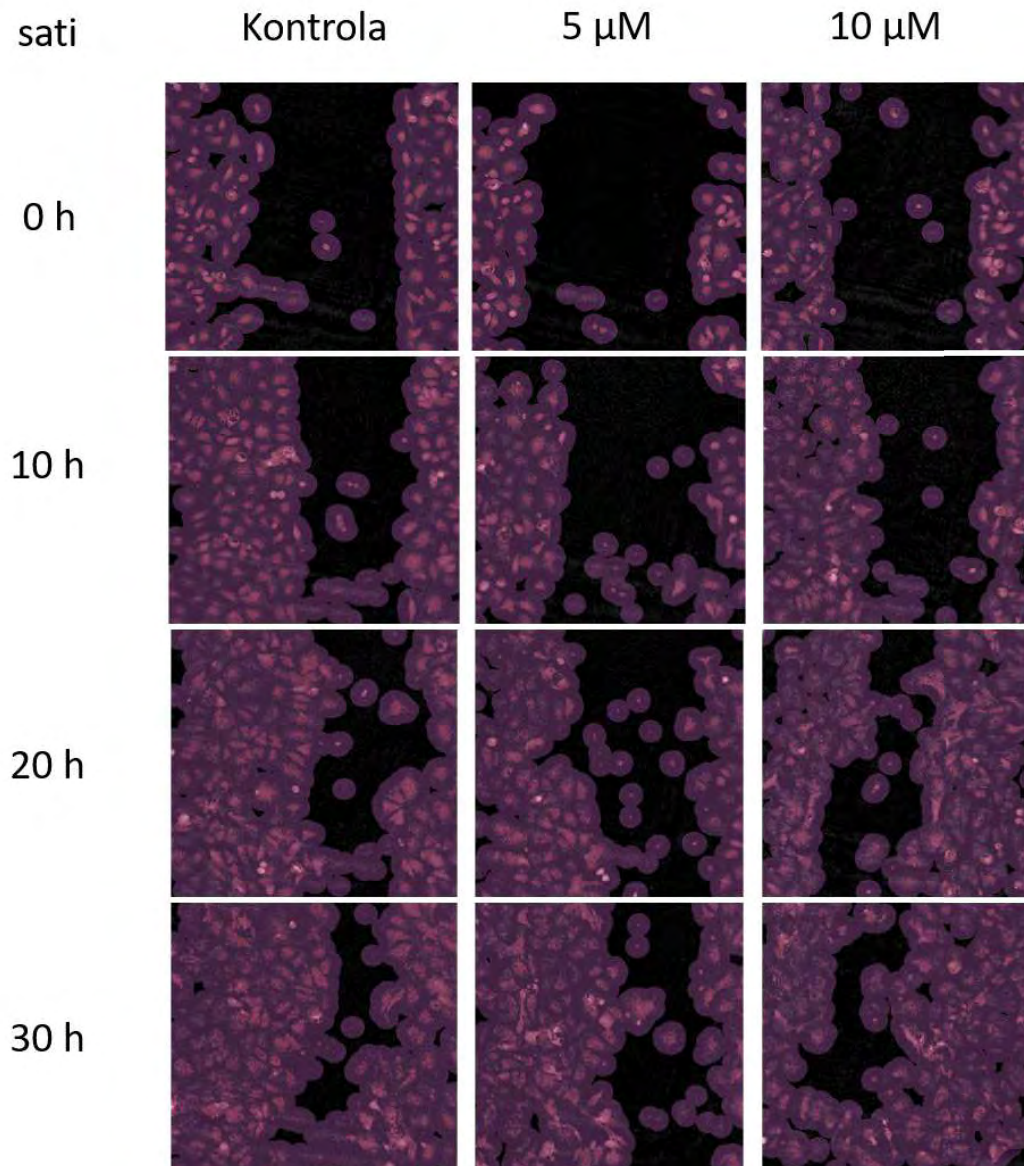
Tablica 24. Dunnett post-hoc usporedbe koncentracija 4-HNE prema kontroli nakon 24 sata inkubacije (LMM, Holm korekcija)

Koncentracija ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta$ vs kontrola	95% CI	p (Holm)
5	1,41	-5,08 do 7,91	0,501
10	2,85	-3,64 do 9,35	0,397
30	9,83	3,34 do 16,32	0,008**

(\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

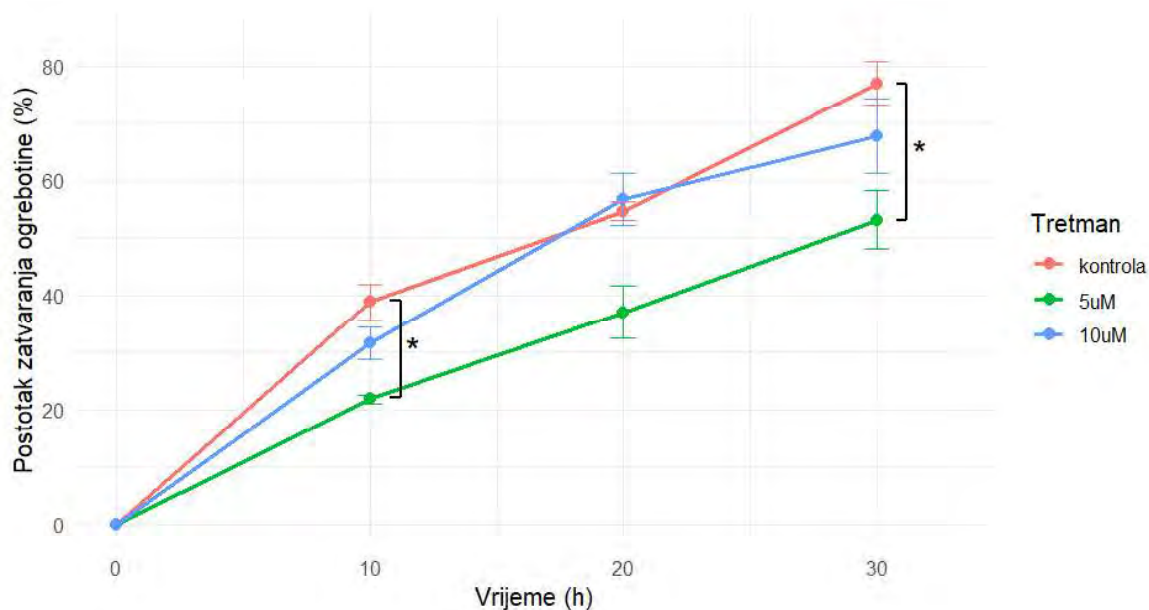
#### 5.7.4 Procjena migracijske sposobnosti AGS stanica

Utjecaj 4-HNE na migracijsku sposobnost AGS stanica procijenjen je praćenjem postotka zatvaranja ogrebotine tijekom vremena. Reprezentativni mikrofotografski prikazi pokazuju progresivno zatvaranje ogrebotine u svim eksperimentalnim skupinama, uz vidljivo sporiju dinamiku migracije u skupinama tretiranim 4-HNE-om u odnosu na kontrolu (Slika 36).



Slika 36. Reprezentativne mikrofotografije testa ogrebotine AGS stanica u kontrolnoj skupini i nakon tretmana s 4-HNE-om (5 i 10  $\mu$ M) u vremenskim točkama 0, 10, 20 i 30 sati.

Kvantitativna analiza temeljila se na izračunu postotka zatvaranja ogrebotine, izraženog kao relativna promjena površine bez stanica u odnosu na početno stanje za svako pojedino vidno polje. U svim skupinama uočen je očekivani trend povećanja postotka zatvaranja ogrebotine kroz vrijeme, što odražava progresivnu migraciju stanica (Slika 37).

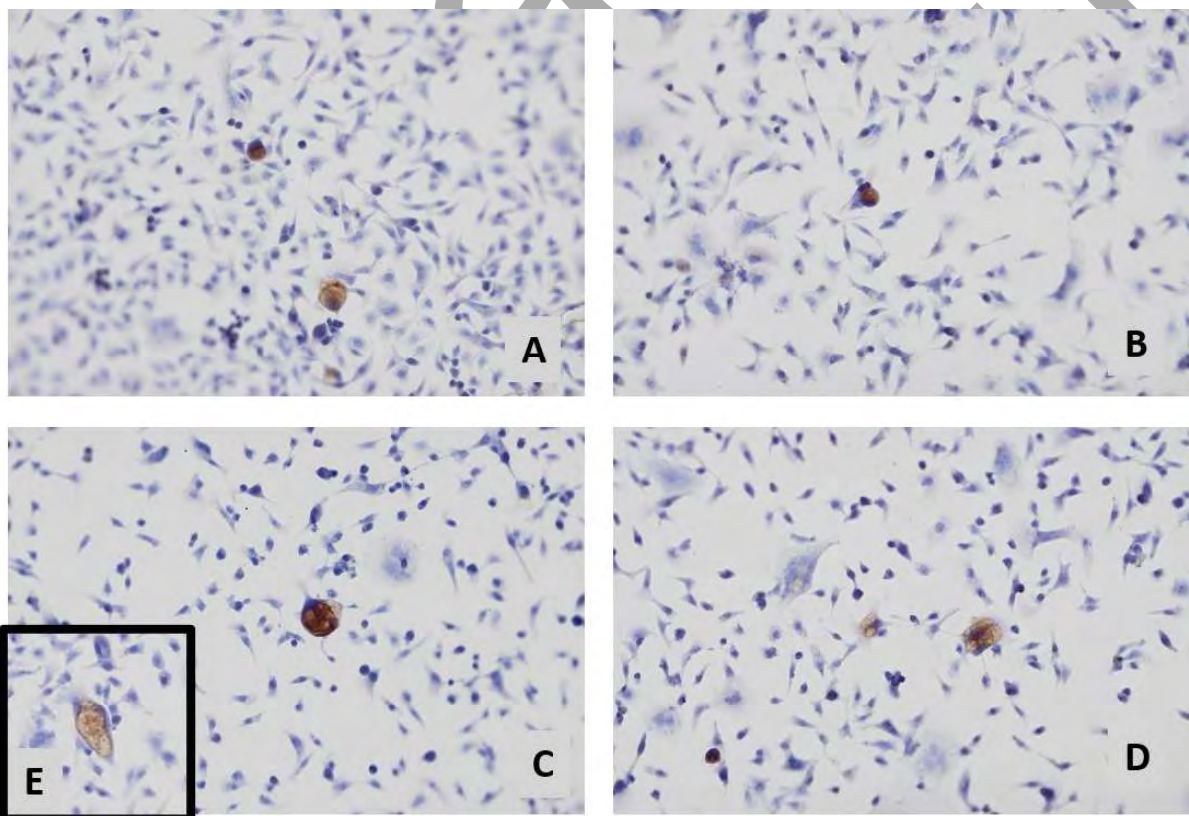


Slika 37. Postotak zatvaranja ogrebotine kroz vrijeme u kontrolnoj skupini i skupinama tretiranim s 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  4-HNE. Podaci su normalizirani na početno stanje za svako vidno polje i prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SE. Prikazane su značajne razlike između kontrolne skupine i skupine tretirane s 5  $\mu\text{M}$  4-HNE u 10. i 30. satu inkubacije (\*  $p < 0,05$ ).

Usporedba između tretmana pokazala je statistički značajne razlike u pojedinim vremenskim točkama. U 10. satu uočena je značajna razlika između skupina (Kruskal–Wallis,  $p = 0,01$ ), pri čemu je post hoc analizom utvrđeno da skupina tretirana s 5  $\mu\text{M}$  4-HNE pokazuje značajno manji postotak zatvaranja ogrebotine u odnosu na kontrolu (Dunn test, Holm korekcija,  $p = 0,01$ ), što upućuje na smanjenu migracijsku sposobnost stanica. Sličan obrazac zabilježen je i u kasnijim vremenskim točkama. U 20. satu globalna razlika između skupina bila je granično značajna ( $p = 0,049$ ), bez statistički značajnih razlika u post hoc analizama (kontrola vs. 5  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0,08$ ). U 30. satu ponovno je utvrđena značajna razlika između skupina ( $p = 0,037$ ), pri čemu je skupina tretirana s 5  $\mu\text{M}$  4-HNE imala značajno manji postotak zatvaranja ogrebotine u odnosu na kontrolu ( $p = 0,03$ ). Za koncentraciju od 10  $\mu\text{M}$  nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu u pojedinim vremenskim točkama, iako je uočen trend sporijeg zatvaranja ogrebotine. Analiza sažetih pokazatelja migracije pokazala je djelomično podudarne rezultate. Nagib linearne regresije promjene postotka zatvaranja ogrebotine kroz vrijeme nije se značajno razlikovao između skupina ( $p = 0,10$ ). Nasuprot tome, analiza površine ispod krivulje (AUC) pokazala je statistički značajnu razliku između skupina ( $p = 0,02$ ), pri čemu je skupina tretirana s 5  $\mu\text{M}$  4-HNE imala značajno niže vrijednosti u odnosu na kontrolu ( $p = 0,022$ ), što potvrđuje smanjenu ukupnu migracijsku aktivnost kroz vrijeme.

### 5.7.5 Imunocitokemijska analiza COX-2 u kulturi AGS stanica

Imunocitokemijska analiza izražaja COX-2 provedena je primjenom dvaju monoklonskih protutijela (SP21 i CX-294). U svim analiziranim jažicama, neovisno o tretmanu 4-HNE-om, uočena je slabo izražena citoplazmatska imunoreaktivnost ograničena na pojedinačne stanice. Udio pozitivnih stanica bio je manji od 1 % te nije uočena razlika između tretiranih i netretiranih uzoraka (Slika 38). Negativne kontrole pokazivale su sporadičnu reaktivnost pojedinačnih stanica, što upućuje na nespecifičnu pozadinsku reakciju. S obzirom na izrazito nisku učestalost pozitivnih stanica i izostanak razlike između skupina, nije provedena kvantitativna statistička analiza. Parafinski kontrolni rezovi poznatih COX-2 pozitivnih uzoraka, obrađeni bez toplinski induciranog otkrivanja antigena, pokazali su očuvanu, ali slabijeg intenziteta imunoreakciju u odnosu na standardni protokol s „otkrivanjem“ antigena. Niska razina detektiranog izražaja može biti posljedica ograničene osjetljivosti metode ili potrebe za duljom inkubacijom kako bi se uočile promjene u izražaju COX-2. Dobiveni nalazi upućuju na to da u promatranim uvjetima 4-HNE ne inducira detektabilnu promjenu COX-2 izražaja na razini imunocitokemije.



Slika 38. Imunocitokemijska analiza izražaja COX-2 u AGS staničnoj kulturi (20x); A) AGS stanice bez tretmana, bojenje protutijelom protiv COX-2 (klon CX-294). B) AGS stanice tretirane 4-HNE-om, klon CX-294. C) AGS stanice bez tretmana, bojenje protutijelom SP21. D) AGS stanice tretirane 4-HNE-om, klon SP21. bojenja. Uokvireni kvadratić E) Negativna kontrola (izostavljeno primarno protutijelo).

## 6 RASPRAVA

### 6.1 Uvodna razmatranja

Ova retrospektivna studija temeljena je na analizi histoloških uzoraka želučane sluznice duž morfološki definiranih stadija Correa kaskade: uredna sluznica, atrofija, intestinalna metaplazija, kombinacija atrofije i intestinalne metaplazije, displazija te intestinalni tip karcinoma želuca. Odabir dijagnostičkih kategorija u ovom istraživanju temeljen je na rezultatima pilot-studije u kojoj je analiziran izražaj COX-2 (klon CX-294) i produkata lipidne peroksidacije (4-HNE i akrolein) duž Correa kaskade želučane karcinogeneze. Rezultati te studije pokazali su da kronični gastritis, neovisno o *H. pylori* statusu, predstavlja relativno rani i morfološki udaljen stadij, bez jasno diferenciranog obrasca izražaja COX-2 u usporedbi s atrofičnim promjenama i intestinalnom metaplazijom. Također, u pilot-studiji normalna želučana sluznica, kronični gastritis i intestinalna metaplazija pokazivali su ujednačen membranski obrazac COX-2 bojenja, dok su ključne promjene postajale izraženije u atrofičnim lezijama s intestinalnom metaplazijom te osobito u intestinalnom tipu karcinoma želuca. S obzirom na to da je primarni cilj ovog istraživanja bio detaljnije analizirati promjene izražaja i lokalizacije COX-2 u prijelaznoj zoni između intestinalne metaplazije, displazije i invazivnog karcinoma, fokus je usmjeren na lezije s većim biološkim potencijalom za progresiju. U tom kontekstu, uključivanje kroničnog gastritisa ne bi značajno povećalo diskriminacijsku vrijednost analize, dok bi dodatno povećalo heterogenost uzorka. Nadalje, pilot-studija je provedena uporabom jednog monoklonskog protutijela za COX-2 (klon CX-294), što predstavlja metodološko ograničenje, osobito u kontekstu uočenih promjena subcelularne lokalizacije i potpunog gubitka bojenja u dijelu karcinoma. Budući da modifikacije proteina povezane s oksidacijskim i nitrozativnim stresom (uključujući 4-HNE-PA i akrolein proteinske adukte) potencijalno mogu utjecati na dostupnost epitopa, u ovom je istraživanju uveden dodatni COX-2 klon radi validacije opaženih obrazaca bojenja. Uporabom dvaju neovisnih protutijela omogućena je robusnija interpretacija promjena u izražaju i lokalizaciji COX-2 te je smanjena vjerojatnost lažno negativnih nalaza povezanih s klonskom specifičnošću. Ograničavanjem broja dijagnostičkih kategorija postignuta je metodološki homogenija raspodjela uzoraka, veća statistička snaga unutar pojedinih skupina te racionalnija uporaba imunohistokemijskih reagensa i laboratorijskih resursa. U skladu s ograničenjima pilot-studije, u kojoj displazija nije bila zastupljena, u ovom je istraživanju displazija dodatno uključena kao ključni prijelazni stadij u Correa kaskadi, dok je kronični gastritis svjesno isključen iz konačne analize.

U ovom istraživanju analizirana je povezanost nakupljanja biomarkera lipidne peroksidacije i izražaja enzima COX-2 duž stadija Correa kaskade koji predstavljaju patogenetski slijed razvoja intestinalnog tipa karcinoma želuca. Rezultati su pokazali da se izražaj i subcelularna lokalizacija pojedinih biomarkera

mijenjaju fazno-specifično tijekom progresije bolesti, pri čemu su promjene bile povezane s prijelazom od uredne sluznice preko prekanceroznih stanja do displazije i invazivnog karcinoma. Posebno se istaknulo rano povećanje citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA u metaplastičnim i displastičnim lezijama, promjena subcelularne lokalizacije COX-2 procijenjene klonom CX-294 te povezanost aberantnog izražaja ili jezgrene lokalizacije detekirane klonom SP21 gotovo isključivo s karcinomima. Multivarijantni modeli progresije dodatno su pokazali da biomarkeri zadržavaju visoku diskriminacijsku sposobnost i nakon analiza osjetljivosti, što upućuje na njihovu stabilnu povezanost s procesom maligne transformacije želučane sluznice.

## 6.2 Kliničko-patološka obilježja ispitanika i Correa kaskade

Prosječna dob ispitanika u našem uzorku iznosila je 67 godina, dok su bolesnici s karcinomom želuca bili značajno stariji (72 godine), što je u skladu s podacima Registra za rak Republike Hrvatske (2). U našem je uzorku zabilježena statistički značajna razlika u dobi između skupine s histološki urednom sluznicom i bolesnika s karcinomom želuca. Takva razlika predstavlja očekivano metodološko ograničenje studija ovog tipa, budući da je u kliničkoj praksi relativno rijetko pronaći starije osobe s potpuno histološki urednom želučanom sluznicom. Nakon isključivanja skupine uredne sluznice iz usporedbe, dobna razlika između preostalih skupina Correa kaskade više nije bila prisutna, što upućuje na relativno dobru dobnu uravnoteženost analiziranih stadija želučane karcinogeneze. Iako je u istoj analizi uočena razlika u distribuciji spola, post hoc usporedbe nisu pokazale značajne razlike između pojedinih skupina. U skladu s očekivanjima, bolesnici s karcinomom želuca pokazivali su i značajno više vrijednosti CRP te N/L omjera, dvaju dobro poznatih pokazatelja sustavnog upalnog odgovora. Iako su razlike između pojedinih skupina bile najuočljivije u usporedbi karcinoma s displazijom te, u slučaju CRP-a, i s intestinalnom metaplazijom, dodatna analiza monotonog trenda pokazala je da oba parametra pokazuju kontinuirani porast kroz stadije Correa kaskade. Važno je naglasiti da je taj trend ostao statistički značajan i nakon isključenja urednih uzoraka, što upućuje na to da porast sustavnih upalnih markera ne odražava samo razliku između normalne i patološki promijenjene sluznice, već progresivno pojačavanje upalnog odgovora unutar samih stadija bolesti. S druge strane, histološka analiza „lokalne“ upalne aktivnosti pokazuje nešto drugačiji obrazac. Najizraženija komponenta aktivne upale zabilježena je u skupini s atrofijom, dok su skupine s intestinalnom metaplazijom i atrofičnim promjenama pokazivale nešto višu, iako statistički neznačajnu razinu aktivne upale u odnosu na displaziju i karcinom. Ovi nalazi upućuju na mogućnost da lokalna upalna aktivnost sluznice može doprinijeti povišenju sustavnih upalnih markera u ranijim stadijima Correa kaskade, dok bi u kasnijim stadijima moglo doći do ograničavanja i suprimiranja lokalnog upalnog odgovora te posljedičnog razdvajanja lokalnog i sustavnog upalnog odgovora. Naime, displazija i karcinom pokazuju relativno

nisku razinu aktivne upale u samoj sluznici, a navedeno može biti posljedica stjecanja obilježja izbjegavanja imunološkog raspoznavanja i destrukcije od strane tumorskih stanica (89). U slučaju karcinoma, povišeni sustavni upalni markeri vjerojatnije odražavaju destruktivni rast tumora, invaziju okolnih struktura i sistemski odgovor domaćina, nego „širenje“ lokalne upale ograničene na *lamina propriju* želučane sluznice. Ostali analizirani čimbenici nisu pokazali statistički značajne razlike između skupina Correa kaskade, uključujući pušenje, primjenu NSAID, serumsko željezo i infekciju *H. pylori*. Međutim, dodatna analiza monotonog trenda pokazala je da serumsko željezo pokazuje značajan opadajući trend kroz stadije bolesti, što upućuje na moguće postupne metaboličke promjene povezane s progresijom karcinogeneze. Iako razlike između pojedinih skupina nisu dosegnule statističku značajnost u globalnoj usporedbi, ovaj nalaz naglašava važnost analize trenda u detekciji suptilnih, ali konzistentnih promjena. Ipak, navedeni nalaz dodatno je ograničen velikim udjelom nedostajućih vrijednosti za ovaj parametar (103/148; 69,6 %), što značajno smanjuje statističku snagu analize. Velik broj nedostajućih podataka može se objasniti činjenicom da se određivanje serumskog željeza ne provodi rutinski kod svih bolesnika upućenih na gastrokopiju. Dodatno, dio uzoraka potječe iz razdoblja pandemije bolesti COVID-19, kada je opseg laboratorijskih pretraga bio smanjen na nužni minimum (129). Nepostojanje statistički značajnih razlika za većinu analiziranih varijabli upućuje na relativno dobru uravnoteženost uzorka između skupina uključenih u analizu, što smanjuje vjerojatnost da su uočeni rezultati posljedica neravnomjerne raspodjele osnovnih kliničkih čimbenika.

### 6.3 Izražaj i subcelularna lokalizacija COX-2 tijekom progresije Correa kaskade

Nakon razmatranja osnovnih kliničkih i laboratorijskih obilježja ispitanika, sljedeći korak analize bio je usmjeren na procjenu izražaja ispitivanih biomarkera duž histoloških stadija Correa kaskade. Budući da je COX-2, ključni enzim u sintezi prostaglandina iz arahidonske kiseline, jedan od glavnih regulatora upale i potencijalni medijator tumorske progresije, posebna je pozornost usmjerena na analizu njezina imunohistokemijskog izražaja u različitim stadijima želučane karcinogeneze. Imunohistokemijska analiza COX-2 u ovom je istraživanju provedena primjenom dvaju različitih klonova protutijela (SP21 i CX-294) zbog poznatih razlika u njihovoj osjetljivosti i specifičnosti vezanja. COX-2 protein sastoji se od 604 aminokiseline, a pojedini klonovi prepoznaju različite epitope unutar njegove strukture. Klon SP21 prepoznaje širi odsječak C-terminalnog dijela proteina (aminokiseline 513-604), što mu osigurava veću osjetljivost i omogućuje detekciju i pri nižim razinama izražaja. Nasuprot tome, klon CX-294 prepoznaje kraći epitop (aminokiseline 580-598), što rezultira manjom osjetljivošću, ali većom specifičnošću za COX-2 (130).

### 6.3.1 COX-2 detektiran klonom CX-294: alteracija membranske lokalizacije

Imunohistokemijska analiza izražaja proteina COX-2 primjenom klona CX-294 pokazala je jasnu promjenu subcelularne lokalizacije proteina kroz histološke stadije Correa kaskade. U ranim stadijima, uključujući urednu sluznicu i intestinalnu metaplaziju, prevladavao je membranski obrazac bojenja, dok je u uznapredovalim lezijama, osobito u displaziji i karcinomu, uočen gubitak membranske lokalizacije uz pojavu citoplazmatsko/perijezgrenog izražaja. Dodatna analiza primjenom četverostupanjske klasifikacije omogućila je preciznije razlučivanje bazalne i luminalne membranske lokalizacije te je pružila dodatnu informaciju u semikvantitativnoj procjeni membranskog obrasca bojenja. Dok je u urednoj sluznici prevladavalo bazalno membransko bojenje, u intestinalnoj metaplaziji, uz bazalno, zabilježeno je i pomak pozitiviteta u dijelu bazolateralne membrane bliže unutarnjoj površini (lumen) želuca. Takav obrazac znači da je epitelna stanica duž cijele duljine stanične membrane, sve do luminalne površine, pozitivna na COX-2, što bi moglo upućivati na veći izražaj COX-2 u odnosu na uzorke uredne sluznice i većinu uzoraka atrofije. Nasuprot tome, u stadijima displazije i karcinoma četverostupanjska klasifikacija nije donijela dodatne razlike u odnosu na trostupanjsku analizu. Nadalje, metodološki izazovi pri evaluaciji najčešće su se javljali u uzorcima koji su sadržavali istodobno intestinalnu metaplaziju i atrofične promjene. U takvim slučajevima dijelovi epitela s intestinalnom metaplazijom često su pokazivali jasno izraženo membransko bojenje, dok su dijelovi epitela bez metaplazije, ali s pridruženom atrofijom antralnih žlijezda, često pokazivali slabiji bazalni ili negativan obrazac bojenja. Dodatnu evaluacijsku poteškoću predstavljao je i prostorni gradijent bojenja unutar istog uzorka, pri čemu su površinske epitelne stanice i antralne žlijezde (koje su služile kao pozitivna kontrola) bile jasno obojene, dok su foveolarne epitelne stanice često bile gotovo potpuno negativne. Unatoč navedenim evaluacijskim poteškoćama, rezultati ove studije jasno ukazuju na karakterističan obrazac promjene izražaja COX-2 detektirane klonom CX-294 duž Correa kaskade: najprije pojačan membranski izražaj u stadiju intestinalne metaplazije, a zatim gotovo potpuni gubitak membranskog obrasca u kasnijim stadijima, osobito u displaziji i karcinomu, gdje se pojavljuje citoplazmatsko/perijezgreno bojenje, i to u pravilu u manjem udjelu tumorskih stanica.

### 6.3.2 COX-2 detektiran klonom SP21: citoplazmatski izražaj i jezgrena redistribucija

S druge strane, izražaj COX-2 procijenjen primjenom klona SP21 primarno je obilježen citoplazmatskim obrascem bojenja. Imunohistokemijska analiza, jednako kao i kod klona CX-294, pokazala je značajne razlike u razini izražaja između pojedinih histoloških stadija Correa kaskade. Najniže vrijednosti zabilježene su u urednoj želučanoj sluznici, dok su najviše razine izražaja uočene u prekanceroznim stanjima, osobito u intestinalnoj metaplaziji te u intestinalnoj metaplaziji udruženoj s atrofijom. U uznapredovalim lezijama Correa kaskade, odnosno u displaziji i karcinomu, uočen je pad medijanskih vrijednosti citoplazmatskog izražaja u odnosu na prekancerozne lezije, uz istodobno povećanje raspona

vrijednosti, osobito u karcinomima. Drugim riječima, izražaj COX-2 značajno raste u epitelnim stanicama kronično promijenjene želučane sluznice u odnosu na urednu sluznicu, dok se tijekom maligne transformacije uočava djelomičan pad izražaja. Međutim, ta razina ne pada na bazalne vrijednosti uredne sluznice, već ostaje umjereno povišena. Istodobno, u tumorskom tkivu uočena je uočljiva heterogenost izražaja COX-2, pri čemu pojedini tumori zadržavaju visoku razinu izražaja, dok je u drugima on ipak znatnije smanjen. Osim citoplazmatskog izražaja, analizirana je i jezgrena lokalizacija COX-2. Jezgrena pozitivnost bila je rijetka ili potpuno odsutna u neinvazivnim promjenama i lezijama želučane sluznice te nije zabilježena u urednoj sluznici, atrofiji niti u intestinalnoj metaplaziji. U displazijama je jezgreno bojenje uočeno samo sporadično, dok je u karcinomima zabilježeno u gotovo polovici analiziranih uzoraka. Ovakva raspodjela upućuje na to da se jezgrena redistribucija COX-2 pojavljuje se tek u kasnijim stadijima Correa kaskade te je uglavnom povezana s invazivnim karcinomima želuca. Pojava jezgrene lokalizacije COX-2 može odražavati promjene u signalizacijskim mehanizmima i regulaciji izražaja ovog enzima tijekom maligne transformacije (131).

### 6.3.3 COX-2 u stadijima Correa kaskade: usporedba s literaturom

Dobiveni rezultati djelomično su u skladu s nalazima ranijih istraživanja, iako usporedba s literaturom nije uvijek jednostavna zbog razlika u korištenim imunohistokemijskim protutijelima, detektiranim obrascima bojenja i kriterijima evaluacije bojenja što je prikazano u Dodatku u Tablici D8. Većina dosadašnjih studija opisuje isključivo citoplazmatski obrazac imunohistokemijskog bojenja COX-2 (94,102,103,107,108,110,111,118,132) što je u skladu s rezultatima ove studije vezanim uz klon SP21. U pojedinim istraživanjima zabilježen je uz citoplazmatski i perijezgreni odnosno jezgreni obrazac (47,96,98,101,105,115–117), dok je membranski obrazac bojenja, karakterističan za klon CX-294 u urednoj sluznici i prekanceroznim stanjima u ovoj studiji, opisan tek u jednoj studiji (133) (Dodatak Tablica D9). U većini ostalih studija različiti obrasci bojenja smatrani su jednostavno pozitivnim nalazom ili subcelularna lokalizacija nije detaljnije analizirana. Rezultati navedenih studija pokazuju da epitelne stanice uredne, zdrave želučane sluznice u većini istraživanja imaju nizak intenzitet imunohistokemijskog bojanja ili uopće ne pokazuju bojanje (60,94,98,108,132), kao i histološki uredno peritumorsko tkivo (96,112,133,134), a često i duboke žlijezde (105). Ipak, iako nekoliko studija pokazuje različit udio pozitivnosti epitelnih stanica na COX-2 u zdravoj i peritumorskoj urednoj sluznici (101,102,107,115), i u *H. pylori* pozitivnim i u *H. pylori* negativnim slučajevima (99,110), ti udjeli su uvijek značajno niži od onih u karcinomu. Navedeno je većim dijelom u skladu s rezultatima ovoga istraživanja provedenoga klonom SP21. Važno je spomenuti i brojna istraživanja provedena na uzorcima gastritisa koja su pokazala neujednačene rezultate pa se udio analiziranih uzoraka s COX-2 pozitivnim epitelom kreće se od 10 % (47,117) do 70 % (110) i 85 % (116) u *H. pylori* pozitivnom gastritisu te od 10 % (117) i 14 % (60) do 49 % (110) i 83 % (116) u *H. pylori* negativnom kroničnom gastritisu. U ovom

istraživanju uzorci gastritisa nisu analizirani kao zasebna skupina. Naime, u pilot-studiji koja je prethodila ovom istraživanju uočeno je da je membranski obrazac bojenja COX-2 (klon CX-294) prisutan u svim uzorcima histološki uredne sluznice, kao i u uzorcima kroničnog i kroničnog aktivnog gastritisa, neovisno o statusu infekcije *H. pylori*, te također u uzorcima intestinalne metaplazije. Takav nalaz sugerira da membranski izražaj COX-2 u ranim upalnim promjenama želučane sluznice ima ograničenu diskriminativnu vrijednost. Iako kronični gastritis predstavlja važan upalni kontekst u kojem započinje proces želučane karcinogeneze, daljnja progresija Correa kaskade obilježena je prvenstveno morfološkim promjenama sluznice, osobito razvojem atrofičnih promjena i intestinalne metaplazije. S obzirom na to da je u ovoj studiji veći naglasak stavljen na razlučivanje prekanceroznih stanja i prekanceroznih lezija, osobito na prijelaz prema displaziji i karcinomu, a ne na identifikaciju potencijalno „rizičnih“ oblika gastritisa, uzorci gastritisa nisu obuhvaćeni analizom. U uzorcima s izraženom atrofijom dostupna literatura pruža konzistentnije rezultate. U epitelu atrofične sluznice zabilježen je izražaj COX-2 (108), a udio pozitivnih slučajeva u različitim studijama kreće se od približno 36 % (47,117) do 41 % (60). Pritom je u pojedinim istraživanjima zabilježen je viši udio pozitivnosti u *H. pylori* pozitivnim slučajevima (44 %) u odnosu na *H. pylori* negativne (20 %) (117), što upućuje na moguću povezanost izražaja COX-2 s upalnim odgovorom uzrokovanim infekcijom *H. pylori*. Takav nalaz u skladu je s rezultatima dobivenim bojanjem klonom SP21 u ovom istraživanju. Nasuprot tome, rezultati dobiveni klonom CX-294 pokazali su uglavnom izostanak (tj. gubitak membranskog obrasca) bojenja u uzorcima s atrofijom, neovisno o prisutnosti intestinalne metaplazije.

Sljedeći stadij Correa kaskade jest intestinalna metaplazija, u kojoj je u većini studija zabilježen imunohistokemijski izražaj COX-2 u epitelnim stanicama (98,108,111). Udio pozitivnih slučajeva u različitim istraživanjima kreće se od približno 30 % (101) i 38 % (47,117) do 63 % (60) pa sve do 100 % (116). Iznimku predstavlja studija Lazăr i sur., u kojoj je zabilježeno svega 9 % pozitivnih slučajeva, no autori su analizirali intestinalnu metaplaziju u neposrednoj blizini karcinoma (105). Što se tiče statusa infekcije *H. pylori* u intestinalnoj metaplaziji, rezultati su također neujednačeni. Sun i sur. opisali su znatno viši izražaj COX-2 u *H. pylori* pozitivnim slučajevima (86 %) u odnosu na *H. pylori* negativne (16 %) (117). Nasuprot tome, druga studija nije pokazala značajnu razliku, s gotovo jednakom raspodjelom pozitivnosti u *H. pylori* pozitivnim (80 %) i negativnim slučajevima (78 %) intestinalne metaplazije (110). Nadalje, Sung i sur. navode da su svi analizirani slučajevi intestinalne metaplazije bili pozitivni na COX-2, pri čemu je u prisutnosti infekcije *H. pylori* zabilježen snažniji izražaj u epitelnim stanicama. U istoj studiji stromalne stanice pokazivale su sličan intenzitet bojenja neovisno o statusu infekcije (108). Kada se rezultati naše studije promatraju u kontekstu dostupne literature, može se uočiti da intestinalna metaplazija predstavlja stadij Correa kaskade s najintenzivnijim izražajem proteina COX-2. U našem istraživanju taj je obrazac bio konzistentan za oba analizirana klona protutijela, što je u skladu s većinom

prethodnih studija koje također opisuju visoku razinu izražaja COX-2 u metaplastičnom epitelu. Jedina značajnija iznimka u literaturi je istraživanje Lazara i sur., u kojem je zabilježen znatno niži udio pozitivnih uzoraka intestinalne metaplazije (105). Međutim, važno je naglasiti da se u toj studiji radilo o metaplaziji u neposrednoj blizini karcinoma. Takvo tkivo može već sadržavati određene biokemijske i molekularne promjene povezane s tumorskim mikrookruženjem, iako te promjene još nisu morfološki vidljive u obliku displastičnih obilježja. Stoga je moguće da takva "peritumorska" metaplazija ne odražava u potpunosti biološke karakteristike metaplazije koja se razvija kao zaseban stadij u progresiji Correa kaskade. Analiza utjecaja infekcije *H. pylori* u ovom istraživanju nije pokazala statistički značajnu razliku u izražaju COX-2 između *H. pylori* pozitivnih i negativnih uzoraka intestinalne metaplazije. Ovakav nalaz vjerojatno je posljedica već vrlo visoke bazalne razine izražaja COX-2 u metaplastičnom epitelu, zbog čega dodatni upalni poticaj povezan s infekcijom *H. pylori* ne rezultira jasno izraženom razlikom između skupina. S druge strane, *H. pylori* negativni uzorci ne moraju odražavati stvarni status infekcije, jer je želučana sluznica promijenjena u smjeru intestinalne metaplazije nepovoljna za kolonizaciju ovom bakterijom, zbog čega ju u takvim slučajevima često nije moguće detektirati imunohistokemijskim metodama (135). Povišen izražaj COX-2 u intestinalnoj metaplaziji vjerojatno odražava stabilno kronično upalno mikrookruženje, u skladu s literaturom (136). Navedenu interpretaciju dodatno podupire skupina rezultata ovoga rada u kojoj je izražena statistički značajna umjerena pozitivna povezanost između histološki procijenjene aktivnosti kronične upale i razine izražaja COX-2, a koja je zabilježena neovisno o stadiju Correa kaskade. Takvo stanje kronične upalne aktivacije stvara mikrookruženje u kojem iscrpljivanje antioksidacijskih obrambenih mehanizama omogućuje nakupljanje oksidativno induciranih molekularnih oštećenja te povećava rizik maligne transformacije epitela. U ovom je istraživanju dodatno izdvojena skupina uzoraka koja obuhvaća istodobnu prisutnost atrofije i intestinalne metaplazije, što predstavlja čest histološki nalaz u kliničkoj praksi. Imunohistokemijskim bojenjem klonom SP21 ovi su uzorci pokazali vrlo visok izražaj proteina COX-2, što je u skladu s prethodno opisanim nalazima za atrofiju i intestinalnu metaplaziju zasebno. Nasuprot tome, klon CX-294 pokazao je obrazac bliži onome uočenom u atrofiji, s približno 50 % negativno obojenih uzoraka. Unatoč tome, u jednom slučaju (4,5 %) zabilježeno je citoplazmatsko/perijezgreno bojenje COX-2, obrazac koji je u ovom istraživanju bio karakterističniji za uznapredovalije stadije Correa kaskade. Takav nalaz mogao bi predstavljati primjer prijelaznog stadija između intestinalne metaplazije i displazije te ilustrirati jedan od ciljeva ovog istraživanja - pokušaj prepoznavanja onih slučajeva metaplazije koji imaju potencijal napredovanja prema displaziji, prvom jasno maligno alteriranom stadiju u progresiji Correa kaskade.

U displastičnoj želučanoj sluznici, slično kao i kod intestinalne metaplazije, u brojnim je studijama zabilježen snažan imunohistokemijski izražaj COX-2 (105,108). Takav obrazac djelomično je u

suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja, u kojem je u displaziji zabilježen blagi pad razine citoplazmatskog izražaja COX-2 detektirane klonom SP21 u odnosu na intestinalnu metaplaziju, iako su vrijednosti i dalje ostale znatno više nego u urednoj želučanoj sluznici. Istodobno se u displaziji prvi put pojavljuje jezgrena lokalizacija COX-2 detektirana klonom SP21, što može upućivati na promjene u subcelularnoj redistribuciji proteina povezane s neoplastičnom transformacijom epitela. Sličan obrazac uočen je i primjenom klona CX-294, pri čemu se u displaziji nešto učestalije (23,8%) pojavljuje citoplazmatsko i perijezgreno bojenje COX-2, obrazac koji je u ovoj studiji također bio povezan s malignom alteracijom epitela. U literaturi se udjeli pozitivnosti u displaziji kreću od oko 42 % (47,117) i 68 % (60) do 80 % i više, pri čemu su više vrijednosti često zabilježene u displaziji visokog gradusa u odnosu na onu niskog gradusa (101). Navedeno je u suprotnosti s ovim istraživanjem gdje nije utvrđena statistički značajna razlika u izražaju COX-2 između uzoraka displazije niskog i visokog stupnja, analiziranih s oba korištena klona protutijela. Povezanost s infekcijom *H. pylori* također je opisana u nekim istraživanjima, gdje je veća učestalost izražaja COX-2 zabilježena u *H. pylori* pozitivnim slučajevima (90 % i 100 %) u odnosu na *H. pylori* negativne (80 % i 13 %) (110,117). U ovom istraživanju takva usporedba nije provedena jer je u skupini displazije zabilježen vrlo mali broj *H. pylori* pozitivnih slučajeva (2/21), što nije omogućilo pouzdanu statističku analizu. Iako Lim i sur. izdvajaju adenom kao zasebnu kategoriju, on se u histopatološkom smislu može smatrati oblikom displazije, pa je u tom kontekstu i snažan izražaj COX-2 u skladu s navedenim nalazima (111).

Progresijom displastičnih promjena dolazi do razvoja invazivnog karcinoma, koji predstavlja završni stadij Correa kaskade. U tom stadiju promjene u izražaju i subcelularnoj lokalizaciji COX-2 postaju još izraženije, što se odražava i u brojnim imunohistokemijskim istraživanjima. Većina studija opisuje umjeren do snažan izražaj COX-2 u približno 60 % ili više slučajeva karcinoma želuca, kako u konvencionalnim histološkim tipovima (intestinalni i difuzni) (47,60,111,112,115–118,132,137,94,96,99,101–103,107,108), tako i u ranim karcinomima (103). Nešto manji udio pozitivnih slučajeva, oko 50 %, zabilježen je u studijama provedenima u Turskoj i Tunisu (133,134). Rezultati ovog istraživanja djelomično su u skladu s navedenim nalazima u kojima je u analiziranim karcinomima želuca intestinalnog tipa zabilježen povišen izražaj COX-2 u odnosu na urednu želučanu sluznicu (94,96,134,136,99,102,107,112,115,118,132,133). Međutim, studije koje su analizirale izražaj COX-2 u različitim stadijima Correa kaskade opisuju dva moguća obrasca promjena. Prema prvom obrascu izražaj postupno raste od uredne sluznice prema displaziji i karcinomu (47,60,101,105,110,117), dok drugi obrazac pokazuje porast izražaja do maksimalnih vrijednosti u intestinalnoj metaplaziji, nakon čega slijedi blagi pad u displaziji i karcinomu (116) (Tablica D10). Rezultati ovog istraživanja bliži su drugom obrascu promjene izražaja, pri čemu je najveća razina izražaja COX-2, detektirana klonom SP21, zabilježena u intestinalnoj metaplaziji, uz blagi pad u displaziji i

tumorskom tkivu. U karcinomima je pritom uočena i izraženija heterogenost izražaja COX-2, pri čemu pojedini tumori zadržavaju visoku razinu izražaja, dok je u drugima on znatno smanjen. S druge strane, prema dostupnoj literaturi, tek dvije studije navode pojavu jezgrene pozitivnosti COX-2. Dok u grupi istraživača Forones i sur. (116) taj obrazac nije bio dodatno analiziran niti interpretiran, u radu Chen i sur. navodi se tranzicija citoplazmatske pozitivnosti prema jezgrenoj pozitivnosti, osobito u karcinomima višeg gradusa (138). U našem istraživanju također je zabilježena jasna promjena subcelularne lokalizacije COX-2 (klon SP21) u smjeru jezgrene pozitivnosti, i to isključivo u maligno alteriranom epitelu želučane sluznice. Jezgreno bojenje bilo je prisutno sporadično u displaziji, dok je u karcinomima zabilježeno u gotovo polovici slučajeva (47,5 %). Također je utvrđeno da tumori s jezgrenim pozitivitetom pokazuju viši citoplazmatski izražaj COX-2 detektiran klonom SP21 u usporedbi s jezgreno negativnim tumorima. Suprotno većini navedenih istraživanja, u našem istraživanju, primjenom klona CX-294, također je zabilježen jasan pomak u obrascu imunohistokemijskog bojenja COX-2. Dok je u intestinalnoj metaplaziji dominirao intenzivan membranski obrazac bojenja, u intestinalnom tipu karcinoma želuca dolazi do promjene prema citoplazmatsko/perijejgrenoj lokalizaciji proteina, zabilježenoj u 57,5 % slučajeva, uz istodobni izostanak bojenja u preostalih 42,5 % uzoraka. Važno je napomenuti da se razlika između jedine studije koja opisuje membransku pozitivnost COX-2 i našeg istraživanja djelomično može objasniti različitim pristupom interpretaciji imunohistokemijskog bojanja. U našem istraživanju membranska pozitivnost identificirana je prvenstveno u urednoj želučanoj sluznici i ranim stadijima Correa kaskade, dok se u uznapredovalim stadijima bilježi postupni gubitak tog obrasca. Nasuprot tome, Ugraš i sur. opisali su membransku pozitivnost u stanicama karcinoma želuca (133), no taj obrazac nisu zasebno analizirali u svojem istraživanju. U njihovoj metodologiji citoplazmatsko i perijejgreno bojenje smatrani su tipičnim obrascem izražaja COX-2, dok je svaka imunoreaktivnost tumorskih stanica, bez definiranog praga pozitivnosti, interpretirana kao pozitivan nalaz. Osim toga, u spomenutoj studiji nije korišten klon CX-294, što može utjecati na prepoznavanje epitopa i time na konačni obrazac imunohistokemijskog bojenja. Takav pristup evaluaciji otežava izravnu usporedbu s našim rezultatima, u kojima je posebna pozornost posvećena razlikovanju subcelularnih obrazaca lokalizacije COX-2 tijekom progresije Correa kaskade. Nadalje, Al-Moundhri i sur. (118) koristili su isto protutijelo kao i u našem istraživanju. Zanimljivo je da je u njihovoj studiji oko 90 % uzoraka karcinoma želuca bilo pozitivno (s najmanje 10 % pozitivnih stanica), dok je u našoj studiji oko 42,5 % uzoraka karcinoma bilo potpuno negativno (gubitak COX-2 bojanja). Dio razlika među ovim rezultatima može se objasniti i različitim razrjeđenjem primarnog protutijela s obzirom na to da je u navedenoj studiji korišteno protutijelo CX-294 u razrjeđenju 1:50, dok je u našem istraživanju primijenjeno razrjeđenje 1:100. Rezultati o izražaju COX-2 u stromalnim stanicama također su heterogeni. Dok neke studije navode odsutnost izražaja u stromi karcinomskog tkiva (96,115), druge opisuju mješovite negativne i pozitivne rezultate (105), a pojedini autori bilježe i

jasnu pozitivnost stromalnih stanica (111). Van Rees i sur. zaključili su da se pozitivnost stromalnih stanica, uključujući makrofage, miofibroblaste i druge stromalne elemente, povećava paralelno s porastom izražaja COX-2 u epitelu (101). U ovom istraživanju stromalne stanice nisu bile predmet zasebne kvantitativne analize, budući da je primarni fokus bio na izražaju COX-2 u epitelnim stanicama duž Correa kaskade, međutim, pozitivnost makrofaga u stromi korištena je kao interna pozitivna kontrola imunohistokemijskog bojanja za oba korištena klona.

#### 6.3.4 Metodološki čimbenici koji utječu na interpretaciju COX-2 imunohistokemije

Treba naglasiti da heterogenost rezultata u analiziranim studijama, kao i u našem istraživanju, može biti posljedica više metodoloških čimbenika. Kao što je već navedeno, jedan od važnih izvora varijabilnosti jest uporaba različitih protutijela za detekciju COX-2, često proizvedenih od različitih proizvođača. Poliklonska protutijela predstavljaju antiserum koji sadrži više molekularnih vrsta protutijela usmjerenih protiv različitih epitopa istog antigena, zbog čega često daju izraženiju nespecifičnu pozadinu u usporedbi s monoklonskim protutijelima (139). S druge strane, iako monoklonska protutijela pokazuju visoku specifičnost prema određenom epitopu, ni ona nisu apsolutno specifična jer i drugi proteini mogu sadržavati križno-reaktivne epitope, što može utjecati na konačni obrazac imunohistokemijskog bojanja (140). Osim izbora protutijela, značajne razlike među studijama proizlaze i iz različitih pristupa interpretaciji imunohistokemijskog bojanja (Dodatak Tablica D8). Većina autora koristi semikvantitativne imunohistokemijske vrijednosti dobivene umnoškom postotka pozitivnih stanica i intenziteta bojanja, ali uz različito definirane pragove pozitivnosti. Manji broj studija temelji evaluaciju isključivo na postotku pozitivnih stanica, dok je u dvije studije svaka imunoreaktivnost tumorskih stanica smatrana pozitivnim nalazom. Rezultati našeg istraživanja upućuju na to da se ključ interpretacije imunohistokemijskog bojanja COX-2, uz kvantitativnu procjenu intenziteta ili udjela pozitivnih stanica, nalazi i u detekciji promjene subcelularnog obrasca lokalizacije navedenog enzima tijekom progresije Correa kaskade.

Promatrajući različite subcelularne lokalizacije proteina u imunohistokemiji, mogu se uočiti različiti obrasci bojanja: (A) citoplazmatsko ili retikularno bojanje, koje odgovara lokalizaciji u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu; (B) perijejzreno bojanje povezano s jezgrenom ovojnicom; (C) membransko bojanje na staničnoj membrani te (D) jezgreno bojanje. Tatsuguchi i sur. ultrastrukturnom analizom elektronskom mikroskopijom pokazali su da citoplazmatski i perijejzreni obrazac COX-2 imunoreaktivnosti odgovara lokalizaciji proteina u endoplazmatskom retikulumu i jezgrenom ovojnicu (98). Takva subcelularna lokalizacija odražava opću biološku karakteristiku COX enzima, koji su membranski proteini endoplazmatskog retikuluma i jezgrene ovojnice, te stoga može poslužiti kao ultrastrukturno objašnjenje sličnih imunohistokemijskih obrazaca u epitelnim stanicama (131). U tom kontekstu, promjena obrasca lokalizacije COX-2 zabilježena u našem istraživanju, osobito

pojava jezgrene pozitivnosti detektirane klonom SP21, može upućivati na promjene u subcelularnoj redistribuciji proteina tijekom progresije Correa kaskade. Iako je većina ranijih studija u karcinomu želuca opisivala dominantno citoplazmatski izražaj COX-2, pojedina istraživanja navode i prisutnost jezgrene lokalizacije. Primjerice, Chen i sur. pokazali su da se COX-2, uz dominantan citoplazmatski izražaj, djelomično lokalizira i u jezgri tumorskih stanica te da s porastom histološkog gradusa dolazi do prijelaza citoplazmatskog u jezgri obrazac izražaja (138). Ovakvi nalazi podupiru pretpostavku da jezgrene redistribucije COX-2 može odražavati promjene u njegovoj funkcionalnoj ulozi tijekom progresije tumora. Sličan fenomen opisan je i u drugim tumorskim sustavima, primjerice u karcinomu mokraćnog mjehura, gdje je jezgri COX-2 povezan s izražajem markera matičnih stanica te potencijalno sudjeluje u regulaciji transkripcijskih procesa povezanih s proliferacijom i diferencijacijom tumorskih stanica (141). Iako je takav obrazac u karcinomu želuca do sada opisan tek u jednoj studiji, nalaz jezgrene redistribucije COX-2 u ovom istraživanju upućuje na moguće slične promjene u signalnim i regulatornim mehanizmima tijekom maligne transformacije želučanog epitela.

Razlike u obrascu imunohistokemijskog bojanja između klonova SP21 i CX-294 mogu se djelomično objasniti razlikama u epitopima koje prepoznaju i u posttranslacijskim modifikacijama proteina COX-2. Pokazano je da klon SP21 prepoznaje S-nitrozilirani oblik COX-2, budući da njegov epitop uključuje cistein 526, mjesto poznato kao cilj S-nitrozilacije, dok klon CX-294 prepoznaje nenitrozilirani oblik proteina (130,142). Eksperimentalne studije provedene na tkivu karcinoma dojke pokazale su da se ove dvije forme COX-2 gotovo ne preklapaju u subcelularnoj lokalizaciji: dok CX-294 (i CX229) dominantno obilježavaju lateralne dijelove plazmatske membrane epitelnih stanica, SP21 primarno označava apikalne i junctionalne regije stanice (130). Takvi nalazi upućuju na različit intracelularni transport i funkciju S-nitroziliranog i nenitroziliranog COX-2. U tom kontekstu, membranski obrazac bojanja detektiran klonom CX-294 u našem istraživanju mogao bi odražavati lokalizaciju nenitroziliranog COX-2 na plazmatskoj membrani epitelnih stanica želučane sluznice. Promjena subcelularne distribucije COX-2 kroz stadije Correa kaskade, obilježena gubitkom membranskog i pojavom citoplazmatsko/perijezgrenog bojanja u displaziji i karcinomu, mogla bi odražavati promjene u intracelularnom transportu i funkcionalnom stanju COX-2 tijekom progresije želučane karcinogeneze. Povećan izražaj COX-2 u intestinalnoj metaplaziji može se dodatno objasniti kontekstom kronične upale i nitrozativnog stresa karakterističnog za želučanu sluznicu zahvaćenu infekcijom bakterijom *H. pylori*. Naime, aktivacija iNOS dovodi do povećane produkcije dušikovog oksida i reaktivnih dušikovih vrsta koje mogu uzrokovati posttranslacijske modifikacije proteina, uključujući S-nitrozilaciju (142–144). Pojačan izražaj spomenutog enzima, detektiran klonom SP21, može odražavati stanje pojačanog nitrozativnog stresa u metaplastičnom epitelu, dok kasniji pad izražaja u displaziji i karcinomu može biti

posljedica promjena u redoks ravnoteži i signalnim putovima tijekom progresije želučane karcinogeneze.

### 6.3.5 Izražaj COX-2 u karcinomu želuca i povezanost s kliničko-patološkim parametrima

Budući da karcinom želuca predstavlja završni stadij Correa kaskade, u nastavku je provedena dodatna analiza u kojoj su slučajevi karcinoma promatrani kao zasebna skupina. Cilj ove analize bio je detaljnije procijeniti raspodjelu izražaja COX-2 u samim tumorima te ispitati njegovu eventualnu povezanost s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma želuca. Dodatno, u ovom radu analizirana je skupina karcinoma zasebno te je utvrđeno kako je u istraživanje uključeno ukupno 40 karcinoma želuca, pri čemu su bolesnici bili starije životne dobi (medijan 73,5 godina), uz izraženu predominaciju muškaraca (77,5%). Među slučajevima s dostupnim podatkom o pT stadiju prevladavali su uznapredovali tumori (pT3-pT4), dok su rani stadiji bili znatno rjeđi. Metastatska bolest bila je prisutna u većini analiziranih slučajeva, što potvrđuje da uzorak obuhvaća pretežito klinički uznapredovale karcinome. Prema stupnju diferencijacije najzastupljeniji su bili umjereno diferencirani tumori, dok su dobro diferencirani i slabo diferencirani tumori činili manji udio uzorka. U pogledu biomarkera, izražaj COX-2 detektiran klonom CX-294 bio je raspodijeljen između negativnog i citoplazmatsko/periježgrenog obrasca, pri čemu je potonji bio nešto češći. Jezgrena lokalizacija COX-2 detektirana klonom SP21 zabilježena je u približno polovici karcinoma. Citoplazmatski izražaj SP21 pokazivao je srednje visoke vrijednosti s relativno širokim rasponom izražaja među pojedinim tumorima, što upućuje na izraženu intratumorsku heterogenost ovih biomarkera. U daljnjim analizama ovoga rada istraživana povezanost izražaja COX-2 s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma želuca nije pokazala statistički značajne razlike. Izražaj COX-2 detektiran klonom CX-294, jezgrena lokalizacija COX-2 detektirana klonom SP21, kao ni citoplazmatski izražaj SP21 nisu bili povezani s pT stadijem, metastatskim statusom niti stupnjem diferencijacije tumora. Budući da su rezultati dosadašnjih istraživanja o povezanosti izražaja COX-2 s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma želuca neujednačeni, dobiveni rezultati se tek djelomično slažu s literaturom. Nekoliko studija i meta-analiza pokazale su povezanost visokog izražaja COX-2 s većom dubinom invazije tumora, dok povezanost s dobi bolesnika, spolom, veličinom tumora ili lokalizacijom tumora uglavnom nije potvrđena (96,100,105,107,112,115,133,134), uz iznimku jedne studije iz Kine koja je zabilježila povezanost s veličinom tumora (107). Podaci o povezanosti s metastatskom bolešću također su kontradiktorni: pojedine studije nisu pronašle takvu povezanost (96,112,134) što je u skladu s rezultatima ove studije, dok su drugi istraživači opisali viši izražaj COX-2 u metastatskim tumorima (99,107,115,137), što je potvrđeno i meta-analizom (100). U jednoj studiji iz Turske povezanost je utvrđena samo s perineuralnom invazijom (133). Rezultati o povezanosti izražaja COX-2 sa stupnjem diferencijacije tumora također su heterogeni. Dok su neke studije opisale viši izražaj COX-2 u dobro diferenciranim karcinomima (96), druge su je povezale s umjereno diferenciranim (134)

ili slabo diferenciranim tumorima (107). Međutim, meta-analiza nije potvrdila značajnu povezanost između izražaja COX-2 i diferencijacije tumora (100), što je u skladu s ranije navedenim rezultatima ovoga rada. Slična nedosljednost zabilježena je i u odnosu na histološki tip karcinoma želuca tako pojedine studije navode viši izražaj COX-2 u intestinalnom u odnosu na difuzni tip (96,103,105,134), dok druge nisu pronašle značajnu razliku između tih histoloških podtipova (60,115). U kontekstu takve heterogenosti literature, rezultati ovog istraživanja, u kojemu nije utvrđena povezanost izražaja COX-2 s analiziranim kliničko-patološkim parametrima, dodatno podupiru pretpostavku da promjene u izražaju i subcelularnoj lokalizaciji COX-2 imaju veću biološku važnost u ranijim stadijima Correa kaskade nego u već formiranom tumorskom tkivu, gdje na izražaj proteina utječe izražena intratumorska heterogenost. Takvi rezultati upućuju na to da u ovom uzorku analizirani biomarkeri nisu povezani s klasičnim prognostičkim parametrima karcinoma želuca, nego vjerojatnije odražavaju biološke procese koji sudjeluju u ranim fazama tumorske progresije. Ipak, izostanak statistički značajne povezanosti treba interpretirati oprezno zbog ograničenog broja karcinoma, nepotpunih podataka o pT stadiju u dijelu slučajeva, moguće intratumorske heterogenosti te razlika u načinu imunohistokemijskog bodovanja COX-2 u odnosu na prethodna istraživanja.

Nakon analize raspodjele izražaja COX-2 u uzorcima karcinoma želuca te njegove povezanosti s klasičnim kliničko-patološkim obilježjima tumora, u skladu s trećim specifičnim ciljem istraživanja, u sljedećem je koraku provedena analiza usmjerena na širi skup epidemioloških, kliničkih i upalnih parametara prikupljenih tijekom istraživanja. Jedina uočena povezanost odnosila se na već ranije opisanu povezanost izražaja COX-2 (detektiranog klonom SP21) s histološki procijenjenom aktivnošću kronične upale, dok za ostale analizirane parametre statistički značajne povezanosti nisu utvrđene. Naime, razina izražaja COX-2 nije bila povezana s dobi bolesnika, serumskom koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP), N/L omjerom niti s koncentracijom željeza u serumu. Također, nije utvrđena povezanost s prisutnošću infekcije bakterijom *H. pylori*, pušenjem kao niti primjenom NSAID. Ovakav obrazac nalaza bio je konzistentan za oba analizirana protutijela, pri čemu za klon CX-294 nije potvrđena ni povezanost s histološki procijenjenom aktivnošću upale. Takav nalaz može upućivati na to da je izražaj COX-2 u želučanoj sluznici prvenstveno odraz lokalnih upalnih i mikrookolišnih procesa u tkivu, koji ne moraju nužno biti praćeni promjenama sistemskih upalnih parametara u perifernoj krvi. Također je moguće da pojedini klinički čimbenici poput pušenja, primjene NSAID-a ili infekcije *H. pylori*, djeluju posredno putem složenijih regulatornih mehanizama signalnih putova uključenih u regulaciju izražajnosti COX-2, zbog čega njihova povezanost s razinom izražaja ovog enzima u presječnim analizama nije uvijek jasno uočljiva.

## 6.4 Oksidacijski stres i uloga 4-HNE tijekom želučane karcinogeneze

### 6.4.1 Citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA duž Correa kaskade

S obzirom na to da kronična upala i nitrozativni stres u želučanoj sluznici potiču stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, sljedeći korak analize bio je usmjeren na procjenu oksidacijskog oštećenja lipida tijekom progresije Correaove kaskade. U tu svrhu analizirana je uloga 4-HNE, jednog od ključnih produkata lipidne peroksidacije i stabilnog markera oksidacijskog stresa u tkivu. Njegova prisutnost procijenjena je imunohistokemijskom detekcijom 4-HNE-PA, primjenom monoklalnog protutijela HNEJ-2 koje se veže za proteine s histidinom u bočnim lancima, specifično prepoznajući epitop 4-HNE-histidin (50). 4-HNE je jedan od najvažnijih reaktivnih aldehida nastalih tijekom lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina staničnih membrana. Kao relativno stabilan produkt oksidacijskog stresa, može reagirati s proteinima, lipidima i DNK te na taj način sudjelovati u regulaciji signalnih puteva povezanih s upalom, proliferacijom i apoptozom. Zbog svoje izražene biološke aktivnosti, 4-HNE se, osim kao marker lipidne peroksidacije, smatra i jednim od ključnih medijatora oksidacijskog oštećenja uključenog u procese kronične upale i tumorske transformacije (74).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajne razlike u intenzitetu citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA duž Correa kaskade. Uzorci uredne sluznice, kao i oni s izraženom izoliranom atrofijom, pokazali su najniže razine bojenja, dok je značajan porast intenziteta zabilježen u stadiju intestinalne metaplazije. Nadalje, razina citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA ostala je visoka i u uznapredovalim lezijama, uključujući displaziju i karcinom, u kojemu se nešto češće nalaze najviše razine 4-HNE-PA, ali bez dodatnog statistički značajnog porasta u odnosu na intestinalnu metaplaziju s ili bez atrofije. Ovaj nalaz u skladu je s rezultatima pilot studije koja je prethodila ovom istraživanju, premda je u toj studiji korištena nešto drugačija metodologija očitavanja, uključujući primjenu poliklalnog protutijela umjesto monoklalnog. Podaci o imunohistokemijskoj analizi nakupljanja 4-HNE-PA u želučanoj sluznici u literaturi su relativno ograničeni. Koliko je poznato, samo su dva istraživanja analizirala raspodjelu 4-HNE-PA u biopsijama želučane sluznice. U tim studijama pokazano je da 4-HNE-PA mogu biti prisutni već u fiziološki urednoj želučanoj sluznici, što upućuje na bazalnu razinu „naprednih završnih produkata“ lipidne peroksidacije u normalnom tkivu. Istodobno je zabilježen značajan porast imunopozitivnosti u upalnim stanjima sluznice, osobito u bolesnika s *H. pylori*-povezanim ulkusom duodenuma, što je protumačeno kao posljedica pojačanog oksidacijskog stresa povezanog s kroničnom aktivnom upalom (145,146). Također, autori jednog od tih istraživanja opisuju i jezgreno nakupljanje 4-HNE-PA u želučanim žlijezdama bolesnika s ulkusnom bolešću, dok takva subcelularna lokalizacija nije bila prisutna u zdravih ispitanika (146). U našem istraživanju jezgrena lokalizacija 4-HNE-PA nije zabilježena, već je jedini detektiran i analiziran obrazac bio citoplazmatsko nakupljanje u epitelnim stanicama želučane sluznice. Razlike u subcelularnoj lokalizaciji mogu biti posljedica različitih patoloških

stanja analiziranih u tim studijama, ali i metodoloških razlika, uključujući različite klonove monoklonalnih protutijela i kriterije evaluacije imunohistokemijskog bojenja. Za razliku od navedenih istraživanja, koja su uspoređivala urednu sluznicu s upalnim lezijama poput ulkusne bolesti, ovo istraživanje omogućilo je analizu dinamike akumulacije završnih produkata lipidne peroksidacije kroz različite stadije Correa kaskade. Kako je već opisano, značajno povećanje citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA uočava se već u ranim premalignim stanjima, osobito u intestinalnoj metaplaziji, bilo da je ona udružena s atrofijom ili ne. Intestinalna metaplazija predstavlja zamjenu želučanog foveolarnog epitela intestinalnim tipom stanica te se najčešće razvija u kontekstu kronične upale želučane sluznice često praćene atrofičnim promjenama te infekcijom bakterijom *H. pylori*, koja predstavlja važan izvor oksidacijskog stresa i vjerojatno doprinosi povećanom stvaranju i koncentraciji 4-HNE. (81). Štoviše, ovaj metaplastični tip epitela vjerojatno predstavlja prilagodbeni odgovor organizma jer može pružiti dodatnu obranu protiv bakterije *H. pylori* kroz promjene u sastavu želučane sluzi koje nastaju kao posljedica metaplazije (11). Uz enterocite i Panethove stanice, u ovom tipu epitela nalaze se i, za njega karakteristične, vrčaste stanice čije citoplazmatske vakuole predstavljaju specifičan morfološki i funkcionalni element metaplastičnog intestinalnog epitela.

#### 6.4.2 Nakupljanje 4-HNE-PA u vrčastim stanicama intestinalne metaplazije

Posebno zanimljiv nalaz ovog istraživanja jest nakupljanje 4-HNE-PA u vakuolama vrčastih stanica u lezijama intestinalne metaplazije i displazije. Ovaj fenomen dodatno je analiziran u odnosu na proširenost intestinalne metaplazije (stupanj metaplazije) te prema podjeli na kompletnu i inkompletnu metaplaziju. Rezultati su pokazali pozitivan trend povećanja nakupljanja 4-HNE-PA u vrčastim stanicama s porastom stupnja intestinalne metaplazije, dok povezanost s citoplazmatskim intenzitetom bojenja nije potvrđena, iako je rezultat bio blizu statističke značajnosti. Međutim, niti citoplazmatsko nakupljanje niti vakuolarno nakupljanje 4-HNE-PA nisu pokazali razliku između kompletne i inkompletne intestinalne metaplazije. Pri interpretaciji ovih rezultata treba uzeti u obzir da je u ovom istraživanju procjena stupnja intestinalne metaplazije vjerojatno pouzdaniji pokazatelj rizika prekanceroznih stanja prema operativnom sustavu procjene intestinalne metaplazije želuca (engl. *Operative Link on Gastric Intestinal Metaplasia Assessment, OLGIM*) (147) nego podjela na kompletnu i inkompletnu metaplaziju. Naime, u većini biopsijskih uzoraka s inkompletnom intestinalnom metaplazijom istodobno se nalaze i područja kompletne metaplazije, što može otežati pouzdano razlikovanje ovih podtipova u rutinskoj histološkoj analizi, osobito u svakodnevnoj praksi opće patologije (148). Dodatno, u ovom istraživanju nisu korištene histokemijske ili imunohistokemijske metode koje bi omogućile precizniju karakterizaciju sastava mucina u vakuolama vrčastih stanica, primjerice razlikovanje sialomucina i sulfomucina (11). Unatoč tome, oba navedena histološka nalaza, prisutnost inkompletne intestinalne metaplazije i visoki stupanj metaplazije, prema suvremenim MAPS

III smjernicama za zbrinjavanje epitelnih prekanceroznih lezija i rane neoplazije želuca, svrstavaju bolesnike u skupinu s povećanim rizikom razvoja karcinoma želuca te predstavljaju indikaciju za aktivno endoskopsko praćenje (6). U tom kontekstu, opaženi trend povećanja vakuolarnog nakupljanja 4-HNE-PA s porastom stupnja intestinalne metaplazije mogao bi ukazivati na potencijalnu kliničku vrijednost ovog nalaza kao dodatnog pokazatelja pojačanog oksidacijskog stresa, a time i biološke aktivnosti lezije te mogućeg rizika progresije prema karcinomu. Ovu pretpostavku dodatno podupire nalaz izraženijeg nakupljanja 4-HNE-PA u vrčastim stanicama u sljedećem stadiju Correa kaskade, odnosno u uzorcima displazije, u usporedbi s uzorcima intestinalne metaplazije s ili bez atrofije. Valja pritom napomenuti da u dijelu uzoraka s displazijom vakuolarno nakupljanje nije bilo zabilježeno, što je vjerojatnije posljedica manje zastupljenosti vrčastih stanica s vakuolama u analiziranim uzorcima nego stvarnog izostanka akumulacije 4-HNE-PA, što predstavlja jedno od ograničenja primjene ove metode u lezijama u kojima vrčaste stanice nisu prisutne. Također, budući da vakuolarno nakupljanje 4-HNE-PA u vrčastim stanicama nije široko opisano u dostupnoj literaturi, ovaj nalaz se smatra eksplorativnim te ga je potrebno potvrditi dodatnim metodama i na većem broju uzoraka.

#### 6.4.3 4-HNE-PA u displaziji i karcinomu želuca

Što se tiče citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA u displaziji u odnosu na ostale stadije Correa kaskade, intenzitet bojenja bio je usporediv s onim zabilježenim u intestinalnoj metaplaziji, a u oba slučaja bio je viši nego u urednoj želučanoj sluznici i uzorcima s atrofijom bez intestinalne metaplazije. Posebno je zanimljiv nalaz izraženijeg citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA u uzorcima displazije visokog gradusa u usporedbi s uzorcima displazije niskog gradusa, iako, detaljnija analiza prikazana u rezultatima nije potvrdila jasnu diskriminacijsku vrijednost ovog nalaza. Ovaj nalaz dobiva dodatno značenje u kontekstu završnog stadija Correa kaskade, invazivnog karcinoma, u kojem su najviše razine citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA zabilježene nešto češće nego u intestinalnoj metaplaziji i displaziji, iako ta razlika nije dosegla statističku značajnost. Takav obrazac mogao bi upućivati na to da daljnje povećanje oksidacijskog stresa, odnosno povišena razina produkata lipidne peroksidacije poput 4-HNE, pridonosi invazivnom potencijalu tumorskih stanica, što je u skladu s literaturom. Naime, pokazano je da oksidacijski stres i produkti lipidne peroksidacije mogu povećati izražaj matriks-metaloproteinaza, osobito MMP-1, čime se osigurava potencijalni mehanizam putem kojeg 4-HNE može modulirati remodeliranje ekstracelularnog matriksa (149). S obzirom na ključnu ulogu MMP u invazivnom rastu tumora, ovakvi nalazi upućuju na moguću povezanost između 4-HNE-PA i invazivnog potencijala karcinoma želuca.

Unatoč navedenom, daljnja analiza nakupljanja 4-HNE-PA u skupini karcinoma pokazala je da citoplazmatska akumulacija ovog markera nije bila značajno povezana s analiziranim kliničko-patološkim karakteristikama tumora. Nisu utvrđene značajne razlike u intenzitetu citoplazmatskog

nakupljanja 4-HNE-PA između ranih i uznapredovalih pT stadija karcinoma, kao niti između metastatskih i nemetastatskih tumora. Jednako tako, razina citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE nije se razlikovala između dobro diferenciranih tumora i skupine umjereno i slabo diferenciranih karcinoma. Ovakvi nalazi djelomično su u suprotnosti s pojedinim istraživanjima koja bilježe povišene razine reaktivnih aldehida, uključujući 4-HNE, u bolesnika s metastatskom bolešću te ukazuju na njihovu moguću ulogu, osim u karcinogenezi, i u progresiji tumora (81,150).

#### 6.4.4 Povezanost 4-HNE-PA s kliničko-patološkim parametrima

Kao i za COX-2, provedena je dodatna analiza citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA u odnosu na kliničko-patološke parametre koja je pokazala da je ovaj biomarker najizraženije povezan s pokazateljima kronične upale i općeg biološkog stresa organizma. Uočena je pozitivna povezanost između intenziteta citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA i dobi bolesnika, što upućuje na postupno povećanje akumulacije produkata lipidne peroksidacije u želučanoj sluznici tijekom starenja. Takav je nalaz u skladu s općim konceptom kumulativnog oksidacijskog oštećenja tkiva koje se povećava s dobi te je povezano s dugotrajnim izlaganjem različitim upalnim i metaboličkim stresorima, ali i smanjenim kapacitetom eliminacije 4-HNE (50,151). Ipak, u našem istraživanju ovakav rezultat može biti djelomično posljedica i strukture analiziranog uzorka. Naime, skupina uzoraka s histološki urednom želučanom sluznicom, u kojoj je zabilježena niža razina nakupljanja 4-HNE-PA, pripadala je statistički značajno mlađim bolesnicima u odnosu na bolesnike s karcinomom želuca, kod kojih su zabilježene najviše razine citoplazmatske akumulacije 4-HNE-PA. Ovakav nalaz treba interpretirati i u kontekstu brze obnove gastrointestinalnog epitela, koji se u fiziološkim uvjetima obnavlja svakih nekoliko dana. Sukladno tome, imunohistokemijski obrazac 4-HNE-PA vjerojatno u većoj mjeri odražava nedavne metaboličke i oksidativne uvjete u sluznici, nego dugotrajnu akumulaciju tijekom života (81). Na taj način se objašnjava mogućnost da razine 4-HNE-PA ovise ne samo o dobi bolesnika, nego i o brzini obnove epitela te koncentraciji 4-HNE u trenutnom mikrookolišu. Dodatno, razina 4-HNE-PA može biti uvjetovana i karakteristikama lokalnog mikrookoliša u koji novoobnovljene epitelne stanice dolaze. Primjerice, u području intestinalne metaplazije, osobito u vrčastim stanicama, uočava se izraženija akumulacija 4-HNE-PA koja neizravno može upućivati i na povećanu koncentraciju slobodnog 4-HNE čije izlučivanje u sluz može stvoriti lokalno okruženje bogato reaktivnim aldehydima. Posljedično, novoformirane epitelne stanice dolaze u neposredan kontakt s takvim mikrookolišem, što može dodatno utjecati na brzo stečenu visoku razinu detektiranih 4-HNE-proteinskih adukata. Uz dob, citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA povezano je i s N/L omjerom, parametrom koji odražava sustavnu upalnu aktivnost. Ovakav odnos dodatno podupire hipotezu da je povećana akumulacija produkata lipidne peroksidacije u želučanoj sluznici povezana s upalnim mikrookruženjem i aktivacijom imunološkog odgovora (152). Ipak, važno je naglasiti da je 4-HNE-PA mjeren lokalno u tkivu, dok N/L

omjer odražava sustavni upalni status. Stoga se uočena povezanost može tumačiti kao odraz međudjelovanja lokalnih i sistemskih upalnih procesa, pri čemu lokalno povećana razina lipidne peroksidacije može biti povezana sa širim upalnim odgovorom organizma, ili pak oba nalaza mogu odražavati djelovanje zajedničkog patofiziološkog procesa. Nadalje, opažena je negativna povezanost između serumskog željeza i razine 4-HNE-PA. Međutim, takav odnos vjerojatno ne odražava izravnu biokemijsku povezanost između ovih parametara, već prije klinički kontekst bolesti. Naime, u bolesnika s teškim gastritisom ili invazivnim karcinomom želuca česta su kronična krvarenja koja dovode do smanjenja razine serumskog željeza, dok su istodobno ta stanja obilježena pojačanim oksidacijskim stresom i povećanom lokalnom akumulacijom produkata lipidne peroksidacije, uključujući 4-HNE. Dodatno, valja uzeti u obzir da 4-HNE-PA odražava lokalne redoks uvjete u tkivu, dok serumsko željezo predstavlja sustavni parametar, pa njihova povezanost može biti posredovana zajedničkim patofiziološkim mehanizmima, a ne izravnom međusobnom interakcijom. U analizi histološke aktivnosti upale u želučanoj sluznici, koja predstavlja pokazatelj lokalne upalne reakcije, intenzitet citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA značajno raste s pojavom upalne aktivnosti, pri čemu su očekivano više vrijednosti češće zabilježene u uzorcima s kroničnom i kroničnom aktivnom upalom. Međutim, raspodjela vrijednosti u skupini kronične aktivne upale bila je šira, bez proporcionalnog daljnjeg porasta u odnosu na kroničnu upalu. Štoviše, najviše vrijednosti 4-HNE-PA češće su zabilježene u skupini s kroničnom upalom, iako razlika u odnosu na uzorke s kroničnom aktivnom upalom nije bila statistički značajna. Unatoč izostanku statističke značajnosti, ovakav nalaz mogao bi biti u skladu s općeprihvaćenim konceptom prema kojem dugotrajna kronična upala predstavlja ključni patobiološki proces povezan s razvojem zloćudne transformacije želučane sluznice (35,150). Multivarijatna analiza dodatno je potvrdila da su se dob bolesnika i lokalna upala pokazale neovisnim prediktorima intenziteta citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA, dok isto nije potvrđeno za ostale parametre. Pritom je dob pokazala postupni porast vjerojatnosti viših razina nakupljanja, dok je aktivnost upale pokazala izražen, ali nelinearan odnos s akumulacijom završnih produkata lipidne peroksidacije. Ovakav nalaz u skladu je s rezultatima Cherkas i sur., koji su pokazali da povišena razina 4-HNE-PA u želučanoj sluznici kod ulkusa odnosno kronične aktivne upale, ostaje visoka i nakon eradikacije infekcije, iako je intenzitet aktivne upale pritom bio značajno smanjen (145). Zaključno, ovi rezultati upućuju na to da citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA u želučanoj sluznici prvenstveno odražava učinak lokalne kronične upale i kumulativnog oksidacijskog stresa povezanog sa starenjem.

## 6.5 Multivarijatno modeliranje progresije Correa kaskade

### 6.5.1 Višerazinski pristup modeliranju progresije

Iako su pojedinačne analize pokazale jasne razlike u izražaju i lokalizaciji ispitivanih biomarkera između pojedinih stadija Correa kaskade, ostalo je otvoreno pitanje imaju li ti nalazi i integrativnu vrijednost u razlikovanju razvojnih faza želučane karcinogeneze. Upravo je zato provedeno multivarijatno modeliranje progresije kroz Correa kaskadu, kojim se nastojalo procijeniti mogu li histološki i imunohistokemijski biomarkeri, uz eventualni doprinos kliničkih čimbenika, razlikovati pojedine stadije bolesti na različitim razinama analitičke granularnosti. U tom smislu šestostupanjski model bio je usmjeren na procjenu fine biološke progresije između susjednih stadija, trostupanjski model na razlikovanje klinički relevantnih kategorija uredne sluznice, prekanceroznih i malignih lezija, a binarni model na procjenu diskriminacijske sposobnosti biomarkera u razlikovanju benignih i malignih promjena. Takav višerazinski pristup omogućio je da se isti skup biomarkera istraži istodobno iz perspektive biološke progresije bolesti i iz perspektive njihove potencijalne uporabne vrijednosti u procjeni malignog potencijala lezije.

### 6.5.2 Šestostupanjski model progresije

U šestostupanjskom modelu progresije kroz Correa kaskadu pokazalo se da različiti biomarkeri i klinički čimbenici imaju fazno-specifičan doprinos prijelazima između pojedinih stadija bolesti. Takav obrazac upućuje na to da napredovanje želučane karcinogeneze nije vođeno jednim dominantnim molekularnim događajem, nego predstavlja postupni proces u kojem različiti patobiološki mehanizmi dolaze do izražaja u različitim fazama progresije. U ranim prijelazima iz uredne sluznice prema atrofičnim i metaplastičnim promjenama posebno se ističe uloga upalnih parametara i lokalne upalne aktivnosti sluznice. Histološki procijenjena aktivnost upale u tom je kontekstu očekivano pokazala snažnu diskriminacijsku vrijednost, budući da je njezina odsutnost jedno od ključnih obilježja histološki uredne želučane sluznice, slično kao i izostanak infekcije bakterijom *H. pylori*. Ipak, činjenica da je u istom prijelazu zabilježena i povećana citoplazmatski izražaj COX-2 detektiran klonom SP21 dodatno potvrđuje povezanost ovog enzima s upalnim procesima u želučanoj sluznici. Štoviše, opaženo postupno povećanje izražaja COX-2 paralelno s porastom histološki procijenjene upalne aktivnosti dodatno potvrđuje da je COX-2 jedan od medijatora upalnog odgovora koji prati rane faze progresije Correa kaskade. Daljnjim napredovanjem Correa kaskade prema stadiju intestinalne metaplazije uočena je izraženija aktivnost upale, praćena i češćim pojavljivanjem membranskog obrasca izražaja COX-2 detektiranog klonom CX-294. Taj je obrazac bio najizraženiji u izoliranoj intestinalnoj metaplaziji, dok je u uzorcima s kombinacijom intestinalne metaplazije i atrofije njegova učestalost bila nešto manja. Unatoč tim razlikama, ukupni nalaz upućuje na postojanje pozitivne povezanosti između COX-2 signalizacije i upalnih procesa u želučanoj sluznici. Ipak, u ovom stadiju čini se da ključnu

diskriminacijsku ulogu ima povećana citoplazmatska akumulacija 4-HNE-PA, koja je bila izraženija upravo u uzorcima intestinalne metaplazije. Ovaj nalaz upućuje na to da se uz kroničnu upalu u toj fazi kaskade sve više ističe i komponenta oksidacijskog oštećenja lipida. U kasnijim stadijima Correa kaskade, osobito pri prijelazu prema displaziji i karcinomu, veći doprinos modelu imaju promjene u izražaju i subcelularnoj lokalizaciji COX-2. To se prvenstveno očituje kroz pojavu citoplazmatskog izražaja ili potpunog gubitka membranskog obrasca detektiranog klonom CX-294 tijekom progresije prema displaziji te pojavu jezgrene lokalizacije COX-2 detektirane klonom SP21 u stadiju karcinoma. Takav obrazac upućuje na promjene u intracelularnoj redistribuciji proteina tijekom maligne transformacije želučanog epitela. Osim navedenih biomarkera, značajnim se pokazao i N/L omjer, koji kao pokazatelj sustavne upalne aktivnosti pokazuje porast prema stadiju karcinoma. Ovaj nalaz može biti povezan s invazivnim rastom tumora i zahvaćanjem okolne strome, što je već ranije opisano kao jedan od mogućih uzroka povećanja sustavnog upalnog odgovora u bolesnika s uznapredovalim malignim bolestima. Takav fazno-specifičan obrazac djelovanja biomarkera u skladu je s konceptom Correa kaskade kao višestupanjskog procesa u kojem se kronična upala, oksidacijski stres i promjene signalnih putova postupno nadovezuju tijekom progresije prema malignoj transformaciji. Promatrani zajedno, ovi nalazi upućuju na to da progresija kroz Correa kaskadu nije određena jednim dominantnim biomarkerom, već postupnim nadovezivanjem različitih patobioloških procesa i to od kronične upale i oksidacijskog stresa u ranim fazama do promjena u signalnim putovima i subcelularnoj redistribuciji ključnih proteina u kasnijim stadijima maligne transformacije.

### 6.5.3 Trostupanjski model progresije

Upravo zbog takve složene i fazno-specifične dinamike progresije, u sljedećem koraku provedena je i pojednostavljena analiza modela u kojem su histološki stadiji objedinjeni u tri klinički relevantne kategorije: urednu sluznicu, prekancerozne lezije (atrofija, intestinalna metaplazija i njihova kombinacija) te maligne lezije (displazija i karcinom). Ovakav pristup omogućuje pojednostavljeno promatranje progresije bolesti u kategorijama koje su bliže kliničkoj praksi i procjeni malignog potencijala lezije. Rezultati ovog modela pokazali su da analizirani biomarkeri zadržavaju značajnu diskriminacijsku vrijednost i nakon takvog pojednostavljenja histološke klasifikacije. U trostupanjskom modelu progresije Correa kaskade ponovno se pokazala očekivana diskriminacijska vrijednost histološki procijenjene aktivnosti upale u razlikovanju uredne sluznice i prekanceroznih lezija. Istodobno je u ovom modelu zabilježena i niža razina aktivnosti upale u karcinomima u odnosu na prekancerozne lezije, što je u skladu s ranije opisanim nalazima o relativnom smanjenju lokalne upalne reakcije u uznapredovalim stadijima bolesti. Međutim, kako je već naglašeno, takav obrazac nema značajniju dijagnostičku uporabljivost jer je primarno određen definicijom histoloških kategorija. I u ovom modelu potvrđen je obrazac ranog povećanja citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA u odnosu na urednu

sluznicu, nakon čega njegova razina ostaje relativno stabilna u daljnjim stadijima Correa kaskade, što potvrđuje da akumulacija produkata lipidne peroksidacije predstavlja rani događaj u procesu želučane karcinogeneze. S druge strane, biomarker COX-2 detektiran klonom CX-294 pokazao je znatno veću diskriminacijsku vrijednost u prijelazu iz prekanceroznih lezija prema karcinomu. Promjene u subcelularnoj lokalizaciji ovog proteina omogućuju jasno razlikovanje tih stadija, pri čemu je citoplazmatsko/perijezgreno bojenje gotovo isključivo povezano s malignom alteracijom epitela. Nasuprot tome, potpuni gubitak imunoreaktivnosti može se susresti i u uzorcima uredne sluznice i atrofije, zbog čega ima manju dijagnostičku specifičnost. Zanimljivo je da vrlo jak citoplazmatski izražaj SP21 (kategorija 3), koja se najčešće susreće u prekanceroznim lezijama, nije pokazala značajnu povezanost s malignim stadijem, dok je umjereni izražaj (kategorije 1-2) bio značajno povezan s karcinomom. Takav obrazac može upućivati na relativno smanjenje razine COX-2 u tumorskom tkivu u odnosu na prekancerozne stadije.

#### 6.5.4 Binarni model razlikovanja benignih i malignih lezija

Iako trostupanjski model omogućuje pojednostavljeno promatranje progresije Correa kaskade kroz klinički relevantne kategorije uredne sluznice, prekanceroznih lezija i malignih promjena, u dijagnostičkom kontekstu često je ključno razlikovati lezije s malignim potencijalom od benignih promjena. Stoga je u sljedećem koraku provedena dodatna analiza u kojoj su histološki stadiji objedinjeni u dvije skupine - benigne lezije (uredna sluznica, atrofija i intestinalna metaplazija) i maligne lezije (displazija i karcinom). Takav binarni pristup omogućuje procjenu diskriminacijske sposobnosti analiziranih biomarkera u razlikovanju lezija s malignim potencijalom od onih bez znakova maligne transformacije.

Rezultati binarnog modela opet su potvrdili vrlo visoku diskriminacijsku sposobnost analiziranih biomarkera u razlikovanju benignih i malignih lezija želučane sluznice. Pri tome su modeli temeljeni isključivo na histološkim i imunohistokemijskim biomarkerima pokazali najpovoljniju ravnotežu između prilagodbe i složenosti modela, dok dodavanje većeg broja kliničkih varijabli nije značajno poboljšalo diskriminacijsku sposobnost jednako kao i u slučaju trostupanjskog modela. Očekivano, 4-HNE-PA u ovom modelu nije pokazao značajnu diskriminacijsku vrijednost. Razlog tomu vjerojatno leži u činjenici da skupina benignih lezija obuhvaća i stadije u kojima je razina 4-HNE-PA izrazito povišena, osobito intestinalnu metaplaziju, čime se smanjuje njegova sposobnost razlikovanja benignih od malignih promjena. Nasuprot tome, COX-2 detektiran s oba korištena klona pokazao je obrasce povezane s malignim stadijem koji su u skladu s rezultatima dobivenima u trostupanjskom modelu. U ovom modelu kao značajan parametar istaknula se i dob bolesnika; međutim, kako je već ranije objašnjeno, takav nalaz vjerojatno odražava strukturu istraživanih uzorka, budući da se karcinomi u pravilu pojavljuju u starijoj populaciji.

### 6.5.5 Validacija, kalibracija i klinička uporabljivost binarnog modela

Sve ovo još jednom potvrđuje da promjene u izražaju i subcelularnoj lokalizaciji analiziranih biomarkera nose najveći dio informacija relevantnih za razlikovanje malignih od benignih lezija unutar spektra Correa kaskade. Stabilnost dobivenih rezultata dodatno je potvrđena analizama osjetljivosti, u kojima su modeli temeljeni na biomarkerima zadržali sličnu diskriminacijsku sposobnost i nakon postupnog isključenja pojedinih histoloških stadija, što dodatno podupire robusnost opaženih povezanosti. Ukupna procjena performansi binarnog modela pokazala je vrlo visoku diskriminacijsku sposobnost, dobru kalibraciju te jasnu kliničku korisnost. Diskriminacija modela bila je izrazito visoka (AUC = 0,992), a interna validacija bootstrap postupkom pokazala je minimalni optimizam, sugerirajući da dobiveni rezultati nisu posljedica „prenaučivosti“ modela. Unatoč tome, ovako visoka vrijednost AUC-a može djelomično odražavati strukturu uzorka i izražene razlike između histoloških skupina, stoga je za procjenu stvarne kliničke primjenjivosti modela nužna vanjska validacija na neovisnoj kohorti. Analiza kalibracije potvrdila je dobru usklađenost između predviđenih i opaženih vjerojatnosti, dok je analiza krivulje odluke pokazala da model ostvaruje veću neto kliničku korist u odnosu na strategije „svi tretirani“ i „nitko tretiran“ kroz širok raspon pragova vjerojatnosti. Dodatno, stabilnost modela potvrđena je analizama osjetljivosti u kojima su iz modeliranja postupno isključeni uredni uzorci, odnosno uredni uzorci i atrofija, pri čemu su modeli temeljeni na biomarkerima zadržali najpovoljniju ravnotežu između prilagodbe i složenosti. Takva visoka diskriminacijska sposobnost vjerojatno proizlazi iz činjenice da analizirani biomarkeri odražavaju ključne patobiološke procese uključene u progresiju Correa kaskade, uključujući kroničnu upalu, oksidacijski stres i promjene u COX-2 signalizaciji. Zajedno, ovi rezultati ukazuju da binarni model u ovom istraživanju ne samo da pouzdano razlikuje benigne i maligne lezije, već pruža i stabilne procjene rizika te potencijalnu dodanu vrijednost u kontekstu kliničke procjene malignog potencijala lezija želučane sluznice. Ipak, dobivene rezultate treba interpretirati uz određena ograničenja. Analiza je provedena na relativno ograničenom uzorku iz dvije ustanove, što može utjecati na procjenu stabilnosti modela u drugim populacijama bolesnika. Iako interna bootstrap validacija ukazuje na nisku razinu optimizma i stabilne procjene modela, za konačnu procjenu njegove opće primjenjivosti potrebna su dodatna istraživanja na većem uzorku i vanjska validacija na neovisnim skupovima uzoraka.

### 6.6 Integrativno značenje modela: komplementarna uloga COX-2 i 4-HNE-PA

Promatrani zajedno, rezultati svih modela ukazuju na to da analizirani biomarkeri ne odražavaju samo prisutnost pojedinih histoloških stadija, nego i različite biološke razine progresije Correa kaskade. Povećan izražaj COX-2, detektiran s oba korištena klona, osobito u intestinalnoj metaplaziji, upućuje na to da taj stadij predstavlja stabilno upalno i signalno preoblikovan fenotip želučane sluznice, a ne samo

morfološku prijelaznu leziju, što je u skladu s literaturom koja pokazuje imunohistokemijski detektiran povišen izražaj COX-2 u intestinalnoj metaplaziji i njegovo postupno povećanje tijekom progresije prema karcinomu (101,153,154). U tom se kontekstu intestinalna metaplazija izdvaja kao faza u kojoj su kronična upala i promjene u COX-2 signalizaciji već jasno uspostavljene, dok se u kasnijim stadijima progresije sve više ističu promjene u subcelularnoj lokalizaciji proteina. S obzirom na to da je pojačan izražaj COX-2 osobito naglašen u prekanceroznim lezijama, uključujući intestinalnu metaplaziju, te da je povezan s proliferacijom, inhibicijom apoptoze i angiogenezom, otvara se mogućnost razmatranja ovoga proteina kao potencijalne terapijske mete u ranim fazama bolesti, s ciljem usporavanja progresije ili čak reverzije premalignih promjena (6,136). Dodatno, rezultati dobiveni klonom CX-294 ukazuju da subcelularna distribucija COX-2, osobito citoplazmatsko i perijejgreno nakupljanje, može imati važnu dijagnostičku i biološku ulogu, budući da je takav obrazac u ovom istraživanju bio gotovo isključivo ograničen na maligne lezije. Slični obrasci subcelularne redistribucije COX-2 opisani su i u drugim epitelnim tumorima, gdje se tijekom maligne transformacije mijenja njegov unutarstanični raspored, uz gubitak organiziranog i polariziranog uzorka izražaja te pojavu difuznije citoplazmatske ili perijejgrene akumulacije, što se povezuje s promjenama u signalnim putevima i tumorskom progresijom (155–157). Iako se početni obrazac lokalizacije može razlikovati između pojedinih tkiva i modela, zajednički nalaz je upravo gubitak uredne subcelularne organizacije COX-2 tijekom maligne transformacije.

Već je spomenuto da je COX-2 membranski vezan protein koji se primarno lokalizira na endoplazmatskom retikulumu i jezgrenoj ovojnici, gdje je funkcionalno povezan s enzimima uključenima u sintezu prostaglandina, a upravo zbog takve organizacije, perijejgreno nakupljanje COX-2 može odražavati aktivnu prostaglandinsku signalizaciju i povećanu metaboličku aktivnost tumorskih stanica (131). U skladu s tim, u našem istraživanju klonom CX-294 uočena je promjena iz urednog membranskog uzorka prisutnog u normalnoj želučanoj sluznici prema citoplazmatskoj i perijejgrenoj akumulaciji u malignim lezijama, što dodatno podupire hipotezu da redistribucija COX-2 predstavlja funkcionalno relevantan događaj u progresiji tumora, a ne samo morfološku promjenu. Istodobno, uočeni jezgreni pomak izražaja detektiran klonom SP21 upućuje na dodatne, redoks-uvjetovane promjene u funkcionalnoj ulozi COX-2 u tumorskim stanicama, što predstavlja rijetko opisan fenomen u literaturi (141). Međutim, važno je naglasiti da rezultati dobiveni različitim protutijelima ne odražavaju nužno istu biološku komponentu COX-2. Ponovo treba istaknuti da pojedini klonovi razlikuju posttranslacijski modificirane oblike COX-2, pri čemu klonovi poput CX-294 prepoznaju nenitrozirani oblik enzima, dok klon SP21 selektivno detektira S-nitrozirani COX-2, koji ima različitu subcelularnu lokalizaciju i vjerojatno različitu funkciju (130,131). U tom kontekstu, rezultati dobiveni klonom SP21 dodatno upućuju na kvalitativne promjene u COX-2 signalizaciji tijekom progresije bolesti. Budući da

SP21 prepoznaje S-nitrozirani oblik COX-2, uočeno smanjenje njegovog citoplazmatskog izražaja u tumorskom tkivu može odražavati promjene u posttranslacijskoj modifikaciji enzima te ukazivati na poremećaj ravnoteže između nitrozativnog i oksidacijskog stresa tijekom maligne transformacije. Naime, S-nitrozilacija predstavlja redoks-ovisnu i reverzibilnu modifikaciju proteina, čija razina ovisi o lokalnom odnosu reaktivnih dušikovih i kisikovih vrsta, pri čemu izraženiji oksidacijski uvjeti mogu ograničiti održavanje S-nitroziliranog oblika proteina (158–160). U jednom dijelu tumora opaženo je smanjenje citoplazmatskog izražaja SP21, dok je u drugom dijelu zabilježen jezgri obrazac izražaja. Takva razlika ne upućuje na jedinstven smjer promjene, već na postojanje heterogenih redoks-stanja među tumorima. Dok dio tumora pokazuje relativni gubitak S-nitroziliranog oblika COX-2, drugi dio karakterizira njegova aberantna jezgrena redistribucija, koja može biti posljedica povećanog citoplazmatskog izražaja, u skladu s uočenom povezanošću ovih dvaju fenomena. Ovi nalazi su u skladu s konceptom da S-nitrozilacija i druge redoks-ovisne modifikacije, kao dinamični i mikrookolišno ovisni procesi određeni ravnotežom nitrozativnog i oksidacijskog stresa, ne reguliraju samo razinu izražaja, već i funkcionalni status te subcelularnu lokalizaciju proteina, čime usmjeravaju signalne putove uključene u proliferaciju, preživljenje i progresiju tumora (130,144,161,162). Sukladno tome, SP21 u ovom kontekstu ne odražava samo razinu izražaja COX-2, već potencijalno može predstavljati posredni indikator heterogenih promjena u njegovoj nitrozilaciji, odnosno ulozi nitrozativnog stresa tijekom maligne transformacije.

Nasuprot tome, 4-HNE-PA se u svim modelima dosljedno povezuje ponajprije s intestinalnom metaplazijom i ranim fazama kronično promijenjene sluznice, potvrđujući da oksidacijski stres predstavlja rani i perzistentni događaj u želučanoj karcinogenezi. Upravo zato 4-HNE-PA pokazuje najveću vrijednost u razlikovanju uredne od kronično upalno i metaplastično promijenjene sluznice, dok njegova diskriminacijska sposobnost slabi u modelima koji objedinjuju benigne i maligne lezije, jer ostaje povišen već u prekanceroznim stadijima. Takav obrazac upućuje na to da 4-HNE ne djeluje prvenstveno kao marker maligne transformacije, nego kao pokazatelj trajno oksidativno promijenjenog fenotipa sluznice. Ovakva interpretacija u skladu je s literaturnim podacima koji pokazuju da su produkti lipidne peroksidacije, uključujući 4-HNE, prisutni u želučanoj sluznici čak i u odsutnosti aktivne upale te ne ovise nužno o *H. pylori* statusu (81,146). Nadalje, pokazano je da razina 4-HNE može ostati povišena, pa čak i progredirati, i nakon eradikacije *H. pylori*, unatoč smanjenju upalne aktivnosti, što dodatno podupire koncept perzistentnog oksidacijskog stresa neovisnog o akutnoj upali (145,163). U tom smislu, 4-HNE-PA može odražavati dugotrajne promjene u redoks ravnoteži i oštećenje tkiva koje nadilazi trenutni upalni status sluznice. Nadalje, opažanja iz ovog istraživanja pokazala su da je 4-HNE-PA prisutan i u određenim upalnim stanicama, uključujući makrofage, ali osobito plazma stanice, što upućuje na njegovu dodatnu potencijalnu pomoćnu vrijednost u semikvantitativnoj procjeni lokalne

upalne aktivnosti. Iako većina imunohistokemijskih studija 4-HNE u želučanoj sluznici primarno opisuje njegovu prisutnost u epitelu i stromi, bez detaljne stanične razdiobe, eksperimentalni podaci pokazuju da 4-HNE može biti detektiran i u plazma stanicama, osobito u uvjetima rane upalne aktivacije, gdje dolazi do modifikacije imunoglobulina (164). S druge strane, pojedina istraživanja navode kako prisutnost 4-HNE u imunološkim stanicama nije uniformna, budući da je u nekim studijama detektiran u pojedinim upalnim stanicama, poput makrofaga, dok je u drugim izostao u dijelu mononuklearnog infiltrata, pri čemu se zaključilo da precizna stanična identifikacija često nije moguća temeljem same imunohistokemije (165,166).

Zaključno, 4-HNE-PA i COX-2 pružaju komplementarne informacije o progresiji Correa kaskade. Dok 4-HNE-PA odražavaju ranu i perzistentnu komponentu oksidacijskog stresa te kronično upalno i redokso izmijenjenog stanja želučane sluznice, COX-2, osobito kroz promjene u subcelularnoj lokalizaciji, predstavlja ključni marker maligne transformacije. Njihova fazno-specifična i međusobno nadopunjujuća vrijednost upućuje na potencijalnu primjenu u biološkoj karakterizaciji progresije bolesti i procjeni rizika, no potrebna je vanjska validacija prije kliničke primjene.

## 6.7 Funkcionalni učinci 4-HNE u in vitro modelu želučanog karcinoma

### 6.7.1 Učinak 4-HNE na vijabilnost AGS stanica

Budući da su rezultati imunohistokemijske analize u prekanceroznim stadijima Correa kaskade pokazali značajno povećano nakupljanje produkata lipidne peroksidacije, osobito 4-HNE-PA, u sljedećem je koraku ispitan njegov potencijalni funkcionalni učinak na tumorske stanice humanog adenokarcinoma želuca (AGS) u in vitro uvjetima. Prije svega, treba istaknuti kako AGS stanična linija predstavlja model želučanog tumorskog epitela, zbog čega se dobiveni rezultati ne mogu izravno ekstrapolirati na rane prekancerozne stadije Correa kaskade, već ponajprije odražavaju biološke učinke 4-HNE u kontekstu već maligno alteriranih želučanih epitelnih stanica. Rezultati eksperimenata na staničnoj liniji AGS pokazali su izražen, koncentracijski ovisan učinak 4-HNE na vijabilnost stanica. Značajno smanjenje vijabilnosti zabilježeno je pri višim koncentracijama ( $\geq 40 \mu\text{M}$ ), dok niže koncentracije nisu pokazale statistički značajan citotoksični učinak, što upućuje na postojanje relativno jasno definiranog citotoksičnog praga djelovanja 4-HNE u ovom modelu. Procijenjena vrijednost  $\text{IC}_{50}$  iznosila je približno  $33 \mu\text{M}$  nakon 24 sata inkubacije, uz sličnu vrijednost i nakon 48 sati izlaganja, što sugerira stabilan prag citotoksičnosti neovisan o trajanju izloženosti unutar promatranog vremenskog raspona. Prema dostupnim podacima iz literature, učinci egzogenog 4-HNE na AGS stanice još uvijek nisu dovoljno istraženi, dok su njegova biološka djelovanja u drugim želučanim i neželučanim staničnim modelima znatno bolje opisana. U usporedbi s time, ranija istraživanja na drugim želučanim modelima ukazuju na znatno izraženiji i brži učinak 4-HNE. Tako su Bauer i sur. pokazali da u stanicama MKN-45 linije

želučanog karcinoma 4-HNE inducira apoptozu na koncentracijski ovisan način već u niskom mikromolarnom rasponu, pri čemu su značajni učinci zabilježeni već nakon 2,5 sata izlaganja, a biološki učinak opaža se već pri koncentracijama od približno 0,15-1,2  $\mu\text{M}$  (167). Slično tome, u normalnim želučanim epitelnim stanicama (GES-1) pokazano je da koncentracija od 10  $\mu\text{M}$  4-HNE već nakon 6 sati dovodi do aktivacije kaspaza i apoptotskog odgovora, što potvrđuje da 4-HNE u niskom mikromolarnom rasponu može inducirati rane apoptotske i promjene povezane s oštećenjem DNK u želučanim epitelnim stanicama (168). Iako su podaci za želučane stanične linije ograničeni, studije na drugim tumorskim modelima pokazuju da se 4-HNE najčešće ispituje u rasponu od približno 10 do 160  $\mu\text{M}$ , uz postupno povećanje citotoksičnih učinaka s porastom koncentracije (169), pri čemu osjetljivost može značajno varirati između različitih epitelnih modela, budući da su u nekim staničnim linijama citotoksični učinci izraženiji tek pri višim koncentracijama (170). U odnosu na navedeno, naši rezultati upućuju na znatno manju osjetljivost AGS stanica na 4-HNE, budući da su za postizanje usporedivog učinka bile potrebne više koncentracije i dulje vrijeme izlaganja. Takva razlika može odražavati temeljne razlike u redoks ravnoteži i kapacitetu detoksifikacije između pojedinih želučanih tumorskih linija, uključujući varijacije u metabolizmu glutationa, aktivnosti aldehyd dehidrogenaza ili bazalnoj razini oksidacijskog stresa. Također, važno je naglasiti da su u navedenom radu Bauera i sur. analizirani rani apoptotski događaji temeljeni na morfološkim kriterijima i ROS-posredovanoj signalizaciji, dok su u ovom istraživanju korišteni testovi vijabilnosti nakon duljeg vremena inkubacije, što može obuhvatiti različite biološke ishode. Zajedno, ovi nalazi potvrđuju da je učinak 4-HNE izrazito ovisan o staničnom kontekstu te upućuju na značajnu heterogenost u osjetljivosti tumorskih stanica želuca na produkte lipidne peroksidacije. U kontekstu Correa kaskade, takva dvojaka uloga 4-HNE može imati važno patobiološko značenje, pri čemu niže koncentracije potencijalno sudjeluju u signalnim i adaptivnim odgovorima kronične upale, dok više koncentracije doprinose oštećenju stanica i selekciji otpornijih klonalnih populacija uključenih u progresiju prema malignitetu. Ovakav bifazični učinak u skladu je s konceptom hormeze, odnosno nelinearnog, J-oblikovanog odnosa između doze i biološkog učinka, pri kojem niske doze stresora mogu potaknuti adaptivne odgovore, uključujući proliferaciju i povećanje funkcionalne sposobnosti stanica, dok više doze dovode do citotoksičnosti (171). U tom kontekstu, opaženi izostanak citotoksičnosti, odnosno mogući adaptivni odgovor pri nižim koncentracijama 4-HNE-a u našem modelu dodatno podupire postojanje fenomena hormeze u AGS želučanim tumorskim stanicama.

#### 6.7.2 Učinak 4-HNE na stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS)

Nadalje, u ovom istraživanju 4-HNE je pokazao izražen koncentracijski ovisan učinak na stvaranje unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u AGS stanicama. U ranim vremenskim točkama inkubacije (1-4 sata) zabilježen je značajan porast ROS-a pri koncentracijama od 10  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ , dok

koncentracija od 5  $\mu\text{M}$  nije izazvala statistički značajnu promjenu u odnosu na kontrolu. Ovakav nalaz upućuje na to da već subcitotoksične koncentracije 4-HNE mogu djelovati kao redoks-aktivni signal koji potiče stvaranje ROS. Međutim, nakon 24 sata inkubacije statistički značajan porast ROS-a zabilježen je samo pri koncentraciji od 30  $\mu\text{M}$ , što sugerira da niže koncentracije induciraju prolazan ili slabiji oksidacijski odgovor koji stanice tijekom vremena djelomično kompenziraju, vjerojatno aktivacijom antioksidacijskih mehanizama, dok više koncentracije dovode do održanog porasta ROS. Takav vremenski ovisan obrazac u skladu je s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da 4-HNE može inducirati brzi porast ROS-a unutar kratkog vremenskog razdoblja, uz daljnju modulaciju ili eskalaciju odgovora ovisno o koncentraciji i trajanju izlaganja (172).

Ovakav vremenski i koncentracijski obrazac dodatno je poduprt literaturom koja pokazuje da 4-HNE u nižim koncentracijama može modulirati unutarstanične redoks signalne puteve, uključujući regulaciju mitohondrijske produkcije ROS-a, dok više koncentracije dovode do akumulacije oksidacijskog stresa i aktivacije citotoksičnih mehanizama (173). U želučanim tumorskim staničnim linijama također je pokazano da egzogeni 4-HNE u rasponu od približno 16 do 64  $\mu\text{M}$  inducira rane promjene povezane s lipidnom peroksidacijom i ROS signalizacijom već nakon nekoliko sati izlaganja, uz izraženiji učinak pri višim koncentracijama (174), pri čemu treba uzeti u obzir da su korištene stanične linije različitog biološkog profila u odnosu na AGS model, što može utjecati na razlike u osjetljivosti na oksidacijski stres. Zajedno, ovi nalazi dodatno podupiru koncept da 4-HNE djeluje kao redoks-ovisni regulator staničnih procesa, pri čemu niže koncentracije induciraju prolazni i potencijalno adaptivni porast ROS-a, dok više koncentracije dovode do trajnog oksidacijskog opterećenja i prelaska u citotoksičnu zonu djelovanja (175).

Ovi nalazi mogu se dodatno interpretirati u kontekstu dinamičke ravnoteže između oksidacijskog stresa i antioksidacijske obrane u želučanoj sluznici tijekom progresije Correa kaskade. U prekanceroznim stadijima, poput intestinalne metaplazije, povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta dovodi do pojačanog nastanka 4-HNE, ali istodobno dolazi i do aktivacije antioksidacijskih i detoksifikacijskih mehanizama koji ograničavaju njegovo nakupljanje i održavaju ga unutar subcitotoksičnog raspona. U takvim uvjetima 4-HNE može djelovati kao redoks-aktivni signal koji sudjeluje u regulaciji stanične proliferacije i adaptivnih odgovora. Međutim, u karcinomu dolazi do dodatnog pomaka u ovoj ravnoteži, pri čemu povećana proizvodnja oksidacijskih produkata nadilazi kapacitet detoksifikacijskih sustava, što rezultira blago povišenim razinama 4-HNE. Iako te razine i dalje ne moraju dosežati prag izražene citotoksičnosti, mogu biti dovoljne za dodatno poticanje proliferacijskih signalnih putova, što je u skladu s opaženim trendom povećane proliferacije pri nižim koncentracijama 4-HNE u našem in vitro modelu. Takav model sugerira da 4-HNE u želučanoj karcinogenezi ne djeluje samo kao pasivni marker oksidacijskog oštećenja, već kao aktivni regulator čiji učinak ovisi o finom balansu između

njegove produkcije i eliminacije, pri čemu i relativno male promjene u koncentraciji mogu imati značajne biološke posljedice.

### 6.7.3 Učinak 4-HNE na migracijsku sposobnost AGS stanica

Nadalje, rezultati ovog istraživanja pokazali su da 4-HNE utječe na migracijsku sposobnost AGS stanica, što se očitovalo promjenama u dinamici zatvaranja ogrebotine tijekom vremena. Primjenom normalizacije na početno stanje za svako pojedino vidno polje omogućena je usporedba dinamike zatvaranja rane neovisno o početnoj širini ogrebotine, čime je smanjen utjecaj tehničke varijabilnosti svojstvene metodi testa ogrebotine, a u skladu s metodološkim preporukama za kvantifikaciju zatvaranja ogrebotine (176,177). U svim eksperimentalnim skupinama zabilježen je očekivani porast postotka zatvaranja ogrebotine kroz vrijeme, što odražava progresivnu migraciju stanica. Usporedba između skupina pokazala je statistički značajne razlike u pojedinim vremenskim točkama, osobito u 10. i 30. satu, pri čemu je skupina tretirana s 5  $\mu\text{M}$  4-HNE pokazala dosljedno manji postotak zatvaranja ogrebotine u odnosu na kontrolu što upućuje na smanjenu migracijsku sposobnost stanica pri toj koncentraciji. Iako su razlike u 20. satu bile granično značajne, konzistentan obrazac kroz vremenski tijek dodatno podupire postojanje inhibitorynog učinka 4-HNE na migraciju stanica. Za razliku od očekivanog linearnog koncentracijski ovisnog učinka, najizraženiji inhibitoryni učinak zabilježen je pri nižoj koncentraciji (5  $\mu\text{M}$ ), dok za koncentraciju od 10  $\mu\text{M}$  nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, unatoč prisutnom trendu sporijeg zatvaranja ogrebotine. Ovakav nalaz upućuje na složen, nelinearan odnos između koncentracije 4-HNE i migracijske sposobnosti stanica, što je u skladu s poznatim bifazičnim, odnosno hormetičkim djelovanjem ovog reaktivnog produkta lipidne peroksidacije (178,179). Dodatnu potporu takvoj interpretaciji pružaju i novija istraživanja Zhong i sur. koje pokazuje da 4-HNE može modulirati migraciju tumorskih stanica na koncentracijski ovisan i nelinearan način (180). Važno je naglasiti da navedeni rezultati nisu dobiveni na istom staničnom modelu, zbog čega se ne mogu izravno uspoređivati u smislu smjera učinka, ali podupiru konceptualni okvir o kontekstualno ovisnom djelovanju 4-HNE. Dobiveni rezultati dodatno su potvrđeni analizom površine ispod krivulje (AUC), koja predstavlja integrirani pokazatelj migracijske aktivnosti kroz vrijeme. Statistički značajno niže vrijednosti AUC u skupini tretiranoj s 5  $\mu\text{M}$  4-HNE u odnosu na kontrolu potvrđuju smanjenu ukupnu migracijsku sposobnost stanica tijekom cijelog eksperimenta. Nasuprot tome, nagib linearne regresije nije pokazao statistički značajne razlike između skupina, što sugerira da je učinak 4-HNE izraženiji u kumulativnom nego u linearnom prikazu promjena. Slični anti-migracijski učinci opisani su i pri djelovanju različitih spojeva koji induciraju oksidacijski stres u AGS stanicama, poput kvercetina (181) i jaceozidina (182), što dodatno podupire povezanost između oksidacijskog stresa i smanjenja migracijske sposobnosti tumorskih stanica. Ovi nalazi sugeriraju da povećana razina reaktivnih kisikovih i lipidnih produkata može imati inhibitoryni učinak na stanični motilitet, osobito u

uvjetima narušene redoks ravnoteže. Jedan od mogućih mehanizama kojim 4-HNE utječe na migracijsku sposobnost stanica uključuje njegovu visoku reaktivnost prema proteinskim i membranskim strukturama, osobito kroz stvaranje kovalentnih adukata s citoskeletnim proteinima i regulatorima stanične adhezije što može dovesti do poremećaja organizacije aktinskog citoskeleta i smanjenja stanične pokretljivosti, što je u skladu s poznatim učincima 4-HNE na proteinske adukate i staničnu migraciju (72,183). Osim toga, 4-HNE može modulirati ključne signalne puteve uključene u regulaciju migracije, uključujući MAPK, PI3K/AKT i NF- $\kappa$ B signalizaciju, što dodatno potvrđuje njegovu ulogu kao signalne molekule (184,185). U kontekstu oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije, povećane razine 4-HNE povezane su i s procesima ferroptoze, koji uključuju akumulaciju lipidnih peroksida i poremećaj antioksidacijskih sustava, osobito putem osi NRF2/GPX4 (174,186–188). Iako u ovom istraživanju nisu izravno analizirani markeri ferroptoze, dobiveni rezultati ukazuju na moguću povezanost između povećane razine reaktivnih lipidnih produkata i smanjenja migracijske sposobnosti stanica. Uzimajući u obzir širi kontekst ovog istraživanja, dobiveni rezultati dodatno podupiru hipotezu o važnoj ulozi oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije u regulaciji biološkog ponašanja želučane sluznice tijekom karcinogeneze. U ranijim stadijima Correa kaskade 4-HNE može djelovati kao signalna molekula uključena u adaptivne i upalne odgovore, dok u kasnijim stadijima, obilježenima akumulacijom oksidacijskih oštećenja, može imati inhibitorni učinak na ključne procese poput proliferacije i migracije. U tom kontekstu moguće je pretpostaviti da povećana razina 4-HNE u tumorskom mikrookolišu ne djeluje jednoznačno protumorski ni antitumorski, već ima složenu, kontekstualno ovisnu ulogu koja ovisi o koncentraciji, trajanju izloženosti i interakciji s drugim signalnim putevima. Na primjer, s obzirom na povišene razine 4-HNE-PA u skupini karcinoma uočene na tkivnim uzorcima, može se pretpostaviti da njegov doprinos invazivnosti ne mora primarno biti posljedica izravnog učinka na migraciju tumorskih stanica, već posrednih učinaka, primjerice putem regulacije matriks-metaloproteinaza uključenih u remodeliranje izvanstaničnog matriksa. Važno je istaknuti i ograničenje ovog dijela istraživanja, koje predstavlja relativno mali broj mjerenja po skupinama, no unatoč tome, dosljednost uočenog učinka u ključnim vremenskim točkama, kao i podudarnost rezultata dobivenih različitim analitičkim pristupima (vremenski tijek i AUC), upućuju na biološku relevantnost opaženog utjecaja 4-HNE na migracijsku sposobnost AGS stanica.

#### 6.7.4 Utjecaj 4-HNE na izražaj COX-2 u AGS stanicama

Imunocitokemijska analiza izražaja proteina COX-2 u AGS stanicama pokazala je vrlo nisku razinu imunoreaktivnosti, ograničenu na sporadične pojedinačne stanice, bez uočljive razlike između tretiranih i netretiranih uzoraka. Takav nalaz upućuje na to da akutna izloženost 4-HNE-u u ovom eksperimentalnom modelu ne dovodi do značajne indukcije izražaja COX-2. Iako je u više epitelnih i drugih staničnih modela opisano da 4-HNE može inducirati izražaj COX-2, taj je učinak izrazito ovisan o

dodatnim signalnim okolnostima, a ne samo o prisutnosti samog aldehida. Mehanistički, pokazano je da 4-HNE aktivira signalne puteve poput p38 MAPK, koji imaju ključnu ulogu u stabilizaciji COX-2 mRNA i posljedično povećanju njegovog izražaja (189,190), ali i alternativnim mehanizmom koji uključuje smanjenje razine tumorskog supresora p53 te posljedičnu aktivaciju transkripcijskog čimbenika Sp1 (175). U tom kontekstu, 4-HNE uzrokuje disocijaciju p53-Sp1 kompleksa i translokaciju Sp1 u jezgru, što dovodi do povećane transkripcijske aktivnosti COX-2. Istodobno, uočena je jasna vremenska dinamika odgovora: izražaj COX-2 raste rano nakon izlaganja 4-HNE (unutar nekoliko sati), doseže maksimum, a zatim postupno opada, što upućuje na prolaznu i strogo reguliranu aktivaciju ovog puta (175). Nadalje, u epitelnim stanicama dokazano je da je indukcija COX-2 usko povezana s unutarstaničnim redoks statusom, osobito razinom glutationa, pri čemu promjene u glutationskom sustavu značajno moduliraju odgovor na 4-HNE (191).

Osim toga, 4-HNE može djelovati putem redoks-osjetljivih transkripcijskih čimbenika poput NF- $\kappa$ B, pri čemu njegov učinak može biti dvojak i ovisan o koncentraciji: niže koncentracije mogu aktivirati NF- $\kappa$ B signalizaciju, dok više koncentracije mogu inhibirati njegovu aktivaciju ili dovesti do disfunkcije signalnog puta (184,192). Ovi nalazi dodatno potvrđuju da je regulacija COX-2 u uvjetima oksidacijskog stresa višeslojna i ovisna o interakciji više signalnih puteva, uključujući p38 MAPK, p53 i Sp1, pri čemu sama prisutnost 4-HNE nije dovoljna za održavanje izražaja navedenog enzima bez odgovarajućeg signalnog konteksta i trajanja stimulacije. Slični učinci opaženi su i u tumorskim epitelnim modelima, gdje 4-HNE i njegovi konjugati (glutation-konjugirani 4-HNE i njegov reducirani oblik glutacion-konjugirani dihidrononenal) potiču sintezu prostaglandina E<sub>2</sub> putem indukcije COX-2, potvrđujući njegovu ulogu u proinflamatornoj i protumorskoj signalizaciji (193). Dodatno, vrijeme izlaganja predstavlja ključni čimbenik. U pojedinim modelima pokazano je da jednokratna izloženost 4-HNE dovodi do prolazne indukcije COX-2, s maksimumom nakon približno 6-8 sati, nakon čega dolazi do pada izražaja, dok se održavanje izražaja postiže tek nakon ponavljanog ili dugotrajnog izlaganja (194). Takav nalaz upućuje na to da je za stabilnu aktivaciju COX-2 signalizacije nužna kontinuirana ili ponavljana stimulacija, kakva je prisutna u kroničnim upalnim stanjima, ali ne i u kratkotrajnom in vitro modelu. Uzimajući sve navedeno u obzir, izostanak značajne indukcije COX-2 u AGS stanicama nakon akutne izloženosti 4-HNE u ovom istraživanju može se objasniti činjenicom da primijenjeni eksperimentalni uvjeti nisu uključivali ključne modulatore signalizacije, poput kronične upalne stimulacije, promjena u redoks ravnoteži ili ponavljanog izlaganja, koji su prema literaturi nužni za punu aktivaciju COX-2 izražajnosti. Također, treba uzeti u obzir i metodološke čimbenike. Parafinski kontrolni rezovi poznatih COX-2 pozitivnih uzoraka, također obrađeni bez toplinski induciranog otkrivanja antigena, pokazali su očuvanu, ali slabijeg intenziteta imunoreakciju u odnosu na standardni protokol s „otkrivanjem“ antigena. Ovakav nalaz upućuje na moguću ograničenu osjetljivost primijenjene metode, pri čemu

niska razina detektiranog izražaja u staničnim kulturama može djelomično odražavati tehnička ograničenja detekcije, a ne nužno potpuni izostanak biološkog učinka. Također, izostanak detekcije indukcije COX-2 imunocitokemijskom metodom ne isključuje mogućnost postojanja prolaznih promjena na razini genske izražajnosti ili suptilnijih promjena u razini proteina, koje bi zahtijevale primjenu osjetljivijih analitičkih metoda, poput RT-qPCR-a, Western blot analize ili kvantitativne imunofluorescencije. Unatoč navedenom, ovakav nalaz u skladu je s analizom korelacije biomarkera u skupini karcinoma u kojoj nije utvrđena značajna povezanost između izražaja COX-2 (oba klona) i citoplazmatskog nakupljanja 4-HNE-PA, što dodatno upućuje na to da je odnos između ova dva biomarkera u želučanoj karcinogenezi složen i vjerojatno posredovan dodatnim regulatornim mehanizmima.

Zajedno, ovi rezultati upućuju da 4-HNE u eksperimentalnim uvjetima djeluje kao snažan modulator oksidacijskog statusa stanice, pri čemu više koncentracije dovode do citotoksičnog učinka, dok niže koncentracije primarno utječu na signalne procese povezane s oksidacijskim stresom. U kontekstu rezultata dobivenih na tkivnim uzorcima, takav obrazac dodatno podupire hipotezu da akumulacija produkata lipidne peroksidacije u želučanoj sluznici predstavlja važan element mikrookoliša koji prati progresiju Correa kaskade te naglašava ulogu oksidacijskog stresa u razvoju želučane karcinogeneze.

## 6.8 Zaključna razmatranja

Zaključno, rezultati ovog istraživanja potvrđuju da je progresija duž Correa kaskade obilježena složenim, međusobno povezanim i fazno-specifičnim promjenama u upalnim, oksidacijskim i signalnim mehanizmima želučane sluznice. Citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA pokazalo se kao biljeg rane i perzistentne komponente oksidacijskog stresa u kronično promijenjenoj sluznici, dok su promjene u izražaju COX-2, i osobito subcelularnoj lokalizaciji, bile izraženije povezane s kasnijim stadijima maligne transformacije. Rezultati dobiveni na staničnoj liniji karcinoma želuca dodatno podupiru ulogu 4-HNE kao redoks-ovisnog modulatora staničnih procesa, pri čemu njegov učinak ovisi o koncentraciji i kontekstu djelovanja. Zajedno, ovi nalazi upućuju na to da 4-HNE-PA i COX-2 predstavljaju komplementarne pokazatelje biološke progresije bolesti, s mogućom vrijednošću u boljem razumijevanju patogeneze, procjeni malignog potencijala prekanceroznih stanja i daljnjem razvoju dijagnostičkih i terapijskih pristupa, no njihovu potencijalnu kliničku primjenu potrebno je potvrditi dodatnim istraživanjima i vanjskom validacijom na neovisnim skupinama bolesnika.

## 7 ZAKLJUČAK

U ovom radu analiziran je izražaj i subcelularna lokalizacija biomarkera oksidacijskog stresa (4-HNE-PA) i proteina COX-2 duž stadija Correa kaskade, kao modela razvoja intestinalnog tipa karcinoma želuca.

Na temelju dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Nakupljanje 4-HNE-PA značajno se povećava već u ranim stadijima Correa kaskade, osobito u intestinalnoj metaplaziji te ostaje povišena u svim kasnijim stadijima, što upućuje na to da oksidacijski stres predstavlja rani i perzistentni događaj u želučanoj karcinogenezi.
2. 4-HNE-PA imaju ograničenu diskriminacijsku vrijednost u razlikovanju benignih i malignih lezija, ali dobro razlikuju urednu sluznicu od prekanceroznih stanja sluznice, čime odražavaju oksidativno promijenjen fenotip tkiva povezan s kroničnom upalom i metaplastičnom promjenom sluznice.
3. Izražaj COX-2 pokazuje fazno-specifičan obrazac, s najvišim vrijednostima u prekanceroznim stanjima, osobito u intestinalnoj metaplaziji, nakon čega slijedi djelomičan pad u displaziji i karcinomu uz povećanu heterogenost izražaja.
4. Promjene u subcelularnoj lokalizaciji COX-2, uključujući gubitak membranskog obrasca i pojavu citoplazmatsko/perijezgrene te jezgrene lokalizacije, povezane su s progresijom prema uznapredovalim stadijima te mogu imati veću dijagnostičku vrijednost od same razine izražaja.
5. Primjena dvaju različitih protutijela, SP21 i CX-294, omogućila je detekciju različitih obrazaca imunohistokemijskog bojenja COX-2, što upućuje na moguću heterogenost subcelularne lokalizacije i/ili posttranslacijske modifikacije ovog proteina tijekom progresije bolesti.
6. Analizirani biomarkeri, osobito COX-2 i njegova subcelularna redistribucija, pokazali su visoku diskriminacijsku vrijednost u razlikovanju benignih i malignih lezija, što je potvrđeno visokom diskriminacijskom sposobnošću multivarijatnih modela.
7. Razlikovanje subcelularnih obrazaca bojenja COX-2 pokazalo se informativnijim od jednostavne podjele na pozitivne i negativne uzorke, što upućuje na važnost detaljnije imunohistokemijske evaluacije lokalizacije proteina u istraživanju progresije želučane karcinogeneze.

8. Sustavni upalni parametri rastu s progresijom bolesti, dok lokalna upalna aktivnost pokazuje vrhunac u ranijim stadijima, što upućuje na razdvajanje lokalnog i sistemskog upalnog odgovora tijekom maligne transformacije.
9. Izražaj COX-2 povezan je prvenstveno s lokalnom upalom, dok je 4-HNE-PA povezan s dobi i sustavnim upalnim statusom, što ukazuje na to da analizirani biomarkeri odražavaju različite razine upalnog i oksidacijskog stresa, od lokalnih tkivnih promjena do sustavnih čimbenika.
10. Eksperimentalni rezultati na staničnoj liniji adenokarcinoma želuca (AGS) ukazuju da 4-HNE modulira migracijsku sposobnost stanica na nelinearan način, pri čemu je izraženije usporeenje zatvaranja ogrebotine uočeno pri koncentraciji od 5  $\mu$ M, dok učinak pri višoj koncentraciji nije bio konzistentan, što može odražavati složenu, koncentracijski ovisnu regulaciju staničnih odgovora.
11. U in vitro modelu nije potvrđena značajna indukcija izražaja COX-2 nakon akutne izloženosti 4-HNE, što upućuje na to da sama akutna stimulacija 4-HNE-om nije dovoljna za imunocitokemijski detektabilnu indukciju COX-2 u AGS stanicama te da su za njezinu punu indukciju vjerojatno potrebni složeniji signalni uvjeti, dulja ili ponavljana izloženost, kronična upalna stimulacija ili osjetljivije metode detekcije ili kronična upalna stimulacija.
12. Dobiveni rezultati ukazuju da 4-HNE ne djeluje samo kao marker oksidacijskog oštećenja, već može djelovati kao redoks-aktivan modulator staničnih procesa u in vitro uvjetima, s koncentracijski ovisnim i potencijalno bifazičnim učinkom na vijabilnost, stvaranje ROS-a i migracijsku sposobnost stanica.
13. Zajedno, 4-HNE-PA i COX-2 pružaju komplementarne informacije o progresiji Correa kaskade, pri čemu 4-HNE-PA odražava ranu i perzistentnu komponentu oksidacijskog stresa, a COX-2, osobito kroz promjene u subcelularnoj lokalizaciji, predstavlja ključni marker maligne transformacije.
14. Vakuolarno nakupljanje 4-HNE-PA u vrčastim stanicama pokazalo je povezanost s uznapredovalijim metaplastičnim i displastičnim promjenama, osobito s višim stupnjem intestinalne metaplazije i displazijom, što upućuje na moguću ulogu ovog obrasca kao dodatnog pokazatelja oksidacijski aktivnih prekanceroznih lezija.

## 8 LITERATURA

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May;74(3):229–63.
2. Šekerija M. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Rak u Hrvatskoj 2023./2024. Zagreb; 2026.
3. Iwu CD, Iwu-Jaja CJ. Gastric Cancer Epidemiology: Current Trend and Future Direction. *Hygiene*. 2023;3(3):256–68.
4. WHO Classification of Tumours Editorial Board, editor. Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours. 5th Edition. Lyon: World Health Organization; 2019.
5. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, Grieken NCT Van, Lordick F. Seminar Gastric cancer. *Lancet* [Internet]. 2020;396(10251):635–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31288-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31288-5)
6. Dinis-Ribeiro M, Libânio D, Uchima H, Spaander MC, Bornschein J, Matsiyak-Budnik T, et al. Management of epithelial precancerous conditions and early neoplasia of the stomach (MAPS III): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG) and European Society of Pathology (ESP) Guidelines. *Endoscopy* [Internet]. 2025 [cited 2026 Mar 5];8:45. Available from: <https://doi.org/10.1055/a-2529-5025>
7. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017 Mar [cited 2026 Mar 5];67(2):93–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28094848/>
8. Brierley J, Gospodarowicz MD, Wittekind CT. TNM Classification of Malignant Tumors International Union Against Cancer. 8th. Oxford, England: Wiley; 2017. Wiley [Internet]. 2017 [cited 2026 Mar 5];pp57-62. Available from: <https://www.wiley.com/en-gb/TNM+Classification+of+Malignant+Tumours%2C+8th+Edition-p-9781119263562>
9. Lordick F, Carneiro F, Cascinu S, Fleitas T, Haustermans K, Piessen G, et al. Gastric cancer : ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis , treatment. *Ann Oncol* [Internet]. 2022;33(10):1005–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.07.004>
10. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* [Internet]. 2014 Sep 11 [cited 2026 Mar 5];513(7517):202–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature13480>
11. Robert D. Odze, MD, FRCP(C); John R. Goldblum M. Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas, Fourth Edition [Internet]. Elsevier; 2023 [cited 2024 Sep 30]. Available from: [https://books.google.com/books/about/Odze\\_and\\_Goldblum\\_Surgical\\_Pathology\\_of.html?hl=hr&id=i2p2EAAAQBAJ](https://books.google.com/books/about/Odze_and_Goldblum_Surgical_Pathology_of.html?hl=hr&id=i2p2EAAAQBAJ)
12. Fujiyoshi MRA, Inoue H, Fujiyoshi Y, Nishikawa Y, Toshimori A, Shimamura Y, et al. Endoscopic classifications of early gastric cancer: A literature review. *Cancers (Basel)*. 2022;14(1):1–11.
13. Thrift AP, Nguyen TH. Gastric Cancer Epidemiology. Vol. 31, *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2021. p. 425–39.
14. Hu B, Hajj N El, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol* [Internet]. 2012 [cited

- 2024 Oct 1];3(3):251–61. Available from: <https://jgo.amegroups.org/article/view/427/html>
15. Gigeck CO, Calcagno DQ, Rasmussen LT, Santos LC, Leal MF, Wisnieski F, et al. Genetic variants in gastric cancer: Risks and clinical implications. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2024 Oct 4];103(1):101–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28736214/>
  16. LAURÉN P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. *Acta Pathol Microbiol Scand* [Internet]. 1965 Sep 30;64(1):31–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apm.1965.64.1.31>
  17. Sano T, Kodera Y. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer* [Internet]. 2011 Jun [cited 2024 Oct 1];14(2):101–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21573743/>
  18. Nakamura K, Sugano H, Takagi K. Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. *Gan* [Internet]. 1968 Jun;59(3):251–258. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/5726267>
  19. Chen YC, Fang WL, Wang RF, Liu CA, Yang MH, Lo SS, et al. Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2024 Oct 1];22(1):197–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26502923/>
  20. Mori M, Sakaguchi H, Akazawa K, Tsuneyoshi M, Sueishi K, Sugimachi K. Correlation between metastatic site, histological type, and serum tumor markers of gastric carcinoma. *Hum Pathol* [Internet]. 1995 [cited 2024 Oct 1];26(5):504–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7750934/>
  21. Carneiro F, Seixas M, Sobrinho-Simões M. New elements for an updated classification of the carcinomas of the stomach. *Pathol Res Pract* [Internet]. 1995 [cited 2024 Oct 1];191(6):571–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7479380/>
  22. Sexton RE, Al Hallak MN, Diab M, Azmi AS. Gastric Cancer: A Comprehensive Review of Current and Future Treatment Strategies. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 Oct 2];39(4):1179. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7680370/>
  23. Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Oct 2];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28569272/>
  24. Vona R, Pallotta L, Cappelletti M, Severi C, Matarrese P. The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. *Antioxidants* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 Oct 22];10(2):201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7910878/>
  25. Rugge M, Correa P, Dixon MF, Fiocca R, Hattori T, Lechago J, et al. Gastric mucosal atrophy: interobserver consistency using new criteria for classification and grading. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2002 Jul 1 [cited 2024 Oct 2];16(7):1249–59. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2036.2002.01301.x>
  26. Zagari RM, Rabitti S, Greenwood DC, Eusebi LH, Vestito A, Bazzoli F. Systematic review with meta-analysis: diagnostic performance of the combination of pepsinogen, gastrin-17 and anti-*Helicobacter pylori* antibodies serum assays for the diagnosis of atrophic gastritis. Vol. 46, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 657–67.
  27. Spechler SJ, Merchant JL, Wang TC, Chandrasoma P, Fox JG, Genta RM, et al. A Summary of the 2016 James W. Freston Conference of the American Gastroenterological Association:

- Intestinal Metaplasia in the Esophagus and Stomach: Origins, Differences, Similarities and Significance. *Gastroenterology* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2024 Oct 2];153(1):e6–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28583825/>
28. Pimentel-Nunes P, Libânio D, Marcos-Pinto R, Areia M, Leja M, Esposito G, et al. Management of epithelial precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS II): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), European Society of Pathology (ESP), and Sociedade Port. Endoscopy [Internet]. 2019 [cited 2025 Jan 22];51(4):365–88. Available from: <https://www.esge.com/management-of-epithelial-precancerous-conditions-and-lesions-in-the-stomach-maps-ii-esge-esp-sped-guideline-update-2019>
  29. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022;71(9):1724–62.
  30. Goldenring JR, Nam KT, Wang TC, Mills JC, Wright NA. Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia and intestinal metaplasia: time for reevaluation of metaplasias and the origins of gastric cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 [cited 2024 Oct 2];138(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20450866/>
  31. Hibdon ES, Samuelson LC. Cellular Plasticity in the Stomach: Insights Into the Cellular Origin of Gastric Metaplasia. *Gastroenterology* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2024 Oct 2];154(4):801–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29425924/>
  32. Cassaro M, Rugge M, Gutierrez O, Leandro G, Graham DY, Genta RM. Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2000 Jun [cited 2024 Oct 2];95(6):1431–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10894575/>
  33. Correa P. Perspectives in Cancer Research A Human Model of Gastric Carcinogenesis1. *Nutrition*. 1988;(13):3554–60.
  34. Correa P. Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process- First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*. 1992;52(24):6735–40.
  35. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis*. 2012;13(1):2–9.
  36. Hattori T, Sugihara H. The pathological sequence in the development of gastric cancer: I. *Scand J Gastroenterol Suppl* [Internet]. 1996 [cited 2024 Oct 2];214(214):34–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8722404/>
  37. Mills SE. *Histology for Pathologists, 5e*. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2020.
  38. Infection with *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans. 1994;61:177–240.
  39. Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, Liou JM, Peek R, Schulz C, et al. *Helicobacter pylori* infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2023 Dec 1;9(1).
  40. Miller AK, Williams SM. *Helicobacter pylori* infection causes both protective and deleterious effects in human health and disease. *Genes Immun*. 2021;22(4):218–26.
  41. Ding SZ, Goldberg JB, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. *Future Oncol* [Internet]. 2010 May [cited 2024 Oct 7];6(5):851–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20465395/>

42. Altobelli A, Bauer M, Velez K, Cover TL, Müller A. Helicobacter pylori VacA Targets Myeloid Cells in the Gastric Lamina Propria To Promote Peripherally Induced Regulatory T-Cell Differentiation and Persistent Infection. *MBio* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2024 Oct 7];10(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30890606/>
43. Zhang X, Liu F, Bao H, Wang A, Han M, Wu X, et al. Distinct genomic profile in h. pylori-associated gastric cancer. *Cancer Med* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2024 Oct 4];10(7):2461–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33751865/>
44. Moss SF. The Clinical Evidence Linking Helicobacter pylori to Gastric Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2024 Oct 7];3(2):183. Available from: </pmc/articles/PMC5331857/>
45. International Agency for Research on Cancer (IARC). List of classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, IARC Monographs Volumes 1-133 a Cancer site Carcinogenic agents with sufficient evidence in humans. 2023;1–14. Available from: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc>
46. Shirani M, Pakzad R, Haddadi MH, Akrami S, Asadi A, Kazemian H, et al. The global prevalence of gastric cancer in Helicobacter pylori-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Oct 7];23(1). Available from: </pmc/articles/PMC10439572/>
47. Shao Y, Sun K, Xu W, Li XL, Shen H, Sun WH. Helicobacter pylori infection, gastrin and cyclooxygenase-2 in gastric carcinogenesis. Vol. 20, *World Journal of Gastroenterology*. 2014. p. 12860–73.
48. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, MacHado JC, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2024 Oct 7];67(2):226–36. Available from: <https://gut.bmj.com/content/67/2/226>
49. Miftahussurur M, Yamaoka Y, Graham DY. Helicobacter pylori as an oncogenic pathogen, revisited [Internet]. Vol. 19, *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Expert Rev Mol Med; 2017 [cited 2024 Oct 4]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28322182/>
50. Milkovic L, Zarkovic N, Marusic Z, Zarkovic K, Jaganjac M. The 4-Hydroxynonenal–Protein Adducts and Their Biological Relevance: Are Some Proteins Preferred Targets? *Antioxidants* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2024 Oct 23];12(4):856. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/4/856/htm>
51. Juan CA, de la Lastra JMP, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The chemistry of reactive oxygen species (Ros) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (dna, lipids and proteins) and induced pathologies [Internet]. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021 [cited 2024 Nov 13]. p. 4642. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8125527/>
52. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2017 Jun 20 [cited 2024 Nov 19];86:715–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28441057/>
53. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2006 Mar 10 [cited 2024 Nov 13];160(1):1–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16430879/>
54. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2024 Nov 13];417(Pt 1):1. Available from:

- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2605959/>
55. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 Aug 1;80:50–64.
  56. Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2024 Nov 13];47(9):1239. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2763943/>
  57. Ye ZW, Zhang J, Ancrum T, Manevich Y, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-Transferase P-Mediated Protein S-Glutathionylation of Resident Endoplasmic Reticulum Proteins Influences Sensitivity to Drug-Induced Unfolded Protein Response. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2017 Feb 20 [cited 2024 Nov 13];26(6):247–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26838680/>
  58. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 Nov 13];21(7):363–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32231263/>
  59. Nakamura H, Takada K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci*. 2021;112(10):3945–52.
  60. Tiwari SK, Shaik AS, Shaik AP, Alyousef AA, Bardia A, Habeeb MA, et al. Gene expression patterns of COX-1, COX-2 and iNOS in H. Pylori infected histopathological conditions. *Microb Pathog* [Internet]. 2019;135(May):103634. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103634>
  61. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2020 Aug 10 [cited 2024 Oct 22];38(2):167. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7439808/>
  62. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* [Internet]. Oxford University Press; 2015. Available from: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
  63. Švagelj D, Terzić V, Dovhanj J, Švagelj M, Cvrković M, Švagelj I. Superoxide dismutases in chronic gastritis. *Apmis*. 2016;124(4):252–6.
  64. Fuentes-Lemus E, Reyes JS, Figueroa JD, Davies MJ, López-Alarcón C. The enzymes of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway as targets of reactive species: consequences for NADPH production. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2023 Dec 20 [cited 2026 Mar 19];51(6):2173–87. Available from: [/biochemsoctrans/article/51/6/2173/233748/The-enzymes-of-the-oxidative-phase-of-the-pentose](https://www.biochemsoctrans.com/article/51/6/2173/233748/The-enzymes-of-the-oxidative-phase-of-the-pentose)
  65. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2024 Oct 22];177:37. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6162185/>
  66. Zhao Y, Ye X, Xiong Z, Ihsan A, Ares I, Martínez M, et al. Cancer Metabolism: The Role of ROS in DNA Damage and Induction of Apoptosis in Cancer Cells. *Metabolites* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2024 Oct 22];13(7):796. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10383295/>
  67. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med* 2020 522 [Internet]. 2020 Feb 14 [cited 2024 Oct 22];52(2):192–203. Available from: <https://www.nature.com/articles/s12276-020-0384-2>

68. Rath S, Das L, Kokate SB, Pratheek BM, Chattopadhyay S, Goswami C, et al. Regulation of Noxa-mediated apoptosis in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *FASEB J* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2024 Oct 22];29(3):796–806. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4422360/>
69. Ediriweera MK, Jayasena S. The Role of Reprogrammed Glucose Metabolism in Cancer. *Metabolites* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 Oct 22];13(3):345. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10051753/>
70. Yu Y, Liu S, Yang L, Song P, Liu Z, Liu X, et al. Roles of reactive oxygen species in inflammation and cancer. *MedComm* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2024 Oct 22];5(4):e519. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10993368/>
71. Badran A, Nasser SA, Mesmar J, El-Yazbi AF, Bitto A, Fardoun MM, et al. Reactive Oxygen Species: Modulators of Phenotypic Switch of Vascular Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Nov 2 [cited 2024 Oct 22];21(22):8764. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7699590/>
72. Schaur RJ, Siems W, Bresgen N, Eckl PM. 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules* [Internet]. 2015 [cited 2024 Nov 21];5(4):2247–337. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26437435/>
73. Cipak Gasparovic A, Zarkovic N, Zarkovic K, Semen K, Kaminskyy D, Yelisyeyeva O, et al. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1771–83.
74. Jaganjac M, Zarkovic N. Lipid Peroxidation Linking Diabetes and Cancer: The Importance of 4-Hydroxynonenal. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Nov 21];37(16–18):1222–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36242098/>
75. Vistoli G, De Maddis D, Straniero V, Pedretti A, Pallavicini M, Valoti E, et al. Exploring the space of histidine containing dipeptides in search of novel efficient RCS sequestering agents. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2013 [cited 2024 Nov 21];66:153–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792353/>
76. Bilska-Wilkosz A, Iciek M, Górny M. Chemistry and Biochemistry Aspects of the 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal. *Biomol* 2022, Vol 12, Page 145 [Internet]. 2022 Jan 16 [cited 2024 Nov 26];12(1):145. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/1/145/html>
77. Doorn JA, Petersen DR. Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chem Res Toxicol*. 2002;15(11):1445–50.
78. Lesgards JF, Frayne IR, Comte B, Busseuil D, Rhéaume É, Tardif JC, et al. Differential distribution of 4-hydroxynonenal adducts to sulfur and nitrogen residues in blood proteins as revealed using Raney nickel and gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009;47(10):1375–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.002>
79. Živković M, Žarković K, Škrinjar L, Waeg G, Poljak-Blaži M, Šunjić SB, et al. A new method for detection of HNE-histidine conjugates in rat inflammatory cells. *Croat Chem Acta*. 2005;78(1):91–8.
80. Jaganjac M, Milkovic L, Gegotek A, Cindric M, Zarkovic K, Skrzydlewska E, et al. The relevance of pathophysiological alterations in redox signaling of 4-hydroxynonenal for pharmacological therapies of major stress-associated diseases. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2020;157:128–

53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.023>
81. Cherkas A, Zarkovic N. 4-hydroxynonenal in redox homeostasis of gastrointestinal mucosa: Implications for the stomach in health and diseases. *Antioxidants*. 2018;7(9):1–14.
82. Milkovic L, Gasparovic AC, Zarkovic N. Overview on major lipid peroxidation bioactive factor 4-hydroxynonenal as pluripotent growth-regulating factor. *Free Radic Res* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2026 Mar 13];49(7):850–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25532703/>
83. Žarković N, Jaganjac M, Žarković K, Gęgotek A, Skrzydlewska E, Žarković N, et al. Spontaneous Regression of Cancer: Revealing Granulocytes and Oxidative Stress as the Crucial Double-edge Sword. *Front Biosci* 2022 27 [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2026 Mar 13];27(4):119. Available from: <https://www.imrpress.com/journal/FBL/27/4/10.31083/j.fbl2704119>
84. Tzeng S-C, Maier CS. Label-Free Proteomics Assisted by Affinity Enrichment for Elucidating the Chemical Reactivity of the Liver Mitochondrial Proteome toward Adduction by the Lipid Electrophile 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). *Front Chem* [Internet]. 2016 Mar 3;4(MAR):1–17. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fchem.2016.00002/abstract>
85. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 11th ed. Philadelphia: Elsevier; 2026. 64–99 p.
86. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2024 Oct 30];8(2):e180–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31862245/>
87. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* [Internet]. 2010 Mar [cited 2024 Oct 30];140(6):883. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2866629/>
88. Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3347–55.
89. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Oct 30];12(1):31–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35022204/>
90. Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol* [Internet]. 2019 May;234(5):5683–99. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.27411>
91. Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* [Internet]. 1994 Sep 15 [cited 2023 Oct 4];302(3):723–7. Available from: </biochemj/article/302/3/723/31187/Structure-of-the-human-cyclo-oxygenase-2-gene>
92. Ji XK, Madhurapantula SV, He G, Wang KY, Song CH, Zhang JY, et al. Genetic variant of cyclooxygenase-2 in gastric cancer: More inflammation and susceptibility. Vol. 27, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co; 2021. p. 4653–66.
93. Cheng J, Fan XM. Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression. *World J Gastroenterol*. 2013;19(42):7361–8.
94. Gou HF, Chen XC, Zhu J, Jiang M, Yang Y, Cao D, et al. Expressions of COX-2 and VEGF-C in gastric cancer: Correlations with lymphangiogenesis and prognostic implications. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):2–9.
95. Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta - Rev*

- Cancer [Internet]. 2000 Mar;1470(2):M69–78. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X00000068>
96. Joo YE, Oh WT, Rew JS, Park CS, Choi SK, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 expression is associated with well-differentiated and intestinal-type pathways in gastric carcinogenesis. *Digestion*. 2002;66(4):222–9.
  97. Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, Stajer D. Cyclooxygenase in normal human tissues - is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *J Cell Mol Med [Internet]*. 2009 Sep 24 [cited 2020 Dec 15];13(9 B):3753–63. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2008.00430.x>
  98. Tatsuguchi A, Yamanaka N, Kobayashi M, Sakamoto C, Wada K, Akamatsu T, et al. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* related gastritis and gastric ulcer tissues in humans. *Gut*. 2000;46(6):782–9.
  99. Zhao J, Wen S, Wang X, Zhang Z. *Helicobacter pylori* modulates cyclooxygenase-2 and 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(5):5519–25.
  100. Hu Z, Hu Y, Jiang H. Overexpression of COX-2 and clinicopathological features of gastric cancer: A meta-analysis. *Transl Cancer Res*. 2020;9(4):2200–9.
  101. van Rees BP, Saukkonen K, Ristimäki A, Polkowski W, Tytgat GNJ, Drillenburger P, et al. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol [Internet]*. 2002 Feb;196(2):171–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1033>
  102. Xiang HG, Xie X, Hu FQ, Xiao HBO, Zhang WJ, Chen L. Cyclooxygenase-2 inhibition as a strategy for treating gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 2014;32(3):1140–8.
  103. Sitarz R, Leguit RJ, De Leng WWJ, Polak M, Morsink FM, Bakker O, et al. The COX-2 promoter polymorphism -765 G>C is associated with early-onset, conventional and stump gastric cancers. *Mod Pathol*. 2008;21(6):685–90.
  104. Kim HG, Ryu SY, Lee KH, Lee JH, Kim DY. Quantitative analysis of COX-2 promoter methylation in gastric carcinoma. *Ann Surg Treat Res*. 2018;95(2):111–20.
  105. Lazăr D, Tăban S, Ardeleanu C, Simionescu C, Sporea I, Cornianu M, et al. Immunohistochemical expression of the cyclooxygenase-2 (COX-2) in gastric cancer. The correlations with the tumor angiogenesis and patients' survival. *Rom J Morphol Embryol*. 2008;49(3):371–9.
  106. Liou JY, Deng WG, Gilroy DW, Shyue SK, Wu KK. Colocalization and Interaction of Cyclooxygenase-2 with Caveolin-1 in Human Fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34975–82.
  107. Wang Y, Wang M. Prognostic significance of expression of cysteine-rich 61 and cyclooxygenase-2 in gastric cancer. *BMC Gastroenterol [Internet]*. 2016;16(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12876-016-0478-4>
  108. Sung JJY, Leung WK, Go MYY, To KF, Cheng ASL, Ng EKW, et al. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol*. 2000;157(3):729–35.
  109. Wang D, DuBois RN. Role of prostanoids in gastrointestinal cancer. *J Clin Invest*. 2018;128(7):2732–42.
  110. Zhang Y, Pan KF, Zhang L, Ma JL, Zhou T, Li J you, et al. *Helicobacter pylori*, cyclooxygenase-2

- and evolution of gastric lesions: Results from an intervention trial in China. *Carcinogenesis*. 2015;36(12):1572–9.
111. Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000;6(2):519–25.
  112. Joo Y-E, Chung I-J, Park Y-K, Koh Y-S, Lee J-H, Park C-H, et al. Expression of Cyclooxygenase-2, p53 and Ki-67 in Gastric Cancer. *J Korean Med Sci [Internet]*. 2006 [cited 2020 Dec 2];21(5):871. Available from: <https://www.jkms.org/Synapse/Data/PDFData/0063JKMS/jkms-21-871.pdf>
  113. Chen Z, Liu M, Liu X, Huang S, Li L, Song B, et al. COX-2 regulates E-cadherin expression through the NF- $\kappa$ B/Snail signaling pathway in gastric cancer. *Int J Mol Med*. 2013;32(1):93–100.
  114. Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer Sci*. 2016;107(4):391–7.
  115. Mao XY, Wang XG, Lv XJ, Xu L, Han CB. COX-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis using tissue microarray. *World J Gastroenterol*. 2007;13(25):3466–71.
  116. Forones NM, Kawamura KY, Segreto HRC, Neto RA, De Azevedo Focchi GR, Oshima CTF. Expression of COX-2 in stomach carcinogenesis. *J Gastrointest Cancer*. 2008 Mar;39(1–4):4–10.
  117. Sun WH, Yu Q, Shen H, Ou XL, Cao DZ, Yu T, et al. Roles of Helicobacter pylori infection and cyclooxygenase-2 expression in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004;10(19):2809–13.
  118. Al-Moundhri MS, Al-Hadabi I, Al-Mawaly K, Kumar S, Al-Lawati FAR, Bhatnager G, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2, epidermal growth factor receptor 1, and microvascular density in gastric cancer. *Med Oncol*. 2012;29(3):1739–47.
  119. Milne ANA, Carvalho R, Morsink FM, Musler AR, De Leng WWJ, Ristimäki A, et al. Early-onset gastric cancers have a different molecular expression profile than conventional gastric cancers. *Mod Pathol*. 2006 Jan 1;19(4):564–72.
  120. Gurzu S, Orłowska J, Sugimura H, Bara T, Szentirmay Z, Januszewicz W, et al. Immunohistochemical features and staging of early gastric cancer. *Arch Med Sci*. 2017;13(6):1373–82.
  121. Hung JH, Su IJ, Lei HY, Wang HC, Lin WC, Chang WT, et al. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF- $\kappa$ B and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem [Internet]*. 2004 Nov 5 [cited 2024 Dec 10];279(45):46384–92. Available from: <http://www.jbc.org/article/S002192582069843X/fulltext>
  122. Mera RM, Bravo LE, Constanza Camargo M, Bravo JC, Delgado AG, Romero-Gallo J, et al. Dynamics of Helicobacter pylori infection as a determinant of progression of gastric precancerous lesions: 16-year follow-up of an eradication trial. *Gut*. 2018;67(7):1239–46.
  123. Taniguchi K, Karin M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nat Rev Immunol [Internet]*. 2018;18(5):309–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.142>
  124. Brkić N, Švagelj D, Omazić J. Pathohistological Changes in the Gastric Mucosa in Correlation with the Immunohistochemically Detected Spiral and Coccoid Forms of Helicobacter pylori.

- Microorganisms [Internet]. 2024 Jun 1 [cited 2026 Mar 16];12(6):1060. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11206044/>
125. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 1983 Dec 16 [cited 2026 Mar 16];65(1–2):55–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6606682/>
  126. Poljak-Blazi M, Jaganjac M, Sabol I, Mihaljevic B, Matovina M, Grce M. Effect of ferric ions on reactive oxygen species formation, cervical cancer cell lines growth and E6/E7 oncogene expression. *Toxicol In Vitro* [Internet]. 2011 Feb [cited 2026 Mar 16];25(1):160–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21044880/>
  127. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria; 2025. Available from: <https://www.r-project.org/>
  128. Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX. *Applied Logistic Regression* [Internet]. 3rd ed. New York: Wiley; 2013. (Wiley Series in Probability and Statistics). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118548387>
  129. Durant TJS, Peaper DR, Ferguson D, Schulz WL. Impact of COVID-19 Pandemic on Laboratory Utilization. *J Appl Lab Med* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2026 Mar 11];5(6):1194–205. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/jalm/jfaa121>
  130. Jindal S, Pennock N, Klug A, Narasimhan J, Calhoun A, Roberts M, et al. S-nitrosylated and non-nitrosylated COX2 has differential expression and distinct subcellular localization in normal and breast cancer tissue. 2020;
  131. Alexanian A, Sorokin A. General Interest: Cyclooxygenase 2: protein-protein interactions and posttranslational modifications. *Physiol Genomics* [Internet]. 2017 Nov 11 [cited 2023 Oct 24];49(11):667. Available from: [/pmc/articles/PMC5792139/](https://pmc/articles/PMC5792139/)
  132. Bakir WA. Immunohistochemical assessment of Cox-2, and ki- 67 expression in gastric cancer. *Iraqi J Cancer Med Genet*. 2018;7(1):16–20.
  133. Ugraş N, Özgün G, Ocakoğlu G, Yerci Ö, Öztürk E. Relationship between HER-2, COX-2, p53 and clinicopathologic features in gastric adenocarcinoma. Do these biomarkers have any prognostic significance? *Turk J Gastroenterol*. 2014;25:176–81.
  134. Ayed-Guerfali D Ben, Charfi S, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Clinical and prognosis relevance of COX-2 expression in Tunisian patients with primary gastric adenocarcinoma. *Cancer Biomarkers*. 2016;17(1):67–73.
  135. Lee JY, Kim N. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology. *Ann Transl Med* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2026 Mar 11];3(1):10. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4293485/>
  136. Koc DO, Kimiloglu E. Relation of cyclooxygenase-2 expression with premalignant gastric lesions. *Acta Gastroenterol Belg*. 2020;83(2):249–54.
  137. J. Eduardo Calonje Thomas Brenn Alexander Lazar Steven Billings. *McKee's Pathology of the Skin 5th Edition*. Elsevier Ltd; 2019. 1980 p.
  138. Chen XL, Su BS, Sun RQ, Zhang J, Wang YL. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2005 Feb 28 [cited 2026 Mar 30];11(8):1228–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15754411/>
  139. KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined

- specificity. *Nature* [Internet]. 1975 Aug 1;256(5517):495–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/256495a0>
140. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2021.
  141. Thanan R, Murata M, Ma N, Hammam O, Wishahi M, El Leithy T, et al. Nuclear localization of COX-2 in relation to the expression of stemness markers in urinary bladder cancer. *Mediators Inflamm*. 2012;2012.
  142. Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* [Internet]. 2005 Dec 23 [cited 2026 Mar 11];310(5756):1966–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16373578/>
  143. Li CQ, Pignatelli B, Ohshima H. Increased oxidative and nitrative stress in human stomach associated with cagA+ *Helicobacter pylori* infection and inflammation. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2001 [cited 2026 Mar 11];46(4):836–44. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1010764720524>
  144. Sharma V, Fernando V, Letson J, Walia Y, Zheng X, Fackelman D, et al. S-Nitrosylation in Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 2021, Vol 22, Page 4600 [Internet]. 2021 Apr 27 [cited 2026 Mar 24];22(9):4600. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/4600/htm>
  145. Cherkas A, Yelisyeyeva O, Semen K, Žarković K, Kaminsky D, Gašparović AČ, et al. Persistent accumulation of 4-hydroxynonenal-protein adducts in gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication. *Coll Antropol*. 2009;33(3):815–21.
  146. Yelisyeyeva O, Cherkas A, Zarkovic K, Semen K, Kaminsky D, Waeg G, et al. The distribution of 4-hydroxynonenal-modified proteins in gastric mucosa of duodenal peptic ulcer patients. *Free Radic Res*. 2008;42(3):205–11.
  147. Capelle LG, de Vries AC, Haringsma J, Ter Borg F, de Vries RA, Bruno MJ, et al. The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. *Gastrointest Endosc* [Internet]. 2010 Jun [cited 2026 Mar 11];71(7):1150–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20381801/>
  148. Lerch JM, Pai RK, Brown I, Gill AJ, Jain D, Kóvári B, et al. Subtyping intestinal metaplasia in patients with chronic atrophic gastritis: an interobserver variability study. *Pathology* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2026 Mar 11];54(3):262–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031302522000393>
  149. Tamura K, Tomita Y, Kanazawa T, Shinohara H, Sakano M, Ishibashi S, et al. Lipid Peroxidation Regulators GPX4 and FSP1 as Prognostic Markers and Therapeutic Targets in Advanced Gastric Cancer. *Int J Mol Sci* 2024, Vol 25, Page 9203 [Internet]. 2024 Aug 24 [cited 2026 Mar 19];25(17):9203. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/17/9203/htm>
  150. Weber D, Lanci R. Lipid peroxidation and cancer. *Cancer Adv*. 2021;4(6).
  151. Zhang H, Morgan TE, Forman HJ. Age-related alteration in HNE elimination enzymes. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2021 Mar 15 [cited 2026 Mar 11];699:108749. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986120307578>
  152. Ioannidis M, Maassen S, Boekhoud L, Ouden M den, Simioniuc M, Grijpstra P, et al. 4-Hydroxynonenal suppresses IL-10 production during infection. *bioRxiv* [Internet]. 2025 Nov 25 [cited 2026 Mar 19];2025.11.24.690094. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.11.24.690094v1>

153. Yamagata R, Shimoyama T, Fukuda S, Yoshimura T, Tanaka M, Munakata A. Cyclooxygenase-2 expression is increased in early intestinal-type gastric cancer and gastric mucosa with intestinal metaplasia. Vol. 14, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
154. Erkan G, Gönül İI, Kandilci U, Dursun A. Assessment of COX-2 expression presence and severity by immunohistochemical method in patients with chronic active gastritis and intestinal metaplasia. *Turkish J Gastroenterol*. 2012;23(5):478–84.
155. Loukanov T, Kirilov M, Fürstenberger G, Müller-Decker K. Localization of cyclo-oxygenase-2 in human recurrent colorectal cancer. <https://doi.org/10.25011/cim.v33i111834> [Internet]. 2023 Dec 21 [cited 2026 Mar 23];33(1). Available from: </doi/pdf/10.25011/cim.v33i1.11834?download=true>
156. Ling L, Kaichun W, Yongzhan N, Hanping W, Chunmei W, Daiming F. Expression and subcellular location of COX-2 in human gastric cancer cells. *Chin J Dig Dis* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2026 Mar 23];2(2):61–4. Available from: </doi/pdf/10.1046/j.1443-9573.2001.00030.x>
157. Subbarayan V, Sabichi AL, Llansa N, Lippman SM, Menter DG. Differential expression of cyclooxygenase-2 and its regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal and malignant prostate cells. *Cancer Res*. 2001;61(6):2720–6.
158. Wang Z. Protein S-nitrosylation and cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2012 Jul 28 [cited 2026 Mar 23];320(2):123–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383512001681>
159. Kalinina E V., Novichkova MD. S-Glutathionylation and S-Nitrosylation as Modulators of Redox-Dependent Processes in Cancer Cell. *Biochem* 2023 887 [Internet]. 2023 Jul 20 [cited 2026 Mar 23];88(7):924–43. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0006297923070064>
160. Sun J, Steenbergen C, Murphy E. S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal* [Internet]. 2006 Sep [cited 2026 Mar 23];8(9–10):1693–705. Available from: </doi/pdf/10.1089/ars.2006.8.1693?download=true>
161. Xu L, Han C, Lim K, Wu T. Activation of Cytosolic Phospholipase A $2\alpha$  through Nitric Oxide-induced S-Nitrosylation: INVOLVEMENT OF INDUCIBLE NITRIC-OXIDE SYNTHASE AND CYCLOOXYGENASE-2. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Feb 8 [cited 2026 Mar 23];283(6):3077–87. Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003101>
162. Dasgupta S, Gomez J-J, Singh I, Khan M. S-Nitrosylation in Regulation of Inflammation and Cell Damage. *Curr Drug Targets*. 2018 Feb 14;19(15):1831–8.
163. Kim YJ, Kim E-H, Hahm KB. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: Challenges and opportunities. 2012 [cited 2026 Mar 24]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1746.2012.07108.x>
164. Kimura H, Mukaida M, Kuwabara K, Ito T, Hashino K, Uchida K, et al. 4-Hydroxynonenal modifies IgA in rat intestine after lipopolysaccharide injection. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2006 Sep 15 [cited 2026 Mar 24];41(6):973–8. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.311>
165. Zarkovic N, Jakovcevic A, Mataic A, Jaganjac M, Vukovic T, Waeg G, et al. Post-mortem Findings of Inflammatory Cells and the Association of 4-Hydroxynonenal with Systemic Vascular and Oxidative Stress in Lethal COVID-19. *Cells* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2026 Mar 24];11(3):444. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/3/444/htm>

166. Wu J, Liu Q, Zhang X, Tan M, Li X, Liu P, et al. The interaction between STING and NCOA4 exacerbates lethal sepsis by orchestrating ferroptosis and inflammatory responses in macrophages. *Cell Death Dis* 2022 137 [Internet]. 2022 Jul 28 [cited 2026 Mar 24];13(7):653-. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-022-05115-x>
167. Bauer G, Zarkovic N. Revealing mechanisms of selective, concentration-dependent potentials of 4-hydroxy-2-nonenal to induce apoptosis in cancer cells through inactivation of membrane-associated catalase. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2015;81:128–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.010>
168. Duan Y, Gao Y, Zhang J, Chen Y, Jiang Y, Ji J, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 protects gastric mucosa cells against DNA damage caused by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2016;93:165–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.001>
169. Jung KA, Kwak MK. Enhanced 4-Hydroxynonenal Resistance in KEAP1 Silenced Human Colon Cancer Cells. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2026 Mar 23];2013(1):423965. Available from: [/doi/pdf/10.1155/2013/423965](https://doi.org/10.1155/2013/423965)
170. Cindric M, Cipak A, Zapletal E, Jaganjac M, Milkovic L, Waeg G, et al. Stobadine attenuates impairment of an intestinal barrier model caused by 4-hydroxynonenal. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2026 Mar 23];27(1):426–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233312002093>
171. Sedlic F, Kovac Z. Non-linear actions of physiological agents: Finite disarrangements elicit fitness benefits. *Redox Biol*. 2017;13(April):235–43.
172. Raza H, John A. 4-Hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2006 Oct 15 [cited 2026 Mar 23];216(2):309–18. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041008X06001980>
173. Zhong H, Yin H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2026 Mar 23];4(4–5):193–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/713803728>
174. Hu C, Xu J, Zhang Y, Zhang R, Pan S, Chen J, et al. Inhibition of glutathione peroxidase 4 suppresses gastric cancer peritoneal metastasis via regulation of RCC2 homeostasis. *Redox Biol* [Internet]. 2025 Mar 1 [cited 2026 Mar 23];80(3):103519. Available from: <https://doi.org/10.3322/caac.21657>
175. Kumagai T, Usami H, Matsukawa N, Nakashima F, Chikazawa M, Shibata T, et al. Functional interaction between cyclooxygenase-2 and p53 in response to an endogenous electrophile. *Redox Biol* [Internet]. 2015;4:74–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25506925>
176. Balko S, Kerr E, Buchel E, Logsetty S, Raouf A. A Robust and Standardized Approach to Quantify Wound Closure Using the Scratch Assay. *Methods Protoc* [Internet]. 2023 Oct 1 [cited 2026 Apr 11];6(5):87. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10514857/>
177. Cortesi M, Pasini A, Tesei A, Giordano E. AIM: A Computational Tool for the Automatic Quantification of Scratch Wound Healing Assays. *Appl Sci* 2017, Vol 7, Page 1237 [Internet]. 2017 Nov 29 [cited 2026 Apr 11];7(12):1237. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3417/7/12/1237/htm>

178. Gasparovic AC, Milkovic L, Sunjic SB, Zarkovic N. Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2026 Apr 1];111:226–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584917300394>
179. Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress:4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ* [Internet]. 2013 Dec 4 [cited 2026 Apr 11];20(12):1615–30. Available from: <https://www.nature.com/articles/cdd2013138>
180. Zhong T, Li Y, Jin M, Liu J, Wu Z, Zhu F, et al. Downregulation of 4-HNE and FOXO4 collaboratively promotes NSCLC cell migration and tumor growth. *Cell Death Dis* 2024 157 [Internet]. 2024 Jul 31 [cited 2026 Mar 26];15(7):546-. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-024-06948-4>
181. Zhu M, Hu Q, Lu Y, Xu Q, Huang H, Chen K, et al. Quercetin inhibits gastric cancer cell proliferation and migration and is associated with the suppression of the IDO1-Kynurenine-AhR axis. *BMC Cancer* [Internet]. 2025 Dec 1 [cited 2026 Mar 26];25(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41286700/>
182. Liu J, Li SM, Tang YJ, Cao JL, Hou WS, Wang AQ, et al. Jaceosidin induces apoptosis and inhibits migration in AGS gastric cancer cells by regulating ROS-mediated signaling pathways. *Redox Rep* [Internet]. 2024 [cited 2026 Mar 26];29(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38318818/>
183. Roy B, Sundar K, Palaniyandi SS. 4-hydroxy-2-nonenal decreases coronary endothelial cell migration: Potentiation by aldehyde dehydrogenase 2 inhibition. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2026 Apr 11];131:106762. Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1537189119303507?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1537189119303507?utm_source=chatgpt.com)
184. Sonowal H, Ramana K V. 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal in the Regulation of Anti-Oxidative and Pro-Inflammatory Signaling Pathways. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2026 Mar 23];2019(1):5937326. Available from: [/doi/pdf/10.1155/2019/5937326](https://doi.org/10.1155/2019/5937326)
185. Leonarduzzi G, Robbesyn F, Poli G. Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2026 Apr 1];37(11):1694–702. Available from: <https://doi.org/10.3109/10715769809065811>
186. Wang Y, Zheng L, Shang W, Yang Z, Li T, Liu F, et al. Wnt/beta-catenin signaling confers ferroptosis resistance by targeting GPX4 in gastric cancer. *Cell Death Differ* 2022 2911 [Internet]. 2022 May 9 [cited 2026 Apr 11];29(11):2190–202. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41418-022-01008-w>
187. Yang L, Zeng M, Li B, Li Q, Sun Y, Wang B, et al. UBE2C-mediated ubiquitination of ACSL4 inhibits ferroptosis and promotes gastric cancer progression. *Discov Oncol* [Internet]. 2025 Dec 1 [cited 2026 Mar 26];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40813933/>
188. Yan N, Li G, Zhao L, Guo Q, Yang J, Liu J, et al. Crocin promotes ferroptosis in gastric cancer via the Nrf2/GGTLC2 pathway. *Front Pharmacol* [Internet]. 2025 Mar 21 [cited 2026 Mar 26];16:1527481. Available from: <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>
189. Uchida K. HNE as an inducer of COX-2. *Free Radic Biol Med*. 2017;111:169–72.
190. Zarrouki B, Soares AF, Guichardant M, Lagarde M, Gélouën A. The lipid peroxidation end-product 4-HNE induces COX-2 expression through p38MAPK activation in 3T3-L1 adipose cell. *FEBS Lett* [Internet]. 2007 May 29 [cited 2025 Feb 3];581(13):2394–400. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2007.04.048>

191. Kumagai T, Kawamoto Y, Nakamura Y, Hatayama I, Satoh K, Osawa T, et al. 4-hydroxy-2-nonenal, the end product of lipid peroxidation, is a specific inducer of cyclooxygenase-2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2000 Jul 5 [cited 2025 Feb 3];273(2):437–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10873624/>
192. Zhang H, Forman HJ. 4-hydroxynonenal-mediated signaling and aging. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2026 Mar 13];111:219–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27876535/>
193. Tammali R, Ramana K V., Singhal SS, Awasthi S, Srivastava SK. Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Oct 1 [cited 2026 Mar 13];66(19):9705–13. Available from: <https://researchexperts.utmb.edu/en/publications/aldose-reductase-regulates-growth-factor-induced-cyclooxygenase-2/>
194. Chen SH, Fahmi H, Shi Q, Benderdour M. Regulation of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase-activating protein/5-lipoxygenase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2010 121 [Internet]. 2010 Feb 9 [cited 2026 Mar 23];12(1):R21-. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/ar2926>

## 9 DODATAK

Tablica D1. Post-hoc analiza standardiziranih reziduala za CX-294 bojenje (3 kategorije)

Tip uzorka	0	1	2
uredni	-1.52	3.45 *	-2.37
atrofija	0.76	0.81	-1.94
metaplazija	-3.53 *	6.04 *	-3.09 *
atr_mtpl	0.98	0.58	-1.93
displazija	3.59 *	-4.03 *	0.53
karcinom	0.3	-6.03 *	7.07 *

Tablica prikazuje standardizirane reziduale za pojedina polja kontingencijske tablice trostupanjske klasifikacije CX-294 bojenja (0 - negativno, 1 - membransko, 2 - citoplazmatsko/perijejzgreno) po histološkim stadijima Correa kaskade. Pozitivne vrijednosti označavaju veći, a negativne vrijednosti manji udio opaženih frekvencija u odnosu na očekivane. Zvezdicom (\*) su označene ćelije koje statistički značajno doprinose ukupnoj razlici nakon Holm-korekcije ( $p < 0,05$ ).

Tablica D2. Post-hoc analiza standardiziranih reziduala za CX-294 bojenje (četiri kategorije).

Tip uzorka	0	1b	1c	2
uredni	-1.52	8.65 *	-2.88	-2.37
atrofija	0.76	2.55	-1.08	-1.94
metaplazija	-3.53 *	-2.48	8.63 *	-3.09 *
atr_mtpl	0.98	-2.01	2.20	-1.93
displazija	3.59 *	-1.96	-2.96	0.53
karcinom	0.30	-2.93	-4.43 *	7.07 *

Vrijednosti predstavljaju standardizirane Pearsonove reziduale za pojedine kombinacije histološke skupine i obrasca bojenja. Pozitivne vrijednosti označavaju veću, a negativne manju zastupljenost od očekivane prema modelu nezavisnosti. Statistički značajne devijacije nakon Holmove korekcije označene su zvezdicom (\*,  $p < 0,05$ ).

Tablica D3. Post-hoc Dunnova analiza citoplazmatskog bojenja SP21 između histoloških skupina

Skupine	Z-vrijednost	p	Značajnost
atr_mtpl vs atrofija	1.38	0.21021	
atr_mtpl vs displazija	2.74	0.01306	*
atrofija vs displazija	1.06	0.31002	
atr_mtpl vs karcinom	4.35	< 0.001	***
atrofija vs karcinom	2.20	0.04666	*
displazija vs karcinom	1.18	0.27669	
atr_mtpl vs metaplazija	-0.25	0.80180	
atrofija vs metaplazija	-1.68	0.13929	
displazija vs metaplazija	-3.21	0.00401	**
karcinom vs metaplazija	-5.11	< 0.001	***
atr_mtpl vs uredni	5.09	< 0.001	***
atrofija vs uredni	3.16	0.00398	**
displazija vs uredni	2.35	0.03505	*
karcinom vs uredni	1.53	0.17314	
metaplazija vs uredni	5.72	< 0.001	***

Parne usporedbe provedene su Dunnovim testom uz Benjamini-Hochberg korekciju za višestruka testiranja. Prikazane su Z-vrijednosti, korigirane p-vrijednosti i razina statističke značajnosti. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 (Benjamini-Hochberg korekcija za višestruka testiranja).

Tablica D4. Parne usporedbe učestalosti jezgrene pozitivnosti SP21 između histoloških skupina (Fisherov egzaktni test uz Holm korekciju).

Usporedba	p (raw)	p (Holm)	Značajnost
metaplazija vs karcinom	<0.001	<0.001	***
atr_mtpl vs karcinom	<0.001	<0.001	***
uredni vs karcinom	<0.001	<0.001	***
atrofija vs karcinom	<0.001	5.26e-03	**

displazija vs karcinom	3.99e-03	2.00e-02	*
metaplazija vs displazija	1.58e-01	6.33e-01	
atr_mtpl vs displazija	2.33e-01	6.98e-01	
uredni vs displazija	4.88e-01	9.76e-01	
atrofija vs displazija	5.06e-01	9.76e-01	

Fusnota: Globalna usporedba svih skupina bila je statistički značajna ( $p = <0.001$ ).  $p$  (Holm) predstavlja  $p$ -vrijednosti prilagođene Holm metodom. Značajnost: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Tablica D5. Post-hoc Dunnove usporedbe intenziteta citoplazmatskog bojenja 4-HNE-PA između histoloških skupina (Benjamini-Hochberg korekcija).

Usporedba	Z	p (raw)	p (BH)	Značajnost
karcinom vs uredni	7.930	<0.001	<0.001	***
metaplazija vs uredni	6.140	<0.001	<0.001	***
atrofija vs karcinom	-5.773	<0.001	<0.001	***
displazija vs uredni	5.814	<0.001	<0.001	***
atr_mtpl vs uredni	5.688	<0.001	<0.001	***
atrofija vs metaplazija	-4.291	<0.001	<0.001	***
atrofija vs displazija	-4.166	<0.001	<0.001	***
atr_mtpl vs atrofija	4.032	<0.001	<0.001	***
karcinom vs metaplazija	1.717	0.086	0.143	
atr_mtpl vs karcinom	-1.561	0.119	0.178	
displazija vs karcinom	-1.318	0.187	0.256	
atrofija vs uredni	1.088	0.277	0.346	
atr_mtpl vs displazija	-0.194	0.846	0.907	
displazija vs metaplazija	0.197	0.844	0.974	
atr_mtpl vs metaplazija	-0.012	0.990	0.990	

Fusnota:  $p$  (BH) su  $p$ -vrijednosti prilagođene Benjamini-Hochberg (FDR) metodom. Značajnost: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Tablica D6. Analiza osjetljivosti binarnih modela nakon isključenja urednih uzoraka

Tip modela	Prediktori	logLik	df	AIC	BIC	Mcfadden R <sup>2</sup>
Binarni (bias-reduced)	Biomarkeri	-18.1	9	<b>54.2</b>	79.8	0.796
Binarni (bias-reduced)	Biomarkeri + Klinički pouzdane varijable	-16.3	12	56.7	90.9	0.815
Binarni (bias-reduced)	Biomarkeri + Prošireni skup kliničkih varijabli	-14.9	16	61.8	107.4	0.832

Tablica D7. Analiza osjetljivosti binarnih modela nakon isključenja urednih uzoraka i atrofije

Tip modela	Prediktori	logLik	df	AIC	BIC	Mcfadden R <sup>2</sup>
Binarni (bias-reduced)	Biomarkeri	-16.6	8	<b>49.1</b>	71.0	0.790
Binarni (bias-reduced)	Biomarkeri + Klinički pouzdane varijable	-15.2	11	52.3	82.4	0.807
Binarni (bias-reduced)	Biomarkeri + Prošireni skup kliničkih varijabli	-14.0	15	58.0	99.0	0.822

Tablica D8. Razlike u metodologiji imunohistokemijskog izvještavanja i korištenim klonovima protutijela za detekciju COX-2 u želučanom tkivu

Studija	Klon protutijela	Tip protutijela	Opisani obrazac bojenja	Metoda IHK bodovanja
Shao i sur.; Sun i sur. (28,30)	SCB	Poliklonsko	C + PN	Postotak pozitivnih stanica (1000 stanica); <5% negativno, 5-29% slabo, 30-59% umjereno, >60% jako
Sung i sur. (24)	SCB; CC	Poliklonsko	C	Postotak pozitivnih stanica; <5% negativno, 5-29% pozitivno, 30-59% jako, >60% vrlo jako
Lim i sur. (23)	SCB	Poliklonsko	C	Imunoreaktivni skor (postotak × intenzitet)
Tatsuguchi i sur. (37)	Immunobiological Laboratories	Poliklonsko	C + PN	Svaka pozitivna mezenhimska stanica smatrana je pozitivnom
Lazăr i sur. (29)	-	Monoklonsko	C + PN	Skor = postotak + intenzitet; skor >3 = pozitivno
Forones i sur. (27)	CC	Monoklonsko	C + N	Postotni skor; >1 = pozitivno
van Rees i sur. (12)	CC (160112)	Monoklonsko	C + PN	Skor = intenzitet × površina; skor >5 = pozitivno

Tiwari i sur. (13)	SCB	Poliklonsko	bilo koji obrazac	Postotak pozitivnih stanica
Zhang i sur. (14)	CC	Monoklonsko	bilo koji obrazac	Kombinirani skor intenziteta i površine
Joo i sur. (11)	CC (160112)	Monoklonsko	C	Skor = intenzitet × površina; skor >4 = pozitivno
Gou i sur. (17)	Goldenbridge Biotechnology	Monoklonsko	C	IHS skor = intenzitet × površina
Sitarz i sur. (32)	CC	Monoklonsko	C	Postotak pozitivnih stanica
Xiang i sur. (42)	-	-	C	Izražajni skor = intenzitet × površina
Joo i sur. (39)	CC	Monoklonsko	C + PN	Skor = intenzitet × površina
Mao i sur. (21)	Maixin Bio	Monoklonsko	C + N	Postotak pozitivnih stanica
Al-Moundhri i sur. (31)	DAKO CX-294	Monoklonsko	C	Bodovanje prema intenzitetu
Wang i sur. (20)	Baosen	Monoklonsko	C	<25% pozitivnih stanica = niski izražaj; ≥25% = visoki izražaj
Ugraš i sur. (40)	SP21 (Cell Marque)	Monoklonsko	C + MEMB	Svaka imunoreaktivnost tumorskih stanica smatrana je pozitivnom
Ayed-Guerfali i sur. (41)	SCB (M-19)	Poliklonsko	bilo koji obrazac	Izražajni skor = intenzitet × površina
Zhao i sur. (15)	CC (160112)	Monoklonsko	bilo koji obrazac	>10% pozitivnih stanica = pozitivan uzorak
Bakir i sur. (38)	SCB (J1602)	Poliklonsko	C	>5% pozitivnih tumorskih stanica = pozitivno
Ova studija	DAKO CX-294	Monoklonsko	MEMB + C + PN	Membranski obrazac interpretiran kao benigni; citoplazmatski/periježgri obrazac ili gubitak bojenja interpretiran kao maligni
Ova studija	SP21 (ThermoFisher)	Monoklonsko	C + N	Citoplazmatska reakcija ocjenjivana je semikvantitativno prema intenzitetu bojenja na skali od 0 do 3 (0 - vrlo slaba reakcija, 1 - slaba homogena reakcija, 2 - miješana slaba reakcija, 3 - srednje jaka do jaka reakcija). Jezgrena pozitivnost je bilježena binarno (0 - negativno, 1 - pozitivno).

**Kratice:** SCB - Santa Cruz Biotechnology; CC - Cayman Chemicals; C - citoplazmatsko; PN - periježgri; N - jezgri; MEMB - membransko bojenje.

Tablica D9. Subcelularna lokalizacija COX-2 u objavljenim imunohistokemijskim studijama želučanog tkiva

Studija	Klon protutijela	Citoplazmatsko	Perijejzreno	Jezgreno	Membransko
Shao i sur.; Sun i sur. (28,30)	SCB	✓	✓	-	-
Sung i sur. (24)	SCB; CC	✓	-	-	-
Lim i sur. (23)	SCB	✓	-	-	-
Tatsuguchi i sur. (37)	IBL	✓	✓	-	-
Lazăr i sur. (29)	-	✓	✓	-	-
Forones i sur. (27)	CC	✓	-	✓	-
van Rees i sur. (12)	CC (160112)	✓	✓	-	-
Tiwari i sur. (13)	SCB	✓	-	-	-
Zhang i sur. (14)	CC	✓	-	-	-
Joo i sur. (11)	CC (160112)	✓	-	-	-
Gou i sur. (17)	Goldenbridge	✓	-	-	-
Sitarz i sur. (32)	CC	✓	-	-	-
Xiang i sur. (42)	-	✓	-	-	-
Joo i sur. (39)	CC	✓	✓	-	-
Mao i sur. (21)	Maixin Bio	✓	-	✓	-
Al-Moundhri i sur. (31)	CX-294	✓	-	-	-
Wang i sur. (20)	Baosen	✓	-	-	-
Ugraš i sur. (40)	SP21	✓	-	-	✓
Ayed-Guerfali i sur. (41)	SCB	✓	-	-	-
Zhao i sur. (15)	CC (160112)	✓	-	-	-
Bakir i sur. (38)	SCB	✓	-	-	-
Ova studija	CX-294	✓	✓	-	✓
Ova studija	SP21	✓	-	✓	-

Tablica D10. Pregled imunohistokemijskog izražaja COX-2 kroz stadije Correa kaskade u prethodnim istraživanjima

Studija	Uredna sluznica	Kronični gastritis	Atrofija	Intestinalna metaplazija	Displazija	Karcinom
Shao i sur.; Sun i sur. (28,30)	negativno	~10 % pozitivno	36 % pozitivno	38 % pozitivno	42 % pozitivno	70 % pozitivno

Sung i sur. (24)	35 % pozitivno	jaki izražaj	jaki izražaj	59 % jaki	-	56 % jaki
Lim i sur. (23)	-	-	-	jaki izražaj	-	umjeren do jak
Tatsuguchi i sur. (37)	negativno	negativno u epitelu	-	pozitivno	-	-
Lazăr i sur. (29)	<5 % pozitivno	-	-	9 % pozitivno	36 % pozitivno	57 % pozitivno
Forones i sur. (27)	-	~84 % pozitivno	-	~96 % pozitivno	-	85 % pozitivno
van Rees i sur. (12)	21 % pozitivno	-	-	30 % pozitivno	80-88 % pozitivno	62 % pozitivno
Tiwari i sur. (13)	negativno	niski izražaj	rast izražaja	Viši izražaj	visoki izražaj	visoki izražaj
Zhang i sur. (14)	~43 % pozitivno	~60 % pozitivno	-	~80 % pozitivno	~85 % pozitivno	-
Joo i sur. (11)	negativno	-	-	-	-	61 % pozitivno
Gou i sur. (17)	negativno	-	-	-	-	70 % visoki izražaj
Sitarz i sur. (32)	-	-	-	-	-	14-69 % visoki izražaj
Xiang i sur. (42)	53 % pozitivno	-	-	-	-	80 % pozitivno
Joo i sur. (39)	negativno	-	-	-	-	61 % pozitivno
Mao i sur. (21)	59 % pozitivno	-	-	-	-	87 % pozitivno
Al-Moundhri i sur. (31)	-	-	-	-	-	89,6 % pozitivno
Wang i sur. (20)	miješani izražaj	-	-	-	-	62% visoki izražaj
Ugraş i sur. (40)	vrlo niska	-	-	-	-	50 % pozitivno
Ayed-Guerfali i sur. (41)	Slab izražaj	-	-	-	-	48 % umjeren/jaka
Zhao i sur. (15)	~15 % pozitivno	-	-	-	-	67-97 % pozitivno
Bakir i sur. (38)	9 % pozitivno	-	-	-	-	70 % pozitivno

<b>Ova studija - CX-294</b>	membranski obrazac	membranski obrazac	membranski obrazac	membranski obrazac	citoplazmatski /periježgri obrazac	citoplazmatski /periježgri obrazac + gubitak bojenja
<b>Ova studija - SP21</b>	nizak izražaj (medijan 0)	visoki izražaj (medijan 3)	visoki izražaj (medijan 3)	visoki izražaj (medijan 3)	umjeren izražaj (medijan 2)	umjeren i heterogen izražaj (medijan 2)

Tablica D11. Reagensi korišteni u istraživanju

Metoda / primjena	Reagens	Proizvođač
<b>Histološka obrada tkiva</b>	10 % neutralno puferirani formalin	BioGnost, Zagreb, Hrvatska
	Parafin za uklapanje tkiva	Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
	Mayer's hemalum solution	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
	Eosin Y solution 0.5% aqueous	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
<b>Imunohistokemijska analiza</b>	EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
	Target Retrieval Solution, High pH	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
	EnVision FLEX Antibody Diluent	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
	EnVision FLEX/HRP	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
	EnVision FLEX DAB+ Chromogen	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
	EnVision FLEX Hematoxylin	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
	Phosphate-buffered saline (PBS)	Grammol, Zagreb, Hrvatska
	Protutijelo na COX-2 (klon CX-294; 1:100)	Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Danska
	Protutijelo na COX-2 (klon SP21; 1:200)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD
	Protutijelo na 4-HNE-proteinske adukte (klon HNEJ-2; 1:350)	Abcam, Cambridge, UK
<b>Uzgoj i održavanje staničnih kultura</b>	Protutijelo na <i>Helicobacter pylori</i> (B0471; 1:150)	Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Danska
	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD
	Fetalni teleći serum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

	Phosphate-buffered saline (PBS)	Grammol, Zagreb, Hrvatska
	Trypsin-EDTA 1 %	Kemika, Zagreb, Hrvatska
	Tripano modriilo (Trypan Blue)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
<b>MTT test (citotoksičnost)</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka
	Dimetil sulfoksid (DMSO)	Supelco, Merck, Darmstadt, Njemačka
<b>Analiza oksidacijskog stresa (ROS)</b>	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
<b>Test migracije stanica (scratch test)</b>	Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka

## 10 SAŽETAK

U ovom istraživanju analizirana je dinamika izražaja i subcelularne lokalizacije biomarkera lipidne peroksidacije 4-HNE-proteinskih adukata (4-HNE-PA) i enzima COX-2 duž stadija Correa kaskade, kao modela razvoja intestinalnog tipa karcinoma želuca. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da je progresija želučane karcinogeneze obilježena fazno-specifičnim promjenama u izražaju ovih biomarkera, pri čemu se različiti patobiološki mehanizmi postupno nadovezuju tijekom prijelaza od uredne sluznice preko prekanceroznih stanja i lezija do invazivnog karcinoma. Jedan od ključnih nalaza ovog istraživanja jest da se citoplazmatsko nakupljanje 4-HNE-PA značajno povećava već u ranim stadijima, osobito u intestinalnoj metaplaziji, te ostaje povišeno kroz daljnju progresiju bolesti. Ovakav obrazac upućuje na to da oksidacijski stres i lipidna peroksidacija predstavljaju rani i perzistentni događaj u želučanoj karcinogenezi, a ne isključivo posljedicu maligne transformacije. Dodatno, specifično nakupljanje 4-HNE-PA u vakuolama vrčastih stanica te njegov porast sa stupnjem intestinalne metaplazije sugeriraju potencijalnu ulogu ovog biomarkera kao pokazatelja biološke aktivnosti lezije i mogućeg rizika progresije. Međutim, njegova diskriminacijska vrijednost u razlikovanju benignih i malignih promjena je ograničena, budući da ostaje povišen već u prekanceroznim stanjima. Nasuprot tome, COX-2 pokazuje kompleksniji i dinamičniji obrazac promjena. Izražaj detektiran klonom SP21 raste u prekanceroznim stanjima, osobito u intestinalnoj metaplaziji, nakon čega dolazi do blagog pada u displaziji i karcinomu, uz istodobno povećanje heterogenosti izražaja. Istodobno se u kasnijim stadijima pojavljuje jezgrena lokalizacija COX-2, gotovo isključivo ograničena na karcinome, što upućuje na promjene u funkcionalnoj ulozi proteina tijekom maligne transformacije. Klon CX-294 dodatno otkriva važnu promjenu u subcelularnoj distribuciji, s gubitkom membranskog obrasca u ranim stadijima i pojavom citoplazmatsko/perijejgrene lokalizacije u displaziji i karcinomu. Ovi nalazi ukazuju da promjene u lokalizaciji COX-2 imaju veću dijagnostičku i biološku vrijednost od same razine izražaja. Multivarijatni modeli dodatno su potvrdili da biomarkeri imaju visoku i stabilnu diskriminacijsku sposobnost kroz različite razine analize. U šestostupanjskom modelu uočena je fazno-specifična uloga pojedinih varijabli, pri čemu u ranim stadijima dominiraju upalni parametri i 4-HNE-PA, dok u kasnijim stadijima ključnu ulogu preuzimaju promjene u COX-2 signalizaciji i njegovoj subcelularnoj redistribuciji. U pojednostavljenim modelima biomarkeri su zadržali visoku kliničku uporabljivost, osobito u razlikovanju benignih i malignih lezija, gdje je postignuta iznimno visoka diskriminacijska sposobnost. Stabilnost modela potvrđena je analizama osjetljivosti, što dodatno podupire robusnost dobivenih rezultata. Analiza kliničkih i upalnih parametara pokazala je da sustavni upalni markeri (CRP i N/L omjer) rastu s progresijom bolesti, dok lokalna upalna aktivnost pokazuje vrhunac u ranijim stadijima i opada u karcinomu, što može odražavati razvoj mehanizama izbjegavanja imunološkog nadzora. Izražaj COX-2 bio je povezan prvenstveno s lokalnom upalom, dok 4-HNE-PA pokazuje povezanost s dobi i sustavnim

upalnim statusom, što upućuje na to da analizirani biomarkeri odražavaju različite razine oksidacijskog stresa, od lokalnih tkivnih do sistemskih čimbenika. Rezultati dobiveni na staničnoj liniji AGS pružaju dodatnu funkcionalnu potporu nalazima iz tkiva. 4-HNE pokazuje koncentracijski ovisan učinak na staničnu funkciju, pri čemu niže koncentracije djeluju kao redoks-signalne molekule koje induciraju prolazan porast ROS-a, dok više koncentracije pokazuju citotoksični učinak te trend smanjenja migracijske sposobnosti stanica. Ovakav bifazični učinak u skladu je s konceptom hormeze i sugerira da 4-HNE ima složenu, kontekstualno ovisnu ulogu u tumorskoj biologiji. Istodobno, izostanak značajne indukcije COX-2 u ovom modelu upućuje na to da njegov izražaj zahtijeva kompleksniji signalni kontekst, uključujući kroničnu upalu i redoks modulaciju. Zajedno, ovi nalazi ukazuju da 4-HNE-PA i COX-2 pružaju komplementarne informacije o progresiji Correa kaskade. Dok 4-HNE-PA odražava ranu i perzistentnu komponentu oksidacijskog stresa i kronično promijenjenog mikrookoliša, COX-2, osobito kroz promjene u subcelularnoj lokalizaciji, predstavlja ključni marker maligne transformacije. Takva fazno-specifična dinamika biomarkera podupire koncept želučane karcinogeneze kao višestupanjskog procesa u kojem se kronična upala, oksidacijski stres i promjene signalnih putova postupno integriraju tijekom progresije bolesti. Istodobno, rezultati otvaraju mogućnost potencijalne primjene COX-2 kao terapijske mete u ranim stadijima, dok 4-HNE-PA može imati vrijednost kao marker oksidacijski promijenjenog fenotipa sluznice i rizičnih prekanceroznih stanja.

## 11 SUMMARY

In this study, we analyzed the dynamics of expression and subcellular localization of lipid peroxidation biomarkers, specifically 4-HNE protein adducts (4-HNE-PA), and the enzyme COX-2 across the stages of the Correa cascade, as a model of the development of intestinal-type gastric carcinoma. The obtained results clearly demonstrate that the progression of gastric carcinogenesis is characterized by phase-specific changes in the expression of these biomarkers, with different pathobiological mechanisms gradually emerging during the transition from normal mucosa through precancerous conditions and lesions to invasive carcinoma. One of the key findings of this study is that cytoplasmic accumulation of 4-HNE-PA increases significantly already in the early stages, particularly in intestinal metaplasia, and remains elevated throughout further disease progression. This pattern suggests that oxidative stress and lipid peroxidation represent early and persistent events in gastric carcinogenesis, rather than being solely a consequence of malignant transformation. Furthermore, the specific accumulation of 4-HNE-PA in goblet cell vacuoles, along with its increase with the grade of intestinal metaplasia, suggests a potential role of this biomarker as an indicator of lesion biological activity and possible risk of progression. However, its discriminatory value in distinguishing benign from malignant lesions is limited, as it remains elevated already in precancerous conditions. In contrast, COX-2 exhibits a more complex and dynamic pattern of changes. Expression detected by the SP21 clone increases in precancerous conditions, particularly in intestinal metaplasia, followed by a slight decrease in dysplasia and carcinoma, accompanied by increased heterogeneity of expression. At the same time, nuclear localization of COX-2 appears in later stages and is almost exclusively restricted to carcinomas, suggesting changes in the functional role of the protein during malignant transformation. The CX-294 clone further reveals an important shift in subcellular distribution, characterized by loss of the membranous pattern in early stages and the emergence of cytoplasmic/perinuclear localization in dysplasia and carcinoma. These findings indicate that changes in COX-2 localization may have greater diagnostic and biological value than expression level alone. Multivariable models further confirmed that these biomarkers have high and stable discriminatory capacity across different levels of analysis. In the six-stage model, a phase-specific contribution of individual variables was observed, with inflammatory parameters and 4-HNE-PA predominating in early stages, whereas alterations in COX-2 signaling and its subcellular redistribution play a dominant role in later stages. In simplified models, the biomarkers retained high clinical utility, particularly in distinguishing benign from malignant lesions, where exceptionally high discriminatory performance was achieved. Model stability was confirmed through sensitivity analyses, further supporting the robustness of the findings. Analysis of clinical and inflammatory parameters showed that systemic inflammatory markers (CRP and the neutrophil-to-lymphocyte ratio) increase with disease progression, whereas local inflammatory activity peaks in

earlier stages and declines in carcinoma, which may reflect the development of immune evasion mechanisms. COX-2 expression was primarily associated with local inflammation, while 4-HNE-PA showed associations with age and systemic inflammatory status, indicating that these biomarkers reflect different dimensions of oxidative stress, ranging from local tissue processes to systemic influences. Results obtained in the AGS cell line provide additional functional support for the tissue findings. 4-HNE demonstrated a clear concentration-dependent effect, with lower concentrations acting as redox signaling molecules that induce a transient increase in ROS, while higher concentrations lead to cytotoxicity and reduced cell migratory capacity. This biphasic effect is consistent with the concept of hormesis and suggests that 4-HNE plays a complex, context-dependent role in tumor biology. At the same time, the absence of significant induction of COX-2 in this model indicates that its expression requires a more complex signaling context, including chronic inflammation and redox modulation. Taken together, these findings indicate that 4-HNE-PA and COX-2 provide complementary information on the progression of the Correa cascade. While 4-HNE-PA reflects an early and persistent component of oxidative stress and a chronically altered microenvironment, COX-2, particularly through changes in subcellular localization, represents a key marker of malignant transformation. Such phase-specific biomarker dynamics support the concept of gastric carcinogenesis as a multistep process in which chronic inflammation, oxidative stress, and alterations in signaling pathways are progressively integrated during disease progression. At the same time, these results open the possibility of considering COX-2 as a potential therapeutic target in early stages of disease, while 4-HNE-PA may serve as a marker of an oxidatively altered mucosal phenotype and high-risk precancerous conditions.

## 12 ŽIVOTOPIS

Ivan Švagelj, dr. med., univ. mag. med., specijalist patologije i citologije, rođen je 1989. godine u Vinkovcima. Nakon završetka Gimnazije Matije Antuna Reljkovića u Vinkovcima, upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem je diplomirao 2014. godine. Od iste godine zaposlen je u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci, gdje kontinuirano radi najprije kao liječnik pripravnik, potom kao specijalizant, a od 2021. godine kao specijalist patologije i citologije. Specijalistički ispit iz patologije i citologije položio je 2021. godine, a poslijediplomski specijalistički sveučilišni studij „Patologije i citologije“ završio je 2022. godine, stekavši akademski naziv sveučilišni magistar patologije i citologije. Autor je i koautor brojnih znanstvenih radova i kongresnih priopćenja iz područja patologije i citologije, objavljenih u domaćim i međunarodnim časopisima te prezentiranih na stručnim skupovima u Europi, uključujući i pozvana predavanja na međunarodnim skupovima. Usavršavao se kroz brojne međunarodne edukacije, uključujući jednomjesečni stručni boravak u Georgia Dermatology & Skin Cancer Center u Sjedinjenim Američkim Državama te specijalizirane tečajeve dermatopatologije i citopatologije u Europi. Dobitnik je nagrade Zaklade „Sergej Saltykow“ za stručni rad iz područja patologije te priznanja za organizaciju dermatopatološkog simpozija u Vinkovcima. Aktivno sudjeluje u stručnom i društvenom radu, član je više nacionalnih i međunarodnih stručnih društava, uključujući Europsko društvo patologa (engl. *European Society of Pathology*, ESP) i Međunarodnu akademiju za citologiju (engl. *International Academy of Cytology*, IAC). Također je član etičkog povjerenstva bolnice te sudjeluje u organizaciji stručnih skupova i edukaciji mlađih kolega.

## Udžbenici

1. Švagelj I. Moj osvrt na rubriku „Zagrebački model utvrđivanja etiopatogeneze“. U: Kovač Z, urednik. *Pavlovo poslanje*. Zagreb: Medicinska naklada; 2021. ISBN: 978-953-176-857-3.

## Objavljeni radovi

1. Strahan AG, Švagelj I, Jukić D. Relationship of histopathologic parameters and gene expression profiling in malignant melanoma. *Am J Clin Dermatol*. 2024;25(1):119-126.
2. Vlahović I, Rajc J, Švagelj I, Šolić K, Švagelj D. Potential predictors for CDX2 expression loss and mismatch repair deficiency in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*. 2023;29:1610908.
3. Strahan AG, Švagelj I, Jukić D, Haley JA. Gene expression profiling and histopathological correlates in malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2023;89(3):AB50.
4. Švagelj I, Švagelj Z. Analysis of colorectal cancer tissue using Raman spectroscopy. *MAR Pathol*. 2023;2(1).
5. Abramovic M, Korska L, Grbanovic L, Cavka M, Švagelj I, Prutki M, Marušić Z. Pathological features of CT-guided bone lesion biopsy specimens in breast cancer patients. *Virchows Arch*. 2022;481(Suppl 1):S66.
6. Šušnjar T, Kuzmić Prusac I, Švagelj I, Jurišić A, Jukić M, Pogorelić Z. The effect of single and triple testicular biopsy using biopsy gun on spermatogenesis in pubertal rats. *Animals*. 2021;11(6):1569.
7. Kovačević M, Švagelj I, Vučko M, Švagelj D. Differences in the value of proliferation index (Ki67) and immunophenotypes between invasive breast cancers with respect to the axillary lymph node status. *SEEMEDJ*. 2021;5(1):157-169.
8. Švagelj I, Zarubica-Mavsar J, Labinac-Peteh L, Herceg D, Marušić Z. A rare and aggressive cutaneous thumb tumour. *Clin Exp Dermatol*. 2021.
9. Švagelj I, Vučko M, Hrskanović M, Švagelj D. Angiodysplasia of the gallbladder: an unknown risk factor for cholecystolithiasis. *Case Rep Pathol*. 2020.
10. Švagelj I, Vlahović I, Ogresta D, Belina D, Kovač Z. Decrease of environmental temperature may trigger the onset of acute aortic dissection. *SEEMEDJ*. 2020;4(1):40-48.
11. Švagelj D, Terzić V, Dovhanj J, Švagelj M, Cvrković M, Švagelj I. Superoxide dismutases in chronic gastritis. *APMIS*. 2016;124(4):252-256.
12. Švagelj M, Kiš J, Stažić M, Čačić T, Kasić M, Štanfel A, Švagelj I. Kirurško liječenje karcinoma kolona i rektuma u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci od 2009. do 2013. godine. *Acta Chir Croat*. 2015;12(1):63-64.

13. Vlahović I, Ogresta D, Švagelj I, Kovač Z. Correlations of alterations of environmental temperature and atmospheric pressure with the incidence of acute aortic dissection. *Liječ Vjesn.* 2013;135(5):25.

#### Aktivna sudjelovanja na kongresima

1. Bašić AB, Falamić L, Švagelj I. Pleural effusion as the initial presentation of lymphoma. *SZOFIKON 2026 - Book of Abstracts*; 2026.
2. Švagelj I, Gregorić I, Šormaz S, Knebl Buklijaš D, Perak M, Petrik F, Kremer T, Vučko M, Sudarić Bogojević M. Karcinom pluća: je li cito(pato)logija dovoljna za EGFR analizu? *2nd Joint Meeting of Croatian Societies for Pathology and Clinical Cytology (PACIT)*; 2025.
3. Švagelj I. The cell block as a (self-)educational bridge between pathology and cytology. *30th Ljudevit Jurak International Symposium, Zagreb, Croatia*; 2025.
4. Švagelj I. Cytopathologist as a lymphoma hunter in general hospital settings. *45th European Congress of Cytology (ECC 2024), Leipzig, Germany*; 2024.
5. Maroslavac I, Knebl-Buklijaš D, Škoro B, Kremer T, Šalov M, Vučko M, Sudarić Bogojević M, Švagelj I. Modifikacija pripreme citoloških uzoraka karcinoma pluća u svrhu optimizacije celularnosti staničnog bloka. *1st Joint Meeting of Croatian Societies for Pathology and Clinical Cytology (PACIT)*; 2023:170-171.
6. Švagelj I, Šumanović A, Drageljević K, Perković Ž, Nekić S, Vučko M, Čuček M, Kuzmac S. Molekularna patologija ili molekularna citologija? Je li uopće važno? *1st Joint Meeting of Croatian Societies for Pathology and Clinical Cytology (PACIT)*; 2023:88-89.
7. Švagelj I. Fine needle aspiration cytology of abdominal mass - case report. *EFCS Webinar*; 2021.
8. Preradović Fustar LJ, Švagelj I, Švagelj D. Thyroid microcarcinoma - our experience. *42nd European Congress of Cytology, Malmö, Sweden*; 2019.
9. Švagelj D, Cvrković M, Švagelj I. The oldest autopsy report in Croatia - a contribution of Vinkovci to the development of autopsy pathology in Croatia. *4th Pannonian Congress of Pathology*; 2016.