

# Imunohistokemijska izraženost koneksina 43 i NEDD9 u karcinomu želuca

---

Lerotić, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:461910>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivan Lerotić**

**Imunohistokemijska izraženost  
koneksina 43 i NEDD9 u karcinomu  
želuca**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2021.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivan Lerotić**

**Imunohistokemijska izraženost  
koneksina 43 i NEDD9 u karcinomu  
želuca**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2021.**

Disertacija je izrađena na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“, Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti te Klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Voditelji rada:        doc. dr. sc. Davor Hrabar  
                              doc. dr. sc. Monika Ulamec

Svojim mentorima doc. dr. sc. Moniki Ulamec i doc. dr. sc. Davoru Hrabaru zahvaljujem na vodstvu, vrijednim savjetima, strpljivosti, ohrabrenju i podršci koju su mi pružali tijekom planiranja i izrade ove disertacije.

Također, velika hvala svim kolegicama i kolegama, djelatnicima Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Sestre milosrdnice koji su mi pomogli u izradi disertacije.

Od srca hvala obitelji i prijateljima, jer bez njihove bezuvjetne i nesebične podrške, razumijevanja i ljubavi koju sam imao u svim trenucima ne bih ovo postigao.

*Ovu disertaciju posvećujem svojoj supruzi Ani, djeci Duji i Luči, majci i ocu.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Anatomija i fiziologija želuca .....	1
1.2. Embriologija i histologija želuca .....	4
1.3. Karcinom želuca .....	7
1.3.1. Epidemiologija .....	7
1.3.2. Etiologija i patogeneza .....	9
1.3.3. Rizični čimbenici .....	13
1.3.4. Premaligne promjene .....	18
1.3.5. Kliničke karakteristike karcinoma želuca.....	23
1.3.6. Dijagnostika karcinoma želuca.....	24
1.3.7. Patologija i klasifikacija karcinoma želuca .....	27
1.3.8. Procjena stadija karcinoma želuca.....	30
1.3.9. Liječenje i prognoza .....	35
1.4. Biomarkeri .....	39
1.4.1. Koneksin 43.....	39
1.4.2. NEDD9 .....	45
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	50
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	51
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	52
4.1. Bolesnici .....	52

4.2. Metode .....	53
4.3. Statistička analiza .....	54
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>56</b>
5.1. Koneksin 43 .....	61
5.2. Protein NEDD9 .....	70
5.3. Povezanost izraženosti koneksina 43 i NEDD9 .....	78
5.4. Analiza višestruke regresije .....	83
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>85</b>
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>99</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>100</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>101</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>102</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>122</b>

## POPIS KRATICA

<b>AFP</b>	alfa fetoprotein
<b>AJCC</b>	Američka združena komisija za rak (engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i> )
<b>AKT1</b>	serin-treonin specifična protein kinaza B (engl. <i>Akt1 serine/threonine kinase</i> )
<b>APC</b>	tumor supresor gen odgovoran za adenomatoznu polipozu kolona (engl. <i>adenomatous polyposis coli</i> )
<b>ARGHAP26/6</b>	gen koji kodira protein koji ima ulogu u endolitičkim putevima (engl. <i>Rho GTPase activating protein 26</i> )
<b>ARID1A</b>	domena koja se specifično veže na područja DNA bogata s AT sekvencama (eng. <i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A</i> )
<b>ATP/ADP</b>	adenozin-trifosfat / adenzin-difosfat
<b>BabA2</b>	gen za adhezin koji se veže na antigen vezan uz krvnu grupu (eng. <i>blood group antigen-binding adhesin</i> )
<b>BCOR</b>	gen koji kodira interakcijski korepresor proteina BCL6 (engl. <i>B-cell lymphoma 6 protein interacting corepressor</i> )
<b>CA 19-9</b>	karbohidratni antigen 19-9, tumorski marker (engl. <i>carbohydrate antigen 19-9</i> )
<b>CA 125</b>	tumorski marker (engl. <i>cancer antigen 125</i> )
<b>CA 72-4</b>	tumorski marker (engl. <i>cancer antigen 72-4</i> )
<b>CAF</b>	fibroblasti vezani uz tumor (eng. <i>cancer-associated fibroblast</i> )
<b>CagA</b>	gen A vezan uz citotoksin (engl. <i>cytotoxin-associated gene A</i> )

<b>cAMP</b>	ciklički adenzin monofosfat (engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
<b>CAS</b>	obitelj signalnih proteina koji imaju ulogu u proliferaciji i migraciji stanica (engl. <i>Crk-associated substrate</i> )
<b>Cas-L</b>	sinonim za NEDD9 protein (engl. <i>Crk-associated substrate-related protein</i> )
<b>CASS2</b>	sinonim za NEDD9 protein (engl. <i>Cas scaffolding protein family member 2</i> )
<b>cGMP</b>	ciklički gvanozin monofosfat (engl. <i>cyclic guanosine monophosphate</i> )
<b>CDH1</b>	gen za E-kadherin, jedan od proteina iz obitelji kadherina (engl. <i>cadherin</i> ) odgovornih za povezivanje stanica
<b>CDK6</b>	gen za ciklin ovisnu serine/treonin protein kinazu (engl. <i>cyclin dependent kinase 6</i> )
<b>CDKN2A</b>	gen za inhibitore 2A obitelji ciklin-ovisne kinaze (eng. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> )
<b>CEA</b>	karcinoembrionalni antigen, tumorski biljeg (engl. <i>carcinoembryonic antigen</i> )
<b>CIMP</b>	fenotip metilacije DNA regije bogate CpG sekvencama (eng. <i>CpG island methylator phenotype</i> )
<b>CIN</b>	kromosomska nestabilnost (engl. <i>chromosomal instability</i> )
<b>CLDN18</b>	gen koji kodira integralni membranski protein koji je komponenta čvrstih međustaničnih veza (engl. <i>claudin 18</i> )
<b>CMS</b>	dogovoreni molekularni podtipovi (engl. <i>consensus molecular subtypes</i> )
<b>CT</b>	komputerizirana tomografija (engl. <i>computerized tomography</i> )
<b>CTNNA1</b>	gen za katenin alfa 1, molekulu koja omogućava povezivanje kadherina i aktinskog citoskeleta stanice
<b>Cx 43</b>	koneksin 43 (eng. <i>connexin 43</i> )



<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virus
<b>ECL 1 i 2</b>	ekstracelularna petlja/domena 1 i 2 koneksina 43 (engl. <i>extracellular loop 1 and 2</i> )
<b>ECM</b>	izvanstanični matriks (engl. <i>extracellular matrix</i> )
<b>ECOG</b>	dogovoreni kriterij za procjenu općeg stanja onkološkog bolesnika (eng. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> )
<b>EGD</b>	ezofagogastroduodenoskopija
<b>EGFR</b>	gen za receptor za epidermalni čimbenik rasta (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EMT</b>	epitelno-mezenhimalna tranzicija (eng. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )
<b>ERBB2</b>	receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2, HER2 (engl. <i>Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2</i> )
<b>ESMO</b>	Europsko društvo za medicinsku onkologiju (engl. <i>European Society for Medical Oncology</i> )
<b>EUS</b>	endoskopski ultrazvuk (engl. <i>endoscopic ultrasound</i> )
<b>FAK</b>	fokalna adhezijska kinaza (engl. <i>focal adhesion kinase</i> )
<b>FDA</b>	agencija za hranu i lijekove u SAD-u (engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FNA</b>	citološka aspiracija tankom iglom (engl. <i>fine-needle aspiration</i> )
<b>FNAB</b>	aspiracijska biopsija tankom iglom (engl. <i>fine-needle aspiration biopsy</i> )
<b>GJ</b>	pukotinaste ili propusne veze (eng. <i>gap junctions</i> )
<b>GJA1</b>	alfa-1 protein pukotinastih veza, sinonim za koneksin 43 (engl. <i>gap junction alpha-1 protein</i> )

<b>GJIC</b>	intercelularna (međustanična) komunikacija putem pukotinastih spojišta (eng. <i>gap junction intercellular communication</i> )
<b>HE</b>	hematoksilin-eozin, standardno bojenje histološkog materijala u patologiji
<b>HEF1</b>	protein koji pojačava filamentaciju, sinonim za NEDD9 protein (engl. <i>human enhancer of filamentation 1</i> )
<b>HER2</b>	receptor 2 za humani epidermalni čimbenik rasta (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
<b>HNPCC</b>	nasljedni ne-polipozni karcinom debelog crijeva (eng. <i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> )
<b>Hp</b>	Helicobacter pylori
<b>HR, RR</b>	mjere omjera izgleda i relativnog rizika korišteni u statistici (engl. <i>hazard risk, relative risk</i> )
<b>HZJZ</b>	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon gama
<b>IHC</b>	metoda imunohistokemijskog bojenja (engl. <i>immunohistochemistry</i> )
<b>IL</b>	interleukin(i)
<b>IP3</b>	inozitol trifosfat (engl. <i>inositol trisphosphate</i> )
<b>KNOCK-OUT</b>	genetski modificirani organizmi kojima je inaktiviran ciljani gen
<b>KRAS</b>	onkogen povezan s nastankom raka debelog crijeva (engl. <i>Kirsten rat sarcoma</i> )
<b>MAPK/ERK</b>	protein-kinaza aktivirana mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> ) znana i kao ERK (engl. <i>extracellular signal-regulated kinases</i> )
<b>MLH1</b>	gen zadužen za popravak krivo sparenih baza u DNA (engl. <i>mutL homolog 1</i> )

- MMR** geni zaduženi za popravak krivo sparenih baza u DNA (engl. *mismatch repair*), uključuje više gena od kojih se MLH1 (engl. *mutL homolog 1*), MSH2 (engl. *mutS homolog 2*), MSH6 (engl. *mutS homolog 6*) te PMS2 (engl. *PMS1 homolog 2*) određuju imunohistokemijski, a povezani su s nastankom HNPCC
- MR** magnetska rezonanca
- mRNA** glasnička RNA (engl. *messenger ribonucleic acid*)
- MSI** mikrosatelitna nestabilnost (engl. *microsatellite instability*), spontano nakupljanje mutacija zbog defekata u genima za popravak DNA
- NAD** nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*)
- NCCN** neprofitno udruženje stručnjaka SAD-a koji utvrđuju preporuke u kliničkoj onkološkoj praksi (engl. *National Comprehensive Cancer Network*)
- NEDD9** protein neuralne prekursorske stanice čija se ekspresija smanjuje tijekom razvoja (engl. *neural precursor cell expressed, developmentally downregulated protein 9*), član obitelji CAS proteina koji sudjeluju u fokalnoj adheziji stanica s izvanstaničnim matriksom te kontroli staničnog ciklusa, apoptozi i proliferaciji
- NHS** Britanski zdravstveni sustav (engl. *National Health Service*)
- pCR** kompletni patološki odgovor (engl. *pathologic complete response*)
- p130Cas/BCAR1** član obitelji signalnih proteina koji imaju ulogu u proliferaciji i migraciji stanica (engl. *Crk-associated substrate; breast cancer anti-estrogen resistance protein 1*)
- PET/FDG** pozitronska emisijska tomografija s fluorodeoksiglukozom

**PI3K** fosfatidilinozitol-3 kinaze, obitelj ATP enzima (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*)

**PIK3/Akt/mTOR** signalni put koji aktivira rast i proliferaciju stanica, aktiviran receptorima za epidermalne čimbenike rasta

**PIK3/Akt/MAPK** signalni put uključen u niz staničnih procesa: proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu

**PIK3CA** gen za katalitičku alfa podjedinicu PI3K enzima (protoonkogen) (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*)

**RAS** skupina protoonkogenih RAS (engl. *rat sarcoma*), **RAS/RAF** signalni put aktiviran čimbenicima rasta koji potiče proliferaciju

**RHOA** gen koji kodira mali protein GTPazu koji je dio Rho proteinske obitelji GTPaza (engl. *ras homolog family member A*)

**RNA** ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

**RNF43** gen za RNF 43 protein (engl. *ring finger protein 43*)

**SEER** program Američkog nacionalnog instituta za rak (engl. *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*)

**siRNA** mala interferirajuća RNA (engl. *small (short) interfering RNA*)

**SRC** skupina protoonkogenih Src, kodira nereceptorsku tirozin-kinazu

**STK11** tumor supresor gen koji kodira serin/treonin kinazu 11 (engl. *serine/threonine kinase 11*)

**TGFβ** transformirajući čimbenik rasta β (engl. *transforming growth factor β*)

**TNM** sistem stupnjevanja raka prema značajkama dubine prodora primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorskim stanicama (N) te prisutnosti udaljenih metastaza (M)

<b>TP53/p53</b>	tumor-supresorski gen 53/protein p53 „čuvar genoma“ (engl. <i>tumor protein p53</i> )
<b>UZV</b>	ultrazvuk
<b>VacA</b>	gen za vakuolizirajući toksin A (eng. <i>vacuolating toxin A</i> )
<b>VEGF</b>	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VEGF-A</b>	gen za vaskularni endotelni čimbenik rasta A (eng. <i>vascular endothelial growth factor A</i> )
<b>vs.</b>	suprotno, u odnosu na, protiv (engl. <i>versus</i> )
<b>WHO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organisation</i> )
<b><math>\chi^2</math></b>	Hi-kvadrat test

# 1. UVOD

## 1.1. Anatomija i fiziologija želuca

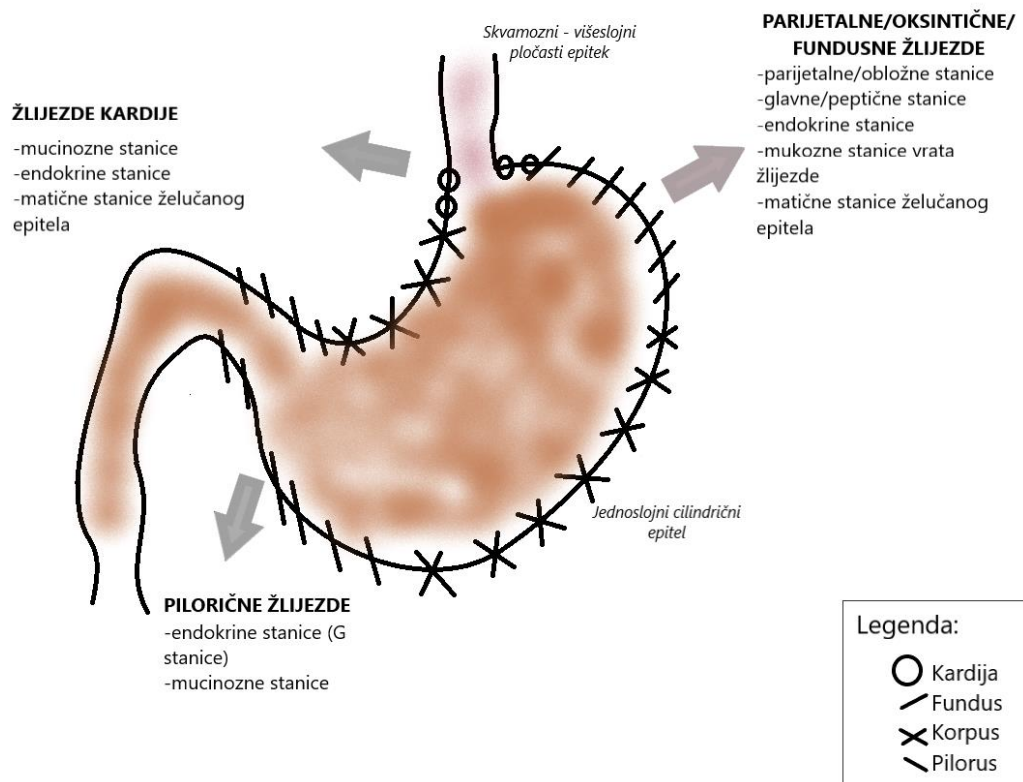
Želudac je vrećasto proširenje probavne cijevi čije su glavne funkcije skladištenje veće količine unesene hrane, započinjanje procesa probave i postupno otpuštanje sadržaja u distalni, volumno značajno manji dio probavne cijevi, dvanaesnik (duodenum), omogućujući tako evolucijski prijeko potreban intermitentni režim hranjenja (1). Prosječan volumen želuca odrasla čovjeka iznosi 1,5 litara, a ovisno o prehranbenim navikama njegov volumen može se povećati i do nekoliko litara (2).

Makroskopski razlikujemo prednju i stražnju stijenku želuca te dvije želučane krivine, malu krivinu želuca smještenu desno i veliku krivinu želuca koja čini lijevi rub organa.

Anatomski i histološki želudac se može podijeliti u 4 dijela: kardija, fundus, korpus i pilorus (Slika 1). Iako je teško definirati jasne anatomske i histološke granice kardije (do te mjere da neki autori čak i dvoje o potrebi za izdvajanjem ove regije želuca kao specifičnog dijela), to je područje koje se neposredno nastavlja na ezofagogastrični spoj. Lijevo i iznad kardijalnog ušća nalazi se fundus želuca koji čini najviši dio želuca te je u uspravnom položaju ispunjen zrakom. Na fundus želuca se nastavlja korpus koji seže do plitkog ureza koji se nalazi na oko 2/3 dužine male krivine želuca (lat. *incisura angularis*). Završni dio želuca je pilorus koji se sastoji od ulaznog dijela, antruma, i piloričnog kanala koji spaja želudac s duodenumom. Pilorični kanal čini palpabilni cirkularni mišić tzv. pilorični sfinkter (2,3).

Prednja stijenka želuca priliježe u području kardije, male krivine i pilorusa uz donju plohu jetre, u području fundusa i dijela velike krivine uz ošit, dok je pilorični dio u području

anatomski nazvanom želučano polje u direktnom doticaju s prednjom trbušnom stijenkom. Stražnja stijenka želuca tvori prednji zid vrećice trbušne marame (lat. *bursa omentalis*) te priliježe uz gušteraču, dijafragmu, poprečni kolon, slezenu te lijevu nadbubrežnu žlijezdu i vrh lijevog bubrega. Želudac je gotovo u potpunosti obavijen peritoneumom, izuzev malog dijela u području ezofagogastričnog spoja (2).



Slika 1. Shematski prikaz anatomske građe želuca uz objašnjenje histološke građe stijenke pojedinih regija organa

Položaj želuca u trbušnoj šupljini ovisi o ispunjenosti želuca hranom i položaju tijela, ali i o spolu i konstituciji. Ezofagogastrični spoj se najčešće nalazi u visini Th10 kralješka, 1 do 2 cm ispod hijatusa dijafragme, dok se gastroduodenalni spoj nalazi u visini L1 kralješka. Pri stajanju ispunjen želudac se spušta do razine 4. lumbalnog kralješka (2,3).

Želudac je opskrbljen arterijskim ograncima celijačnog debla (lat. *truncus coeliacus*)

abdominalne aorte koji međusobno obilno kolateriraju. Malu krivinu želuca, do područja incisura angularis, krvlju opskrbljuje lijeva želučana arterija (lat. *a. gastrica sinistra*) koja je najčešće izravan ogranak celijačnog debla, dok preostali dio male krivine želuca opskrbljuje desna želučana arterija (*a. gastrica dextra*), ogranak zajedničke jetrene arterije (lat. *a. hepatica communis*). Za opskrbu velike krivine želuca zadužena je arterijska arkada koju čine lijeva gastromentalna arterija (lat. *a. gastromentalis sinistra*) koja je ogranak lijenalne arterije (lat. *a. lienalis*) i desna gastromentalna arterija (lat. *a. gastromentalis dextra*) koja je ogranak gastroduodenalne arterije (lat. *a. gastroduodenalis*). Fundus želuca arterijskom krvlju dodatno opskrbljuju kratke gastične arterije (lat. *aa. gastricae breves*) i stražnje gastične arterije (lat. *aa. gastricae posteriores*) koje su najčešće ogranci lijenalne arterije (3).

Venska odvodnja želuca započinje u submukoznim venskim spletovima formirajući potom vene koje prate tok ranije spomenutih arterija. Desna i lijeva želučana vena (lat. *v. gastrica dextra* i *v. gastrica sinistra*) se pri tome ulijevaju izravno u portalnu venu (lat. *v. porta*). U području ezofagealnog otvora dijafragme (lat. *hiatus oesophagi diaphragmae*) anastomoziraju s venama jednjaka. Vene koje dreniraju krv s područja velike krivine želuca se posredno ulijevaju u portalni sustav; lijeva gastromentalna vena (lat. *v. gastromentalis sinistra*) se ulijeva u lijenalnu venu (lat. *v. lienalis*), a desna gastromentalna arterija (lat. *v. gastromentalis dextra*) u gornju mezenteričnu venu (lat. *v. mesenterica superior*).

Limfna odvodnja također prati ranije spomenute arterije i vene. Limfne žile teku zajedno s 4 glavne želučane arterije do područnih limfnih čvorova (lat. *noduli lymphatici*). Gastični limfni čvorovi (lat. *noduli lymphatici gastrici*) skupljaju limfu iz područja male krivine želuca, gastromentalni (lat. *noduli lymphatici gastromentalis*) s područja velike krivine želuca, splenični (lat. *noduli lymphatici splenici*) s područja fundusa, dok su pilorični limfni čvorovi (lat. *noduli lymphatici pylorici*) primarna filtracijska središta za limfu s



područja pilorusa želuca i bulbosa dvanaesnika. Sekundarna filtracijska središta limfne odvodnje želuca su limfni čvorovi u jetrenim vratima (lat. *porta hepatis*), uz slezenu i rub gušterače. Limfa se na kraju ulijeva u celijačne limfne čvorove (lat. *noduli lymphatici coeliaci*) i kroz njih u prsni limfovod (lat. *ductus thoracicus*).

Simpatička inervacija želuca potječe od 6. do 8. prsnog odsječka kralježnične moždine. Presinaptička vlakna kao splanhnički živci (lat. *nervi splanchnici*) dolaze do celijačnog spleta (lat. *plexus coeliacus*) gdje tvore sinapse, a potom uz arterijske ogranke celijačnog debla odlaze do želučane stijenke. Za parasimpatičku inervaciju je zadužen vagalni živac (lat. *nervus vagus*) čija presinaptička vlakna putuju prednjim i stražnjim deblom vagusa (lat. *truncus vagalis*) te tvore sinapse u području Auerbachova mijenteričnog spleta (lat. *plexus myentericus Auerbachi*) smještenog unutar mišićnog sloja želuca, te Meisnerovog submukoznog spleta (lat. *plexus submucosus Meisneri*) smještenog u submukozi (2).

## 1.2. Embriologija i histologija želuca

Razvoj želuca započinje u 4. embrionalnom tjednu formiranjem vretenastog proširenja primitivnog crijeva. Neujednačen proces rasta prednje i stražnje stijenke primordijalnog želuca rezultira formiranjem male krivine želuca koja nastaje iz prednje stijenke, te velike krivine želuca koja nastaje iz stražnje stijenke primitivnog crijeva. Paralelno s njihovim rastom dolazi i do rotacije primitivnog crijeva oko uzdužne osi za 90° te se isprva sagitalno postavljen želudac orijentira tako da velika krivina dolazi na lijevu stranu, a mala krivina na desnu stranu. Posljedično, desni vagalni živac (lat. *nervus vagus dexter*) koji je inervirao desnu stijenku primordijalnog želuca sada inervira stražnju stijenku, dok je lijevi vagalni

živac (lat. *nervus vagus sinister*) zadužen za inervaciju prednje stijenke želuca (3).

Kao i ostatak probavne cijevi, stijenka želuca ima 4 sloja. Luminolni dio stijenke oblaže sluznica (lat. *tunica mucosa*) koja se sastoji od epitela (lat. *lamina epithelialis*), tankog sloja veziva (lat. *lamina propria*) i tankog sloja glatkih mišića (lat. *lamina muscularis*). Makroskopski je sluznica mekana i baršunasta s vidljivim naborima koji omogućuju širenje želuca. Ispod sluznice se nalazi svojevrsni potporni sloj, submukoza (lat. *tela submucosa*), u kojoj su smješteni terminalni ogranci krvnih žila, živčani spletovi te limfociti i plazma stanice. Treći sloj je mišićni sloj (lat. *tunica muscularis*) u kojem se razlikuju unutarnji kosi, srednji cirkularni i vanjski longitudinalni snop mišićnih vlakana. Kosa vlakna su najzastupljenija u području fundusa i korpusa, cirkularna u području korpusa i pilorusa u čijem distalnom dijelu tvore pilorični sfinkter (lat. *musculus sphincter pylori*), dok se longitudinalna vlakna najvećim dijelom nalaze u području velike i male krivine želuca tvoreći tako funkcionalnu probavnu vreću. Posljednji sloj čini seroza (lat. *tunica serosa*) koja je nastavak visceralnog peritoneuma (2,3).

Histološka građa sluznice želuca razlikuje se u pojedinim dijelovima organa. Prekrivena je jednoslojnim cilindričnim epitelom koji izlučuje mukopolisaharide i mucin tvoreći zaštitni sloj koji štiti sluznicu od štetnog djelovanja želučane kiseline, pepsina, bakterija i ostalih potencijalno štetnih sastojaka unesenih hranom. Stanice pokrovnog cilindričnog epitela imaju bazalno smještenu jezgru, izražena Golgijeva tjelešca i obilje apikalno smještenih granula bogatih mucinom, te se ne razlikuju značajno u pojedinim dijelovima želuca. Na površini sluznice nalazi se mnoštvo malih otvora, tzv. želučanih foveola, koji predstavljaju otvore želučanih žlijezda. Histološki se razlikuju žlijezde kardije, parijetalne i pilorične žlijezde (Slika 1). Sve žlijezde predstavljaju invaginaciju površinskog epitela, a razlikuju se s obzirom na zastupljenost stanica koje ih oblažu. Žlijezde kardije su izrazito razgranate i zauzimaju uski prsten između višeslojnog pločastog epitela jednjaka i

jednoslojnog cilindričnog epitela želuca (3). Iako su dugo vremena postojale polemike o tome je li histološki entitet kardije zapravo patološki nalaz, De Hertogh i suradnici su dokazali da se radi o fiziološkoj regiji želučane sluznice (4). Žlijezde kardije građene su od mucinoznih, endokrinih i matičnih epitelnih stanica. Fundusne žlijezde, zvane još i glavne te parijetalne ili oksintične, najbrojnije su želučane žlijezde. Smještene su u području fundusa i korpusa, a sastoje se od: parijetalnih stanica koje izlučuju želučanu kiselinu i intrinzični faktor, glavnih ili peptičnih stanica koje izlučuju pepsinogen, mucinoznih, endokrinih te matičnih epitelnih stanica. Parijetalne stanice započinju lučenje želučane kiseline 5 do 10 minuta nakon stimulacije aktivirajući  $H^+$ ,  $K^+$ -ATP-azu (5). Aktivni transport zahtjeva veliku količinu energije pa 30% do 40% volumena parijetalnih stanica zauzimaju mitohondriji. Intrinzični faktor se luči tijekom nesekrecijske faze ciklusa stanice. Ultrastrukturu glavnih stanica dominiraju ribosomi, slobodni i vezani za endoplazmatski retikulum, na kojima se sintetizira zimogen pepsinogen koji se u lumenu, nakon doticaja sa želučanom kiselinom pretvara u aktivni oblik, pepsin. Mucinozne stanice fundusnih žlijezda, za razliku od mucinoznih stanica cilindričnog površinskog epitela, luče kiselu sluz te imaju funkciju svojevrsnih prekursorskih matičnih stanica koje se po potrebi mogu diferencirati u parijetalne, glavne, endokrine ili pak mucinozne stanice površinskog epitela. Endokrine ili enteroendokrine stanice u žlijezdama fundusa i korpusa želuca prvenstveno izlučuju somatostatin, serotonin i histamin (3). Pilorične žlijezde su kratke, razgranate žlijezde smještene u području antruma i piloričnog kanala, a građene su od mucinoznih, glavnih i neuroendokrinih stanica. Glavne stanice piloričnih žlijezda luče strukturno različit pepsinogen, tzv. pepsinogen tip II koji je, osim što se razlikuje u optimalnoj vrijednosti pH pri kojoj se aktivira, funkcionalno identičan pepsinogenu tip I izlučenom iz fundusnih žlijezda (6). Endokrine stanice piloričnih žlijezda izlučuju gastrin (G-stanice) i somatostatin (D-stanice).

## 1.3. Karcinom želuca

### 1.3.1. Epidemiologija

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) u 2018. godini zabilježeno je 1,03 milijuna novih slučajeva oboljelih od karcinoma želuca, čineći ga tako šestim najčešćim sijelom tumorskih bolesti. Iako je incidencija karcinoma želuca u zapadnim zemljama u padu (7,8), globalno gledajući to je i dalje treći najčešći uzrok smrti povezan s tumorskim bolestima (9). Pad incidencije karcinoma želuca se prvenstveno pripisuje poboljšanju životnih uvjeta i promjenama prehrambenih navika svjetske populacije. Postoje značajne geografske, socio-ekonomske, dobne, spolne, rasne i anatomske razlike u incidenciji i mortalitetu karcinoma želuca. Najveća incidencija je na Dalekom istoku, potom u istočnoj Europi te Srednjoj i Južnoj Americi (9–11). Geografske varijacije ukazuju na značajan utjecaj okolišnih i kulturoloških čimbenika. Tome u prilog govore i podaci o smanjenju rizika za nastanak karcinoma želuca kod ljudi koji migriraju iz područja s visokom incidencijom u područje s niskom incidencijom karcinoma (12). Iako je u prošlosti incidencija karcinoma želuca bila viša u industrijaliziranim zemljama, noviji epidemiološki podaci ukazuju da gotovo 70% novodijagnosticiranih slučajeva otpada na zemlje u razvoju (9). U toj skupini zemalja također se bilježi i povećan dobno standardizirani mortalitet kod muškaraca u odnosu na razvijene zemlje, 14,4/100 000 u zemljama u razvoju naprema 9,2/100 000 u razvijenim zemljama (9). Incidencija je gotovo dvostruka veća u muškaraca nego u žena (9). Nešto veća stopa incidencije je zabilježena u crnaca, hispanaca i indijanaca (9). Karcinom želuca je rijedak u populaciji mlađoj od 40 godina nakon čega se incidencija postupno povećava. Medijan dobi postavljanja dijagnoze u SAD-u je oko 70 godine života dok je u Japanu gotovo za desetljeće manji, što se prvenstveno pripisuje kvalitetnim programima rane detekcije karcinoma želuca u Japanu (8,13). Iako je sveukupna

incidencija karcinoma želuca u svijetu u padu, analizirajući anatomsku lokalizaciju tumora epidemiološke studije su pokazale povećanu stopu incidencije i mortaliteta karcinoma proksimalnog dijela želuca (14–17). Ovaj tip karcinoma, u literaturi često nazivan i karcinom ezofagogastričnog spoja tj. karcinom kardije (13), u usporedbi s karcinomom distalnog dijela želuca ima slabije 5-godišnje preživljenje, veću perioperativnu smrtnost, dva puta češće se javlja u bijelaca te pet puta češće u muškaraca (16,17). Epidemiološki i patogenetski sličan je adenokarcinomu jednjaka te se stoga smatra zasebnim patološkim entitetom.

Prema podacima populacijskog Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2017. godini u Republici Hrvatskoj (RH) zabilježeno je ukupno 904 novih slučajeva karcinoma želuca što ga čini šestim najčešćim primarnim sijelom tumora u muškaraca te osmim u žena (18). Stope incidencije za karcinom želuca u 2017. godini u RH su iznosile 27,7/100 000 stanovnika za muškarce te 16,5/100 000 stanovnika za žene dok je ukupna stopa incidencije iznosila 21,9/100 000 stanovnika (18). Ukupna standardizirana stopa incidencije (svjetska populacija) u RH za istu godinu iznosila je 8,76/100 000 stanovnika što je ispod prosjeka ne samo u odnosu na svjetsku populaciju (15,4/100 000) već i središnju (9,4/100 000) i zapadnu Europu (10,5/100 000) (19).

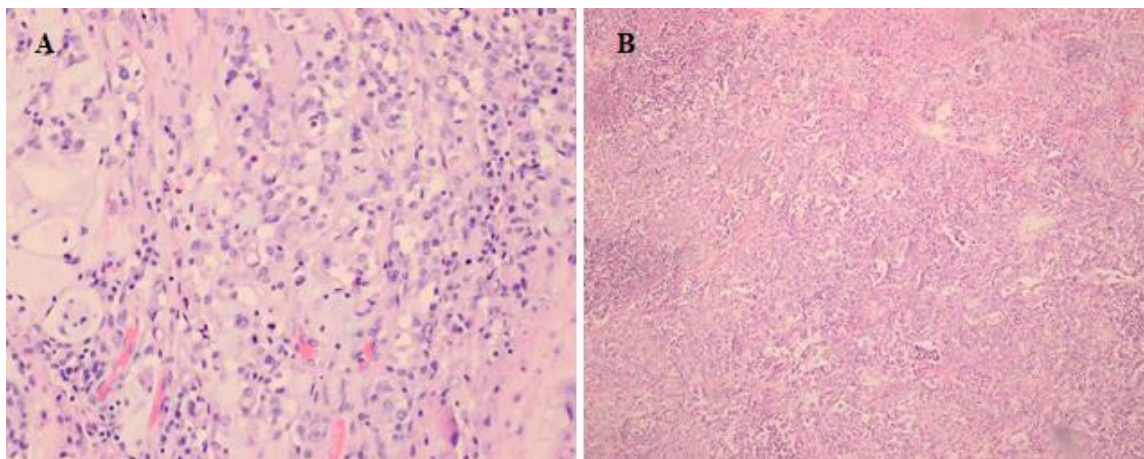
Od spomenuta 904 slučaja, u trenutku postavljanja dijagnoze u svega 12,9% bolesnika bolest je bila lokalizirana, u 31,4% je bila regionalno proširena, 16,9% bolesnika je već imalo udaljene metastaze dok je za 38,7% bolesnika stupanj proširenosti bolesti bio nepoznat (18). Također se može uočiti i regionalna razlika u incidenciji karcinoma želuca unutar RH. Županije u kojima se tradicionalno prakticira mediteranski način ishrane imaju manju stopu incidencije u usporedbi sa županijama u kojima to nije slučaj. Tako su županije s najmanjom stopom incidencije Šibensko-kninska s 10,8/100 000 stanovnika, Istarska s 15,8/100 000 te Zadarska s 17,2/100 000, dok su županije s najvišom stopom incidencije

Sisačko-moslavačka s 36,7/100 000, Međimurska s 32,4/100 000 te Ličko-senjska s 30,5/100 000 stanovnika (18).

### 1.3.2. Etiologija i patogeneza

Malignomi želuca mogu nastati iz gotovo svih ranije opisanih vrsta stanica koje čine želučanu stijenku. Iako je u 95% slučajeva riječ o adenokarcinomima, drugi histološki tipovi uključuju karcinoide, gastrointestinalne stromalne tumore, limfome itd.

Tijekom povijesti je postojala nekolicina predloženih i korištenih klasifikacija adenokarcinoma želuca. Epidemiološki i prognostički vrlo diferentna tzv. Laurenova klasifikacija iz 1965. godine razlikuje intestinalni, difuzni i miješani tip adenokarcinoma želuca (20,21). Osnovne razlike u histološkoj građi tipova karcinoma po Laurenou vidljive su na Slici 2.



Slika 2. Histološki izgled dva osnovna tipa karcinoma želuca po Laurenou; A, difuzni tip adenokarcinoma - difuzno razbacane pojedinačne atipične stanice, žarišno s po kojom stanicom tipa prstena pečatnjaka, mitozama i mucinoznom stromom (HE<sub>x</sub>400); B, intestinalni tip - glandularne formacije zbijene jedna uz drugu infiltrativno rastu u okolinu (HE<sub>x</sub>100)

Intestinalni tip adenokarcinoma sadrži tubularne strukture slične žlijezdama intestinalnog epitela zbijene jedna uz drugu koje infiltrativno rastu u okolinu. Ovaj tip adenokarcinoma je povezan s okolišnim i prehrambenim čimbenicima te je visoko zastupljen u regijama s visokom incidencijom karcinoma želuca. Pad sveukupne incidencije karcinoma želuca je prvenstveno na račun pada incidencije ovog tipa karcinoma. Difuzni tip adenokarcinoma histološki karakteriziraju stanice koje difuzno infiltriraju stijenku želuca, bez jasnog formiranja tubularnih struktura. Histološkim pregledom mogu se naći posebne stanice bogate mucinom, tzv. stanice prstena pečatnjaka koje se nikada ne uočavaju u intestinalnom tipu karcinoma. Pojavljuje se u mlađoj dobi, ima lošiju prognozu u odnosu na intestinalni tip te do sada nije uočen pad u njegovoj incidenciji (22). Difuzni tip koji zahvaća veću površinu želuca se naziva *linitis plastica*. Katkad se nađe i miješani tip karcinoma koji sadrži heterogena područja s predominacijom jednog od ova dva histološka tipa (13).

Pretpostavlja se da razvoju intestinalnog tipa adenokarcinoma želuca prethodi postupan proces karcinogeneze sličan onome u kolorektalnom karcinomu. Normalna sluznica se postupno transformira u hiperproliferativni epitel nakon čega dolazi do žljezdane atrofije, intestinalne metaplazije, displazije i u konačnici razvoja adenokarcinoma (23). Tome u prilog govori i veća incidencija kroničnog atrofičnog gastritisa i intestinalne metaplazije u osoba s intestinalnim tipom adenokarcinoma, kao i među populacijama s većom incidencijom karcinoma želuca (24,25). Jedan od dobro poznatih ključnih čimbenika za inicijaciju i progresiju ranije opisane kaskade svakako je infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* (Hp). Danas se još uvijek sa sigurnošću ne zna koje su od navedenih promjena želučanog epitela reverzibilne. Životinjski modeli ukazuju na mogućnost reverzibilnosti svih stupnjeva promjena koje prethode visokom stupnju displazije (26,27).

Podaci o utjecaju kronične upale na razvoj difuznog tipa karcinoma kao i primjenjivost opisanog modela karcinogeneze za ovaj histološki tip su nejasni. Oba tipa adenokarcinoma

su povezana s infekcijom Hp koja ima direktan utjecaj na gene zadužene za popravak DNA (28,29).

Kao što je već ranije spomenuto, anatomski i epidemiološki razlikujemo karcinom proksimalnog dijela želuca od distalnog karcinoma fundusa, tijela i antruma želuca. Zanimljivo je da studije na životinjskim modelima sugeriraju da i adenokarcinom jednjaka povezan s Barrettovom metaplazijom potječe od stanica kardije želuca (30).

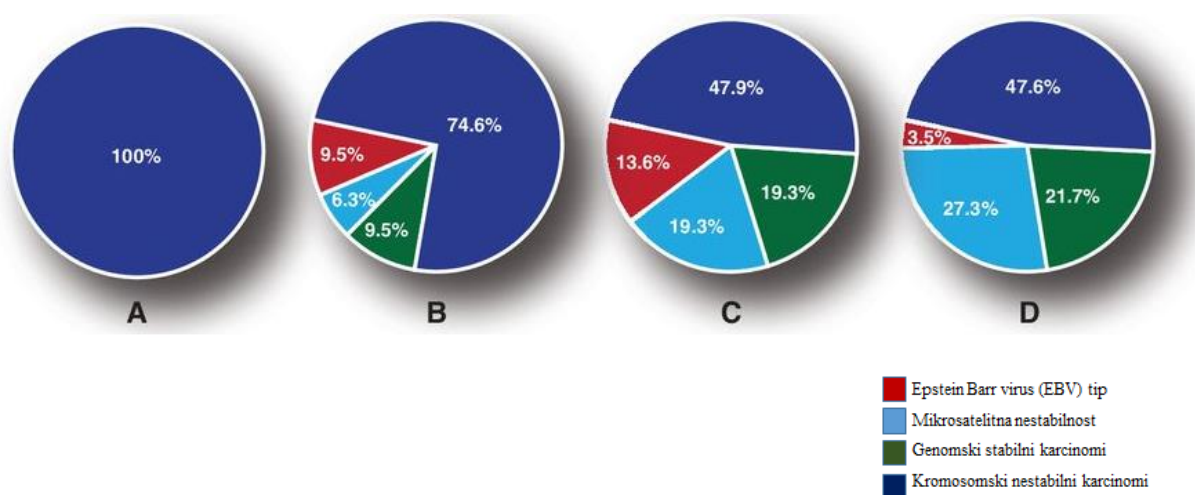
Za razliku od karcinoma kolona čija je karcinogeneza dobro proučena na genetskoj razini, točan mehanizam i geni uključeni u razvoj karcinoma želuca još nisu dobro definirani. Vjerojatan razlog je velika heterogenost molekularnih mehanizama uključenih u proces karcinogeneze karcinoma želuca i ezofagogastričnog spoja (31–34). Godine 2014. u sklopu programa „The Cancer Genome Atlas“ predložena je klasifikaciju karcinoma želuca na osnovu epigenomskih, transkriptomskih i proteomskih analiza koja razlikuje 300 podvrsta karcinoma želuca (35). Iako ova opsežna klasifikacija do danas nije našla širu kliničku primjenu autori su definirali 4 velike grupe karcinoma (13,35–38):

- 1) Karcinomi povezani s infekcijom virusom *Epstein Barr* (EBV) – ovaj tip karcinoma pokazuje dominantan profil epigenetske hipermetilacije, mutacije u *PIK3CA*, *ARID1A* i *BCOR* genima, gubitak funkcije *CDKN2A*, jaku izraženost imunskih biljega;
- 2) Karcinomi s mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI) – ovaj tip karcinoma je genetski vrlo sličan kolorektalnim karcinomima s istom karakteristikom mikrosatelitne nestabilnosti, hipermutacije i hipermetilacije, povišenim biljezima imunosti, gubitkom funkcije *MLH1* gena, i aktivacijskim mutacijama u *ARID1A*, *PIK3CA*, *RNF43* i *KRAS* genima, a najčešće su intestinalni tip po Laurenu;



- 3) Genomski stabilni karcinomi – karcinomi karakterizirani niskom stopom zabilježenih mutacija i aberacijama ponavljajućih sekvenci, mutacijama u *CDH1* i *RHOA* genima te fuzijom gena *CLDN18* i *ARGHAP26/6*, a najčešće su difuzni tip po Laurenu;
- 4) Kromosomski nestabilni karcinomi – karcinomi karakterizirani velikim brojem zabilježenih mutacija i posljedičnih genomskih promjena, *TP53* mutacijama, amplifikacijama *EGFR*, *HER2*, *KRAS*, *CDH1*, *VEGF-A*, *CDK6* i drugih gena, a u oko 60% slučajeva su intestinalnog tipa.

Većina karcinoma difuznog tipa genetski pokazuje karakteristike genomski stabilnih karcinoma dok karcinomi intestinalnog tipa uglavnom spadaju u skupinu kromosomski nestabilnih karcinoma. Također je uočena i povezanost pojedinih genetski klasificiranih skupina s anatomskom lokalizacijom tumora (Slika 3); tako su genomski stabilni karcinomi zastupljeniji u proksimalnim dijelovima želuca, a kasnije je uočena i genetska sličnost s adenokarcinomima jednjak (36).



Slika 3. Dijagrami učestalosti pojedine molekularne kategorije prema sijelu karcinoma želuca. A, ezofagealna-kardija regija; B, kardija i fundus; C, korpus; D, antrum i pilorus (Preuzeto iz: Nagaraja i sur., 2019 (38))

### 1.3.3. Rizični čimbenici

Rizične faktore za razvoj adenokarcinoma želuca možemo podijeliti na sigurne, genetske, vjerojatne i moguće (13).

#### 1.3.3.1. *Helicobacter pylori*

Nakon kolosalnih otkrića Marshalla i Warrena 80-ih godina prošloga stoljeća da je *Helicobacter pylori* (Hp) sposoban ne samo preživjeti u okolišu niskih vrijednosti pH-a želuca već da dovodi do razvoja ulkusa i karcinoma želuca, Međunarodna agencija za istraživanje raka svrstala je Hp u klasu I karcinogena tj. sigurne karcinogene. Hp je gram negativna, mikroaerofilna bakterija kojom je inficirana gotovo polovina svjetske populacije. Unipolarna flagela joj omogućuje brz prodor iz lumena želuca u mukozu, a produkcija enzima ureaze osigurava pH neutralan mikrookoliš (39). Prevalencija infekcije je viša u zemljama u razvoju te u većem dijelu Istočne Azije (40,41). Infekcija Hp može rezultirati gastritisom, duodenalnim ulkusom koji se pojavljuje u 10-15% inficiranih osoba ili želučanim ulkusom koji je povezan s razvojem karcinoma želuca (42). Gastritis koji zahvaća tijelo želuca i dovodi do aklorhidrije povezan je s većim rizikom razvoja karcinoma. S druge strane, duodenalna ulkusna bolest uzrokovana s Hp-om je povezana s pojačanom sekrecijom želučane kiseline i smanjenim rizikom razvoja karcinoma (43). U godini dana 1-3% osoba inficiranih Hp-om razviju kronični atrofični gastritis što ih čini rizičnom skupinom za razvoj karcinoma (23,44,45). Pretpostavlja se da je za razvoj karcinoma potrebna kombinacija virulentnog soja bakterije Hp, genetski sklon domaćin, dovoljno dugo trajanje infekcije i prisutnost okolišnih čimbenika poput pušenja i neadekvatne prehrane. Smatra se da upala dovodi do oksidativnog stresa i nastanka slobodnih kisikovih radikala koji potom oštećuju DNA, povećavaju broj CD4+ T limfocita i koncentraciju proinflammatoryh citokina. Sve to

smanjuje sposobnost popravka DNA, smanjuje apoptozu i posljedično povećava vjerojatnost nastanka klona karcinomskih stanica. Uz sve navedeno, Hp direktno modificira gene zadužene za popravak DNA (28). Studije provedene na mišjim modelima ukazuju da genetski modificirane jedinke sa smanjenom mogućnosti popravka DNA razvijaju teže oblike displazije nakon infekcije Hp-om (46). Sudeći prema istraživanjima animalnih modela, imunološki sustav domaćina ima ključnu ulogu u karcinogenezi. Infekcija Hp-om u genetski modificiranih miševa bez limfocitne aktivnosti ne dovodi do oštećenja sluznice želuca kao ni do kaskade metaplazija-displazija-karcinom (47,48). S druge pak strane, miševi s atenuiranom funkcijom B limfocita, ali održanom funkcijom T limfocita, imaju jednak obrazac razvoja upale nakon infekcije Hp-om kao i divlji tip (48). Ove studije su nedvojbeno dokazale važnost CD4+ T limfocita u razvoju karcinoma. Nadalje, analizirajući C57BL/6 soj miševa koji eksprimira prvenstveno Th-1 tip imunološkog odgovora (indukcija sinteze IFN- $\gamma$  i IL-12) i BALB/c soj koji dominantno eksprimira Th 2 odgovor (indukcija sinteze IL-4 i IL-5), uočeno je da je Th-2 tip odgovora povezan sa smanjenim oštećenjem sluznice želuca untaoč nemogućnosti eliminacije same bakterije. Štoviše, BALB/c soj je povezan s većom stopom bakterijske kolonizacije sluznice (49–51). Ukoliko se soj miševa C57BL/6 zarazi crijevnim parazitom *Heligmosomoides polygyrus* koji pak potiče Th2 tip odgovora, ponovno se uočava smanjena incidencija Hp inducirane atrofije i metaplazije (52). Potonje objašnjava paradoksalno nizak stupanj karcinoma želuca uz visoku prevalenciju Hp infekcije u pojedinim dijelovima Afrike gdje parazitarne infekcije nisu rijetkost. Populacijske studije provedene u Africi i Latinskoj Americi ukazuju da je omjer Th-2/Th-1 imunološkog odgovora značajno viši u regijama s niskom incidencijom karcinoma želuca (53,54).

Genetska varijabilnost Hp s genomom veličine 1,65 milijuna parova baza je poprilična (55). Osoba istovremeno može biti zaražena s nekoliko sojeva bakterija, a isto tako može

doći do mutacije bakterije nastanjene u domaćinu (56,57). Unatoč velikoj genetskoj varijabilnosti, kao glavni čimbenici virulencije prepoznati su geni koje kodira tzv. *cagPI* skupina (od eng. *cytotoxin-associated gene pathogenicity island*) te *vacA* (eng. *vacuolating toxin A*) i *babA2* (eng. *blood group antigen-binding adhesin*). *CagA* pozitivni sojevi su povezani s težim stupnjem upale te većom stopom zabilježene atrofije i adenokarcinoma u usporedbi s *cagA* negativnim sojevima (58–61). Smatra se da *cagA* gen kodira kompleksan ekskrecijski sustav koji bakterijskoj stanici omogućuje unos proteina u stanice želučanog epitela, koji potom dovode do pojačane mitoze, migracije i transformacije stanica domaćina. Tome u prilog govore i podaci da Hp *cagA* pozitivni sojevi u miševa dovode do pojave neoplazmi gastrointestinalnog i hematopoetskog sustava (62). Prevalencija *cagA* pozitivnog soja u zapadnim zemljama iznosi 60% dok je u Japanu gotovo 100% (63–65). Oko 50% svih sojeva Hp-a ekspirira *vacA* protein kodiran istoimenim genom. Naziv je dobio po karakterističnoj sposobnosti formiranja vakuola i pora u stanicama domaćina. *In vitro* je dokazano snažan inhibitor aktivacije T limfocita (66). BabA proteini koji se nalaze na površini Hp-a omogućavaju bakteriji adherenciju za stanicu domaćina vežući se za glikosfingolipide na površini želučane sluznice (67). Sojevi Hp-a koji istovremeno ekspiriraju navedene gene *babA2*, *vacAs1* i *cagA*, povezani su s većom prevalencijom ulkusa i adenokarcinoma želuca (68).

#### 1.3.3.2. Epstein-Barr virus

Između 5% do 10% slučajeva karcinoma želuca povezano je s infekcijom virusom Epstein-Barr (EBV) (69). Ovaj patogen je nađen isključivo u zloćudno promijenjenim stanicama. Njegova uloga u karcinogenezi još nije do kraja istražena (70).

#### 1.3.3.3. *Prehrana*

Smatra se da je sveukupni pad incidencije karcinoma želuca u svijetu prvenstveno posljedica široke uporabe hladnjaka i veće konzumacije svježeg voća i povrća (23). Skladištenje hrane na niskim temperaturama smanjuje kontaminaciju hrane gljivama i bakterijama te bakterijsku produkciju nitrita. Visoko procesuirane namirnice sa značajnim udjelom soli, nitrata i policikličkih amina dovode se u vezu s nastankom karcinoma želuca (71). Kao posebno kancerogene tvari ističu se nitrati. Naime, bakterije i makrofagi reduciraju nitrate u nitrite koji potom tvore N-nitrozo spojeve koji su poznati mitogeni i karcinogeni. Iako su N-nitrozo spojevi u štakora dokazani uzročnici karcinoma želuca u ljudi nisu nađeni nedvojbeni dokazi (72). Rezultati prospektivnih studija su oprečni. Švedska studija je zabilježila dvostruko veći rizik od razvoja karcinoma želuca u osoba koje konzumiraju veće količine nitrata (71), dok dvije europske studije nisu našle statistički značajnu povezanost (73,74). Rezultati meta-analize iz 2019. godine ukazuju na povećani rizik razvoja karcinoma želuca s prehranom bogatom nitritima, ali ne i nitratima (75). Prehrana s visokim udjelom soli je povezana s 1,5 do 2 puta većim rizikom za razvoj karcinoma želuca (76). Studije na životinjskim modelima pokazuju da velike količine soli u prehrani u jedinki zaraženih Hp-om dovode do veće stope atrofičnog gastritisa i posljedično veće stope karcinoma želuca (77). Epidemiološke studije nisu pokazale jednoznačan utjecaj konzumacije voća i povrća na razvoj karcinoma želuca (78–80). S druge pak strane hrana bogata svježom ribom i antioksidansima bi mogla djelovati protektivno (81–84).

#### 1.3.3.4. *Pušenje*

Pušenje je dobro poznati karcinogen koji je povezan s razvojem većeg broja karcinoma u ljudi. Epidemiološke studije i meta-analize pokazuju da pušači imaju 1,5 do 2 puta veći

rizik razvoja karcinoma želuca od nepušača (85–89). Povećan rizik je jednako povezan s karcinomima kardije kao i s karcinomima distalnog dijela želuca. Rizik za razvoj karcinoma raste s količinom konzumiranog duhana. Noviji supstituti duhanskih prerađevina koji su namijenjeni udisanju pare, bez procesa izgaranja, iako patentirani s ciljem redukcije kancerogenih nitrozamina, povezani su s 1,4 puta većim rizikom za razvoj karcinoma distalnog dijela želuca (90). Također, u Hp pozitivnih miševa izloženih ovim produktima zabilježena je veća stopa karcinoma u odnosu na neizložene Hp pozitivne miševe (13).

#### 1.3.3.5. *Alkohol*

Većina epidemioloških studija je pokazala slabu (91–94) ili nikakvu povezanost konzumacije alkohola i razvoja karcinoma želuca (88,95,96). Povezanost je vjerojatno uvjetovana multiplim faktorima poput veće izloženosti duhanskim proizvodima i smanjenom tjelesnom aktivnošću u osoba koje konzumiraju veće količine alkohola. Zanimljivo je da konzumacija alkohola povećava rizik od razvoja karcinoma želuca u jedinki s određenim polimorfizmima gena za alkohol-dehidrogenazu (97).

#### 1.3.3.6. *Pretilost*

Pretilost je dobro poznati rizični faktor za razvoj više maligniteta gastrointestinalnog sustava. Povišeni indeks tjelesne mase, a posebno morbidna pretilost (definirana kao indeks tjelesne mase veći od 35) su povezani s povećanim rizikom za razvoj karcinoma kardije, ali ne i distalnog dijela želuca (98–103). Mogući razlog ove povezanosti su proinflamatorni citokini i adipokini koje proizvodi intraabdominalno visceralno masno tkivo (104).

### 1.3.3.7. *Genetska predispozicija*

Iako je oko 10% slučajeva karcinoma želuca koncentrirano unutar obitelji, smatra se da je svega 1-3% slučajeva genetski uvjetovano (105,106). Nasljedni karcinomi želuca se mogu podijeliti u 3 glavna sindroma: nasljedni difuzni karcinom želuca, adenokarcinom želuca i proksimalna polipoza želuca te obiteljski intestinalni karcinom želuca (107). Pri tome su samo za nasljedni difuzni karcinom želuca detektirane jasne uzročne genetske mutacije i to u genima *CDH1* (e-kadherin) i *CTNNA1* (katenin alfa 1) (106,108–111). U osoba s mutacijom *CDH1* gena karcinom želuca se može pojaviti i prije navršenih 40 godina starosti, a smatra se da će 70% nosioca mutacije tijekom života razviti karcinom (112). Ova mutacija također je povezana s razvojem obiteljskog lobularnog karcinoma dojke (113,114). Ostali tumorski sindromi povezani s karcinomom želuca su Li-Fraumeni sindrom (mutacija u genu *TP53*), Peutz-Jeghers sindrom (mutacija u genu *STK11*) i sindrom obiteljske adenomatozne polipoze kolona (106,107).

## 1.3.4. **Premaligne promjene**

### 1.3.4.1. *Kronični atrofični gastritis*

Kronični atrofični gastritis se, kako je već ranije navedeno, smatra jednim predstadijem u procesu karcinogeneze. Definiran je kao stanjivanje mukoze i gubitak visoko specijaliziranih stanica želučanih žlijezda (115). Godišnja incidencija progresije atrofičnog gastritisa u karcinom želuca varira ovisno o studiji, između 0,1% i 1% (116–120), pri čemu je uočena pozitivna korelacija između površine želuca zahvaćene promjenama i pojavnosti karcinoma (121–123). Etiološki gledano, postoje dva tipa kroničnog atrofičnog gastritisa:

znatno češći multifokalni atrofični gastritis uzrokovan okolišnim čimbenicima, prije svega Hp infekcijom, te autoimuni atrofični gastritis koji je posljedica stvaranja protutijela na parijetalne stanice želuca i intrinzični faktor. Potonji najčešće zahvaća sluznicu fundusa i tijela želuca te je povezan s razvojem perniciozne anemije. Iako je i u oboljelih od autoimune forme bolesti uočen povećan rizik za razvoj karcinoma želuca, on je daleko manji od onoga inducirano Hp-om (120,124). Mogući razlog je blaži stupanj upale koji se redovito vidi u autoimunom gastritisu. Pretpostavlja se da atrofični gastritis, neovisno o svojoj etiologiji, dovodi do hipoklorhidrije, u težim oblicima i aklorhidrije, čime je narušena primarna barijera imunološkog sustava i omogućen nesmetan razvoj bakterija. Bakterije potom dovode do povećane produkcije karcinogenih N-nitrozo spojeva. Također, kao odgovor na smanjenu produkciju želučane kiseline dolazi do povećane sekrecije gastrina, dobro poznatog čimbenika rasta, čije kontinuirano visoke koncentracije mogu dovesti do abnormalne proliferacije i zloćudne transformacije (125,126).

#### 1.3.4.2. *Intestinalna metaplazija i displazija*

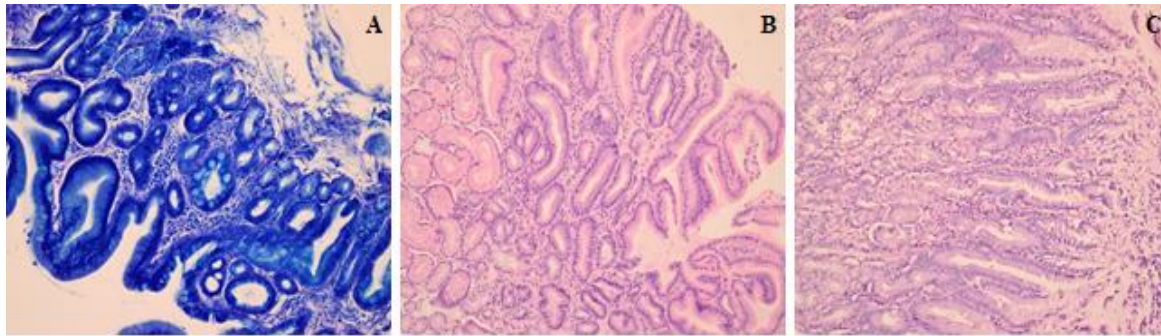
Želučana intestinalna metaplazija je definirana kao zamjena želučanog epitela intestinalnim (Slika 4A). Nekoliko je različitih klasifikacija metaplazije. S obzirom na površinu koju zauzima dijeli se na lokaliziranu i ekstenzivnu intestinalnu metaplaziju. Lokalizirana metaplazija zahvaća antrum želuca ili područje *incisurae angularis*, dok ekstenzivna zahvaća područje korpusa želuca i antrum i/ili područje *incisurae angularis*. S obzirom na to da metaplazija u području antruma često nije kontinuirana te se prilikom biopsije može dobiti lažno negativan nalaz, dokazana izolirana intestinalna metaplazija korpusa želuca se često smatra pandanom ekstenzivnoj metaplaziji (115,127–129). Prema histološkoj klasifikaciji želučana metaplazija se može podijeliti u 3 tipa (130):



- 1) Tip I (kompletna) intestinalna metaplazija koju karakteriziraju prisustvo vrčastih stanica koje secerniraju intestinalni sijalomucin i dobro diferenciranih nesekretornih apsorptivnih stanica. Ovaj tip metaplazije nije povezan s povećanim rizikom za razvoj karcinoma.
- 2) Tip II (inkompletna) intestinalna metaplazija koju karakteriziraju prisustvo cilindričnih stanica u različitim stupnjevima diferencijacije i vrčaste stanice koje izlučuju kombinaciju želučanih (neutralnih) mucina i intestinalni sijalomucin.
- 3) Tip III (inkompletna) intestinalna metaplazija koja se sastoji od slabo diferenciranih stanica i vrčastih stanica koje izlučuju prvenstveno sulfomucin.

Tip II i III intestinalne metaplazije su povezani s 20 puta većim rizikom za razvoj karcinoma želuca (131,132). Tijekom 5-godišnjeg praćenja bolesnika s tipom III intestinalne metaplazije, rani karcinom želuca razvilo je 42% ispitanika (131).

Prema važećoj klasifikaciji iz 2000. godine želučana displazija može biti niskog ili visokog stupnja (Slika 4B i C) (133). Prospektivne studije pokazuju da displazija niskog stupnja regredira u 60% slučajeva, a u 10% do 20% slučajeva progredira u displaziju visokog stupnja (134–136). Displazija visokog stupnja rijetko kada regredira. U godini dana 2% do 6% bolesnika s visokim stupnjem displazije razvije karcinom želuca (135,137).



Slika 4. Histološki izgled sluznice želuca koji pokazuje promjene epitela. A, intestinalna metaplazija - nalaze se stanice intestinalnog tipa epitela te vrčaste „goblet“ stanice (Giemsa x200); B, blaga displazija epitela - hiperkromatske jezgre, dijelom se penju prema lumenu (HE x200); C, displazija epitela koja prelazi u karcinom (HE x200)

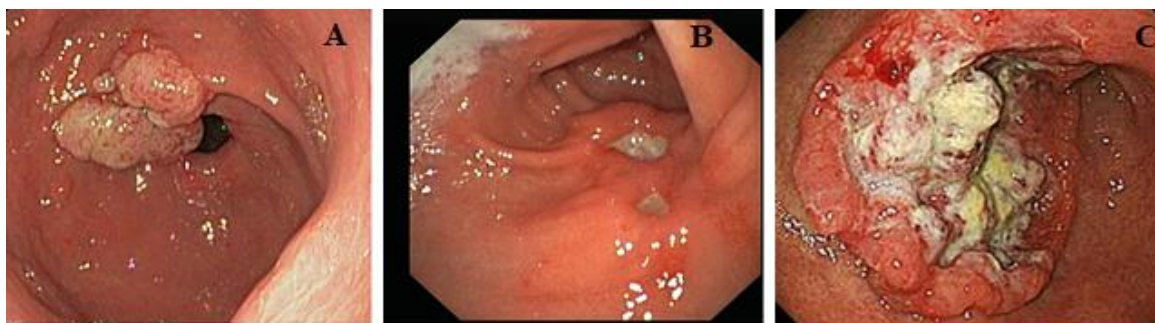
#### 1.3.4.3. *Želučani polipi*

Prevalencija polipa želuca u općoj populaciji je između 0,8% i 2,4% (138,139). Oko 50% polipa su polipi fundusnih žlijezda, 40% otpada na hiperplastične polipe, a svega 10% na adenomatozne polipe (139,140). Polipi fundusnih žlijezda su najčešće benigne naravi te se češće viđaju u osoba koje koriste inhibitore protonske pumpe (141). Procjenjuje se da se maligna transformacija ovih polipa događa u svega 1% slučajeva i to većinom u polipa većih od 1cm (142). Iznimka su polipi fundusnih žlijezda koji se javljaju u sklopu obiteljske adenomatozne polipoze kolona gdje je displazija prisutna u oko 40% bolesnika s prisutnom polipozom želuca (143). Hiperplastični polipi su također najčešće benigni, često multipli te se povezuju sa stanjima kronične upale. Tijekom vremena mogu regredirati, ostati nepromijenjeni ili se povećati. Regresija često uslijedi nakon eradikacije Hp. Ovi polipi rijetko maligno alteriraju (142). Adenomatozni polipi želuca (Slika 5A), za razliku od prethodna dva tipa, imaju visoku stopu maligne alteracije. Procjenjuje se da će 11% ovih lezija progredirati do *in situ* karcinoma unutar 4 godine (144). Stoga smjernice Britanskog

gastroenterološkog društva sugeriraju uklanjanje svih adenoma želuca kao i polipa s detektiranom displazijom (145).

#### 1.3.4.4. *Želučani ulkusi*

Iako etiopatogeneza nije sasvim razjašnjena, anamneza želučanog ulkusa (Slika 5B) je povezana s 1,8 puta većim rizikom za razvoj karcinoma distalnog dijela želuca (146). Povezanost s karcinomima kardije želuca nije pronađena. Zanimljivo je da je postojanje duodenalnog ulkusa povezano sa smanjenim rizikom za razvoj karcinoma želuca (147).



Slika 5. Endoskopske slike. A, polip želuca; B, dva ulkusa želuca; C, karcinom želuca

#### 1.3.4.5. *Ménétrierova bolest*

Smatra se da oko 15% oboljelih od Ménétrierove bolesti razvije karcinom želuca. Ovo je oblik gastritisa nepoznata uzroka kojeg karakterizira zadebljana želučana stijenka, s velikim naborima, povećanim žlijezdama i cistama s tekućinom. Dokumentirano je nekoliko slučajeva postupne progresije od displazije do karcinoma (13). S obzirom da se radi o izrazito rijetkoj bolesti, ne postoje jasne smjernice o praćenju i terapiji.

### 1.3.5. Kliničke karakteristike karcinoma želuca

Najčešći simptomi bolesnika s karcinomom želuca su gubitak na tjelesnoj masi i bolovi u abdomenu (Tablica 1). Do gubitka tjelesne mase dolazi primarno zbog smanjenog kalorijskog unosa uslijed inapetencije, mučnine, osjećaja rane sitosti ili straha od nelagode i bolova koju konzumacija hrane može uzrokovati. Bolovi su uglavnom nespecifični i variraju od blage povremene nelagode u epigastriju do konstantnih jakih bolova, uglavnom kod uznapredovale bolesti (148). Ponekad su bolovi nalik onima kod bolesnika s peptičkim ulkusima, a očituju se postprandijalnim bolovima i osjećajem punoće u epigastriju te učestalim podrigivanjem (149,150).

Klinička prezentacija ovisi i o anatomskoj lokalizaciji bolesti. Kod dijela bolesnika, češće onih s karcinomom proksimalnog dijela želuca ili karcinomom ezofagogastričnog prijelaza, glavni simptom može biti disfagija. S druge strane, kod bolesnika s karcinomom distalnog dijela želuca mogu se javiti tegobe uslijed smetnji pasaže u duodenum u vidu mučnine i/ili povraćanja. Povraćanje i mučnina mogu biti i prvi znakovi difuznih karcinoma želuca, a javljaju se zbog infiltracije stijenke želuca tumorskom masom i posljedičnom smanjenom sposobnosti distenzije.

Dio bolesnika s karcinomom želuca prezentira se krvarenjem iz gastrointestinalnog sustava. Krvarenje može biti okultno, ali i manifestno u obliku hematemeze ili melene (148).

Kod bolesnika s proširenom bolesti, simptomatologija može biti posljedica diseminacije karcinoma. U slučaju peritonealne diseminacije bolesnik se može prezentirati ascitesom, kod metastatske bolesti jetre prvi simptom može biti žutica (151), a kod zahvaćenosti limfnih čvorova bolest se može prezentirati limfadenopatijom, tipično lijevo supraklavikularno (Virchowljev limfni čvor) (152).

Rjeđe se kod bolesnika koji razviju paraneoplastički sindrom mogu javiti tromboflebitis, neuropatije, nefrotski sindrom ili diseminirana intravaskularna koagulacija (13).

Tablica 1. Učestalost simptoma i kliničkih prezentacija karcinoma želuca (148)

<b>Simptomi bolesnika s karcinomom želuca</b>	<b>Postotak (%)</b>
gubitak na tjelesnoj masi	62
bolovi u abdomenu	52
mučnina	34
disfagija	26
melena	20
osjećaj rane sitosti	18
tegobe nalik onima kod ulkusne bolesti	17

### 1.3.6. Dijagnostika karcinoma želuca

Metoda izbora za dijagnosticiranje karcinoma želuca je ezofagogastroduodenoskopija (EGD) s obzirom da se definitivna dijagnoza postavlja temeljem patohistološkog nalaza. Prednost EGD je mogućnost direktne vizualizacije kompletne sluznice i uzimanje bioptičkih uzoraka suspektnih lezija (153). Makroskopski suspektne neoplastične lezije mogu biti morfološki različite, a prema pariškoj klasifikaciji dijele se u one iznad razine, u razini i ispod razine sluznice (Slika 6) (154).



Slika 6. Shematski prikaz izgleda morfološki različitih makroskopski suspektne neoplastične lezije (Preuzeto i modificirano iz: Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 2020 (13))

Tipični karcinomi želuca izgledaju kao egzulcerirane vulnerabilne mase neravnih, zadebljanih rubova (Slika 5C), no u čak do 5% naizgled benignih ulkusnih lezija patohistološki se potvrde maligne stanice. Iz tog razloga je nužno biopsirati svaki želučani ulkus, osobito one koji ne cijele te se preporučuje uzimanje multiplih bioptičkih uzoraka s ruba lezije, povećavajući na taj način osjetljivost pretrage (13,153). Poseban dijagnostički izazov predstavljaju karcinomi sa submukoznim širenjem (*linitis plastica*) kod kojih sluznica može imati uredan izgled i jedini patološki nalaz može biti smanjena distenzija želuca kod insuflacije zraka (153).

Uz klasičnu endoskopiju s bijelim svjetlom, u zadnje vrijeme se razvija i ulazi u svakodnevnu upotrebu više novih metoda kao što su kromoendoskopija, magnifikacijska

endoskopija, “narrow band imaging” (NBI) i autofluorecencija koje za cilj imaju optimalnu vizualizaciju i poboljšanu detekciju malignih lezija (155). Osobito su korisne u detekciji ranog karcinoma želuca budući da olakšavaju vizualizaciju morfoloških promjena i povećane gustoće mikrovaskulature u maligno promijenjenom epitelu za koje se pokazalo da su jedni od prvih markera maligne transformacije (156).

Endoskopski ultrazvuk (EUS), kompjuterizirana tomografija (CT), magnetska rezonancija (MR) i pozitronska emisijska tomografija (PET/FDG) u pravilu se ne koriste za postavljanje dijagnoze karcinoma želuca, no korisne su metode za procjenu proširenosti bolesti i praćenje odgovora bolesti na liječenje (157).

Serumski markeri koji se koriste u svakodnevnoj praksi poput karcinoembrinalnog antigena (CEA), tumorskih antigena CA 19-9, CA 125, CA 72-4, alfa fetoproteina (AFP) ili pepsinogena nisu dovoljno osjetljivi niti specifični za postavljanje dijagnoze ili probir bolesnika s karcinomom želuca, s obzirom da se javljaju i kod drugih neoplazmi epitelnog podrijetla, no našli su svoju primjenu u praćenju odgovora bolesnika na terapiju (158,159). U studijama su identificirani i neki novi potencijalni markeri kao što su transformirajući faktor rasta  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), tumorska M2-piruvat kinaza i faktor rasta hepatocita, no potrebno je još istražiti njihovu učinkovitost u detekciji karcinoma želuca (13).

### 1.3.7. Patologija i klasifikacija karcinoma želuca

Maligni epitelni tumori želuca se prema najnovijoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2019. godine dijele u nekoliko velikih skupina: adenokarcinomi, karcinomi pločastih stanica, adenoskvamozni karcinomi, nediferencirani karcinomi, gastroblastomi, neuroendokrini tumori, neuroendokrini karcinomi i miješane neuroendokrine i neneuroendokrine neoplazme (160). Unutar svake od navedenih velikih grupa postoje brojni podtipovi, no patohistološki se svi mogu svrstati u jednu od osnovnih skupina po Laurenovoj klasifikaciji (13).

Od svih zloćudnih novotvorina želuca adenokarcinomi čine 85% (161). Najčešći podtip adenokarcinoma su tubularni adenokarcinomi i čine oko 45% adenokarcinoma u europskim zemljama, malo manje od 10% čine papilarni adenokarcinomi, dok slabo kohezivni adenokarcinomi, karcinomi stanica prstena pečatnjaka i svi ostali podtipovi kumulativno čine do 50% svih adenokarcinoma želuca (Tablica 2) (160).



Tablica 2. Podjela karcinoma želuca prema tipu stanica od kojih su nastali po klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2019. (WHO, 2019)

<b>Adenokarcinom</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Tubularni adenokarcinom</li> <li>Karcinom parijetalnih stanica</li> <li>Adenokarcinom s miješanim podtipovima</li> <li>Papilarni adenokarcinom</li> <li>Mikropapilarni karcinom</li> <li>Mukoepidermoidni karcinom</li> <li>Mucinozni adenokarcinom</li> <li>Karcinom stanica prstena pečatnjaka</li> <li>Slabo kohezivni karcinom</li> <li>Medularni karcinom s limfoidnom stromom</li> <li>Hepatoidni adenokarcinom</li> <li>Karcinom Panethovih stanica</li> </ul>
<b>Karcinom pločastih stanica</b>
<b>Adenoskvamozni karcinom</b>
<b>Nediferencirani karcinom</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Karcinom velikih stanica s rabdoidnim fenotipom</li> <li>Pleomorfni karcinom</li> <li>Sarkomatoidni karcinom</li> <li>Karcinom s gigantskim stanicama nalik osteoklastima</li> </ul>
<b>Gastroblastom</b>
<b>Neuroendokrini tumor</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Neuroendokrini tumor gradus 1</li> <li>Neuroendokrini tumor gradus 2</li> <li>Neuroendokrini tumor gradus 3</li> <li>Gastrinom</li> <li>Somatostatinom</li> <li>Karcinoid enterokromafinih stanica</li> <li>Maligni karcinoid enterokromafinih stanica</li> </ul>
<b>Neuroendokrini karcinom</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Neuroendokrini karcinom velikih stanica</li> <li>Neuroendokrini karcinom malih stanica</li> </ul>
<b>Miješana neuroendokrini i ne-neuroendokrini neoplazma (MiNEN)</b>

Druga važna podjela karcinoma želuca koja ima implikacije na liječenje i prognozu bolesti jest na rani karcinom želuca i uznapredovali karcinom želuca. Ranim karcinomom želuca smatraju se sve maligne lezije koje su ograničene na mukozu i submukozu, neovisno o postojanju eventualnih metastaza, dok se svaka lezija koja infiltrira mišićni sloj smatra uznapredovalim karcinomom želuca. Koncept datira iz 60-ih godina kada je u Japanu započet sustavni probir rizičnih skupina zbog visoke incidencije karcinoma želuca (162).

Većina ranih karcinoma želuca su veličinom male lezije (u prosjeku 2-5 cm) i anatomski su češće lokalizirani na maloj krivini i oko angulusa, no mogu biti i multifokalni što je vrlo često povezano s lošijom prognozom. Makroskopski se dijele prema pariškoj klasifikaciji kao i sve druge površinske neoplastične lezije probavnog trakta. Histološki, uobičajene forme ranog karcinoma želuca su dobro diferencirane, uglavnom tubularne i papilarne arhitekture, no razlikovanje dobro diferenciranog karcinoma i displazije visokog stupnja ili *in situ* karcinoma može biti izazovno (163). Upravo razlikama u histološkoj interpretaciji se djelomično može pripisati značajna razlika u incidenciji ranog karcinoma u studijama iz azijskih centara u odnosu na zapadnjačke centre. Zapadnjački patolozi tipično uzimaju invaziju *laminae propriae* odlučujućim faktorom za dijagnozu karcinoma, dok to nije nužan uvjet u azijskim centrima. Kako bi se maksimalno uniformirali nalazi među različitim centrima formulirana je bečka klasifikacija gastrointestinalnih epitelnih neoplazija u kojoj je prepoznato nekoliko kategorija (164):

- kategorija 1: negativno na neoplaziju/displaziju
- kategorija 2: neodređeno za neoplaziju/displaziju
- kategorija 3: neinvazivna neoplazija niskog stupnja (adenom/displazija niskog stupnja)
- kategorija 4: neinvazivna neoplazija visokog stupnja
  - 4.1: adenom/displazija visokog stupnja

- 4.2: neinvazivni karcinom (*in situ* karcinom)
- 4.3: suspektan invazivni karcinom
- kategorija 5: invazivna neoplazija
  - 5.1: intramukozni karcinom (invazija)

### 1.3.8. Procjena stadija karcinoma želuca

Procjena stupnja proširenosti bolesti (engl. *staging*) ima za cilj stratificirati bolesnike s karcinomom želuca u dvije skupine – one s lokoregionalnom bolesti koji su potencijalno izlječivi i one s lokalno uznapredovalom, metastatskom ili neresektabilnom bolesti. Najšire korišten sustav procjene proširenosti bolesti je TNM klasifikacija: „T“ karakterizira primarni tumor i odnosi se na dubinu invazije i zahvaćanje okolnih struktura, „N“ označava zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, dok „M“ karakterizira prisutnost, odnosno odsutnost udaljenih metastaza (Tablica 3) (165). U kategoriju okolnih struktura ubrajaju se slezena, transversalni kolon, jetra, dijafragma, gušterača, trbušna stijenka, nadbubrežne žlijezde i bubrezi, tanko crijevo i retroperitoneum. U regionalne limfne čvorove ubrajaju se limfni čvorovi uz malu i veliku krivinu želuca, limfni čvorovi oko lijeve gastične arterije, hepatalne i lijenalne arterije, trunkusa celijakusa te limfni čvorovi u hepatoduodenalnom ligamentu, dok se zahvaćenost ostalih intraabdominalnih limfnih čvorova kategorizira kao udaljena metastaza. Udaljenim metastazama, osim neregionalnih limfnih čvorova i udaljenih hematogenih metastaza, smatraju se i peritonealne presadnice, pozitivan nalaz malignih stanica u ascitesu i tumori omentuma koji nisu u kontinuitetu s primarnim tumorom (160).

Tablica 3. Pregled TNM klasifikacije karcinoma želuca prema smjernicama AJCC Cancer Staging Manual 2017 (165)

<b>Primarni tumor (T)</b>	
TX	primarni tumor se ne može procijeniti
T0	primarni tumor nije dokazan
Tis	<i>in situ</i> karcinom
T1	tumor invadira laminu propriju, muskularis mukoze ili submukožu
T1a	tumor invadira laminu propriju ili muskularis mukoze
T1b	tumor invadira submukožu
T2	tumor invadira muskularis propriju
T3	tumor penetrira subserozno vezivno tkivo bez invazije visceralnog peritoneja ili okolnih struktura
T4	tumor invadira visceralni peritonej ili okolne strukture
T4a	tumor invadira visceralni peritonej
T4b	tumor invadira okolne strukture
<b>Regionalni limfni čvorovi (N)</b>	
NX	regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
N0	bez metastaza u regionalne limfne čvorove
N1	metastaze u 1-2 regionalna limfna čvora
N2	metastaza u 3-6 regionalnih limfnih čvorova
N3	metastaze u 7 i više u regionalnih limfnih čvorova
N3a	metastaze u 7-15 u regionalnih limfnih čvorova
N3b	metastaze u 16 i više u regionalnih limfnih čvorova
<b>Udaljene metastaze (M)</b>	
M1	bez udaljenih metastaza
M2	prisutne su udaljene metastaze

Jedna od glavnih razlika revizije iz 2017. godine u usporedbi s onom prethodnom iz 2010. je redefinicija granice karcinoma koji zahvaćaju ezofagogastrični spoj. Prema aktualnoj klasifikaciji sve neoplazme s epicentrom tumora udaljenim do 2 cm prema proksimalnom želucu ubrajaju se u tumore jednjaka, dok se one udaljene više od 2 cm od ezofagogastričnog spoja klasificiraju kao tumori želuca. Osim toga, u klasifikaciju su dodane i odvojene prognostičke kategorije ovisno o kliničkom (Tablica 4) i patološkom (Tablica 5) stadiju bolesti te procjena stadija bolesti u bolesnika kod kojih je provedena neoadjuvantna terapija (Tablice 6) (165).

Tablica 4. Pregled kliničkog stadija bolesti prema kliničkom TNM (165)

<b>Klinički stadij (cTNM)</b>			
Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij I	T1, T2	N0	M0
Stadij IIA	T1, T2	N1, N2, N3	M0
Stadij IIB	T3, T4a	N0	M0
Stadij III	T3, T4a	N1, N2, N3	M0
Stadij IVA	T4b	Bilo koji N	M0
Stadij IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

Tablica 5. Pregled kliničkog stadija bolesti prema patohistološkom TNM (165)

<b>Patološki stadij (pTNM)</b>	
Stadij 0	TisN0
Stadij IA	T1N0
Stadij IB	T1N1, T2N0
Stadij IIA	T1N2, T2N1, T3N0
Stadij IIB	T1N3a, T2N2, T3N1, T4aN0
Stadij IIIA	T2N3a, T3N2, T4aN1, T4aN2, T4bN0
Stadij IIIB	T1N3b, T2N3b, T3N3a, T4aN3a, T4bN1, T4bN2
Stadij IIIC	T3N3b, T4aN3b, T4bN3a, T4bN3b
Stadij IV	Bilo koji T, bilo koji N i M1

\*stadiji I-III podrazumijevaju M0

Tablica 6. Pregled kliničkog stadija bolesti prema patohistološkom TNM nakon neoadjuvantne terapije (165)

<b>Stadij nakon neoadjuvantne terapije (ypTNM)</b>	
Stadij I	T1N0, T2N0, T1N1
Stadij II	T3N0, T2N1, T1N2, T4aN0, T3N1, T2N2, T1N3,
Stadij III	T4aN1, T3N2, T2N3, T4bN0, T4bN1, T4aN2, T3N3, T4bN2, T4bN3, T4aN3
Stadij IV	Bilo koji T, bilo koji N i M1

\*stadiji I-III podrazumijevaju M0

Najčešće korištena inicijalna metoda procjene proširenosti bolesti je CT toraksa, abdomena i zdjelice s intravenskim i peroralnim kontrastom (166,167). CT se pokazao pouzdanim u detekciji udaljenih presadnica karcinoma, ali je ograničene pouzdanosti u procjeni dubine invazije primarnog tumora, detektiranju sekundarnih lezija manjih od 5 mm, zahvaćenosti limfnih čvorova ili peritonealne diseminacije. Kod čak 20-30% bolesnika bez CT verificiranih znakova proširene bolesti eksploracijom su pronađene peritonealne presadnice (167,168).

EUS se prema važećim ESMO i NCCN smjernicama preporuča kod većine bolesnika kod kojih CT-om nije dokazana diseminacija bolesti budući da se pokazao osjetljivim za procjenu dubine invazije tumora i eventualne zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova, a o čemu uvelike ovisi daljnje liječenje. Prednost EUS-a je i mogućnost tankoiglene aspiracije (FNA) ili aspiracijske biopsije (FNAB) suspektnih lezija tijekom postupka te moguća precizna detekcija submukozne invazije kod bolesnika s ranim karcinomom želuca (166,167). Osim toga, EUS-om se jasno može prikazati svih 5 slojeva želučane sluznice te se s oko 90%-tnom sigurnošću može razlučiti mukozna od submukozne invazije što ga čini korisnom metodom kod bolesnika s ranim karcinomom želuca (13).

MR se pokazao osjetljivijom metodom za detekciju jetrenih sekundarizama u usporedbi s CT-om (osobito onih manjih od 10 mm), no nije nađeno značajne razlike u specifičnosti (169). U 3 neovisne studije direktno su uspoređivani nalazi MR-a, CT-a i EUS-a u procjeni dubine invazije karcinoma želuca (T „staging“). Rezultati su pokazali veću specifičnost MR-a i CT-a u odnosu na EUS, dok se EUS pokazao kao osjetljivija metoda. Sveukupno su rezultati svih triju slikovnih metoda bili podjednaki ili diskretno na strani MR-a (170), no s obzirom na ograničenu dostupnost i veći trošak u hrvatskim centrima se rijetko koristi kao slikovna metoda izbora.

Pozitronska emisijska tomografija s fluorodeoksiglukozom (PET/FDG) najčešće se koristi kod dvojbenih/graničnih slučajeva. Uglavnom se radi o bolesnicima s T2N0 stadijem i više kod kojih CT-om nisu sa sigurnošću verificirane udaljene metastaze ili kod kojih je suspektna etiologija limfadenopatije. Ograničenje ove metode je u mogućnosti lažno negativnih nalaza kod tumora s niskom metaboličkom aktivnosti ili onih koji ne apsorbiraju FDG kao što je slučaj s većinom adenokarcinoma želuca, a osobito difuznih karcinoma (1,166).

### 1.3.9. Liječenje i prognoza

Odabir optimalne terapijske metode ovisi o stadiju bolesti i o kliničkom stanju bolesnika (ECOG kriteriji). Primarni modalitet liječenja bolesnika s karcinomom želuca još uvijek je kirurška resekcija, koja za neke bolesnike s lokoregionalnom bolesti može biti kurativna, dok se za one s uznapredovalom bolesti koristi u svrhu palijacije simptoma (smetnje pasaže ili perzistentno krvarenje iz tumora). Za tumore proksimalnog želuca ili difuzne tumore metoda izbora je totalna gastrektomija, dok se kod tumora distalnog želuca uglavnom odabire pošteniji zahvat u vidu parcijalne gastrektomije, budući da u više randomiziranih multicentričnih studija nije dokazana razlika u ukupnom preživljenju (13).

Kod svih bolesnika bez jasnog dokaza udaljene diseminacije bolesti ili invazije velikih vaskularnih struktura poput aorte, trunkusa celijakusa i hepatalne arterije indicirano je kirurško liječenje kao potencijalna kurativna metoda. Invazija distalnog dijela lijenalne arterije kao niti proširenost u limfne čvorove oko trunkusa celijakusa nisu nužno indikator neresekabilne bolesti, no ponekad je teško donjeti odluku temeljem slikovnih metoda te se kod izabranog dijela bolesnika može učiniti preoperativna eksploracija. S druge strane,



bolesnici s peripankreatičnom, aortokavalnom, medijastinalnom ili portalnom limfadenopatijom nisu kandidati za resekciju s obzirom na visoki rizik od prisutnih okultnih presadnica (171).

Ekstenzivnost resekcije limfnih čvorova još uvijek je predmet rasprava, a pristup se najviše razlikuje između azijskih i zapadnjačkih centara. Azijski centri imaju radikalniji pristup te zagovaraju D2 resekciju (resekcija limfnih čvorova uz trunkus celijakus, u hepatoduodenalnom ligamentu i perigastričnih limfnih čvorova), dok se u zapadnjačkim centrima u pravilu odlučuju za D1 resekciju (perigastrični limfni čvorovi) s ekstirpacijom minimalno 15 limfnih čvorova. Kroz više randomiziranih multicentričnih europskih studija nije nađeno značajne razlike u petogodišnjem preživljenju bolesnika između onih s D1 i D2 resekcijom, dok je D2 resekcija je bila povezana s većim perioperativnim mortalitetom i češćim razvojem komplikacija (13).

Kako sveukupno preživljenje bolesnika nakon kirurškog liječenja ipak nije zadovoljavajuće, vrlo važnim su se pokazali perioperativna (neoadjuvantna) kemoterapija i postoperativna (adjuvantna) kemo(radio)terapija.

Za bolesnike sa stadijem T2N0 i višim uglavnom se koristi kombinirani terapijski pristup koji osim kirurške resekcije uključuje i kemo(radio)terapiju (172). Adjuvantna kemoterapija nakon kirurške resekcije, čak i u slučaju resektabilne bolesti, pokazuje obećavajuće rezultate. Vrlo često kod bolesnika u kojih je napravljen potencijalno kurativan kirurški zahvat, a perioperativno je potvrđena invazija limfnih čvorova dolazi do povrata bolesti te se kod tih bolesnika provodi adjuvantna kemoterapija. Iako su rezultati vezani za preživljenje kontroverzni, u nekoliko studija je preživljenje bolesnika kod kojih je provedena adjuvantna kemoterapija bilo 15-20% veće u odnosu na one liječene samo kirurški (13).

Kod bolesnika koji zbog stadija bolesti ili lošeg kliničkog statusa nisu kandidati za kirurško liječenje provodi se kemoterapija kao monoterapija ili konkomitantno s radioterapijom.

Neoadjuvantna kemo(radio)terapija za cilj ima takozvani „downstaging“, odnosno smanjenje tumorske mase do razine kada bolest postaje potencijalno kurativna ili može biti od koristi kod bolesnika za koje je procijenjen visoki rizik od razvoja udaljenih metastaza (veliki T3/T4 tumori, pozitivni perigastrični limfni čvorovi) budući da se kod jednog dijela bolesnika u međuvremenu ipak verificiraju udaljene metastaze te ih se na taj način poštedi nepotrebnog kirurškog zahvata (13).

Zračenje kao monoterapija ima ograničenu primjenu u liječenju karcinoma želuca primarno zbog toga što su adenokarcinomi želuca relativno radiorezistentni tumori, a primjena visokih/adekvatnih doza iradijacije, zbog anatomske lokalizacije i niske tolerancije okolnih struktura na zračenje, nije moguća. Pokazalo se i da zračenje kao adjuvantna monoterapija nema utjecaja na dulje preživljenje bolesnika (173).

Kod bolesnika s ranim karcinomom želuca dodatni modalitet liječenja je endoskopska resekcija u vidu endoskopske mukozne resekcije ili endoskopske submukozne disekcije. Endoskopska resekcija je pogodna je za bolesnike kod kojih je procijenjeni rizik od proširenosti bolesti mali i kod kojih je zahvat vrlo vjerojatno kurativan. To su najčešće bolesnici s neulceriranim dobro diferenciranim lezijama manjim od 2 cm kod kojih nije verificirana limfokapilarna invazija (174).

Prognoza bolesnika s karcinomom želuca direktno ovisi o kliničkom stadiju bolesti (Tablica 7) i općenito je loša jer se bolest u čak do 50% bolesnika otkrije u uznapredovalom stadiju. Sveukupna 5-godišnja stopa preživljenja kod karcinoma želuca u SAD-u je samo 27% (13).

Tablica 7. Stope petogodišnjeg preživljenja bolesnika s karcinomom želuca ovisno o kliničkom stadiju, u nekoliko razvijenih zemljala (13)

<b>Stadij bolesti</b>	<b>Japan</b>	<b>Njemačka</b>	<b>SAD</b>
IA	95 %	86 %	78 %
IB	75 %	72 %	58 %
II	46 %	47 %	34 %
IIIA	48 %	34 %	20 %
IIIB	18 %	25 %	8 %
IV	5 %	16 %	7 %

## 1.4. Biomarkeri

Otkrivanje bolesti tek u uznapređovalom stadiju, invazivnost tumora i veliki metastatski potencijal razlozi su vrlo loše prognoze karcinoma želuca. Pravovremena dijagnoza ove bolesti je za sada još iznimno teška te se traže markeri koji bi ukazivali na rani stadij karcinoma, kao i ciljane molekule na koje bi se moglo djelovati i pospješiti liječenje već proširene bolesti.

Molekularni mehanizam metastaziranja karcinoma želuca je kompleksan proces, a ključni faktori uključeni u nastanak metastaza nisu dovoljno istraženi. Sam proces metastaziranja sastoji se od nekoliko koraka koji uključuju diseminaciju stanica iz primarnog tumora zbog gubitka međustaničnih veza, povećanje stanične pokretljivosti te produkciju proteaza, što omogućuje invaziju u okolna tkiva, kao i ulazak u krvožilni ili limfatički sustav (175). U slabije diferenciranim karcinomima većeg malignog potencijala, karcinomske stanice prolaze trans-diferencijacijski proces kojim gube međustanične veze i stanični polaritet te dolazi do citoskeletnih promjena čime epitelne stanice stječu mezenhimalne morfološke osobine s pojačanim motilitetom i invazivnošću. Ovakva promjena fenotipa poznata je kao epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) (176–178). Stoga su potencijalne molekule koje bi mogle biti rani biljeg, ali i ciljna mjesta terapijskog djelovanja, upravo molekule zadužene za osiguravanje međustaničnih spojišta i EMT tumorskih stanica.

### 1.4.1. Koneksin 43

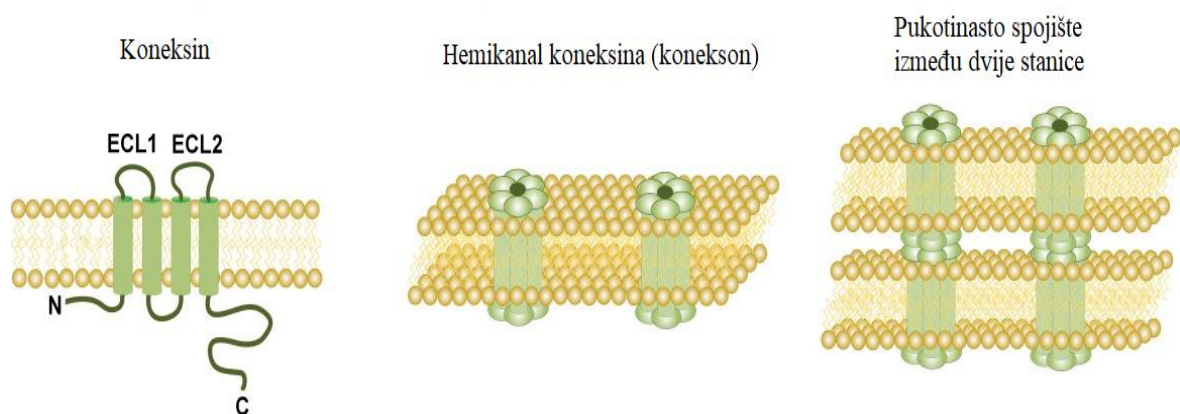
Stanice višestaničnih organizama međusobno komuniciraju na različite načine i ta je komunikacija nužna za održavanje homeostaze. Gotovo sve humane stanice u neposrednom kontaktu stvaraju različite vrste međustaničnih veza (spojišta), primjerice pukotinaste ili

propusne veze (eng. *gap junctions*, GJ), adherentne veze (engl. *adherens junctions*) i tijesne veze (engl. *tight junctions*) (179). Posljednjih se godina počela istraživati upravo uloga tih veza u nastanku i progresiji malignih bolesti.

Pukotinasta ili propusna spojišta su međustanične veze u obliku kanala promjera 1,5-2 nm kroz koje mogu proći molekule veličine do oko 1,2 kDa i time je, uz direktni kontakt, omogućena i direktna citoplazmatska izmjena sekundarnih glasnika i drugih malih molekula (uključujući ione kalcija, cAMP, cGMP, IP3, glutatione, ATP, NAD, glutamat, prostaglandine, glutatione, citokine itd.) (179–183). Takav način međustanične komunikacije se u literaturi naziva intercelularna (međustanična) komunikacija putem pukotinastih spojišta (eng. *gap junction intercellular communication*, GJIC). Svako pukotinasto spojište sastoji se od više kanala. Pojedini kanal se sastoji od dva transmembranska polukanala (hemikanala ili koneksiona) koji su smješteni na susjednim stanicama (184). Svaki konekson se pak sastoji od šest transmembranskih proteina, koneksina i paneksina (Slika 7) (185–187). Kanali mogu biti u jednom od tri stanja: otvorenom, zatvorenom ili rezidualnom.

Koneksini (Cx) su skupina transmembranskih proteina koji tvore pukotinasta spojišta (188). Poluvrijeme života koneksina je kratko i iznosi od 1 do 5 sati. Sinteza i razgradnja koneksinskih proteina je kontinuirani dinamički proces s kompliciranim regulatornim mehanizmima, što otvara mogućnosti za eventualne intervencije unutar tog ciklusa (189). Sintetiziraju se u jezgri transkripcijom dvadeset gena, ali posttranslacijski se događaju brojne modifikacije pa nastaje veći broj mogućih kombinacija. Do sada je poznato 20 izoformi koneksina. Imaju relativno malu molekulsku težinu, u rasponu 23-43 kDa, na kojoj se temelji i nomenklatura izoformi koneksina, a koneksin 43 ima molekulsku težinu 43 036 Da. Svaki koneksinski protein ima četiri transmembranske jedinice (M1 - M4), dvije izvanstanične petlje koje su čvrsto povezane disulfidnim vezama (ECL 1 i ECL 2),

citoplazmatski N-terminalni kraj i citoplazmatski C-terminalni kraj koji čini visokovarijabilnu citoplazmatsku petlju (Slika 7) (190,191). Citoplazmatska C-terminalna domena regulira otvorenost kanala (pukotinskog spojišta) tj. može zatvoriti kanal ovisno o različitim utjecajima (mehaničkoj stimulaciji, pH, transmembranskoj voltaži, razini izvanstaničnog ili citoplazmatskog kalcija, promjenama redoks potencijala, hipoksiji, nitrozilaciji ili fosforilaciji koneksinskih proteina, razini inzulina itd.) (192–198). Citoplazmatska C-terminalna domena, osim što regulira otvorenost kanala, istovremeno sadrži i mnoštvo veznih mjesta za razne kinaze, potporne i signalne molekule (190).



Slika 7. Shematski prikaz građe koneksina i pukotinastih spojišta (Preuzeto i modificirano iz: Bonacquisti i Nguyen, 2018 (199))

Da bi se u cijelosti shvatila uloga koneksina potrebno ih je promatrati s više aspekata: kao samostalan transmembranski protein, u sklopu hemikanala (koneksiona), u sklopu propusnih spojišta među stanicama te u kontekstu interakcije s drugim molekulama/proteinima (183). GJIC ima brojne fiziološke funkcije uključujući regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i apoptoze te održavanje tkivne homeostaze (200). Koneksini su, dakle, proteini međustaničnih veza koji posreduju u međustaničnoj

komunikaciji i regulaciji staničnog ciklusa. Promjene na razini pukotinastih spojišta različitim mehanizmima (modifikacijom signalnih puteva i citokinskih kaskada, promjenom transkripcije, promjenama na razini proteina regulatora staničnog ciklusa itd.) dovode do promjena funkcionalnih i morfoloških osobina stanice (183).

Koneksin 43 (Cx43) ili GJA1 (engl. *gap junction alpha-1 protein*) je najzastupljeniji koneksinski protein, a noviji radovi su dokazali njegovu prisutnost u stanicama gotovo svih organskih sustava pa tako i u želucu (201–204). Stoga je upravo ovaj koneksin najviše proučavan u kontekstu onkogeneze. Iako još uvijek nedovoljno istraženo područje, prema dosadašnjim spoznajama i koneksini i GJIC imaju ulogu u nastanku karcinoma, njihovom rastu i metastaziranju (183,205). Jasnija uloga koneksina u nastanku maligne transformacije stanica i progresiji maligne bolesti ekstenzivno se istražuje.

Već dugo vremena poznato je da neki karcinogeni iz okoliša, ali i onkogeni kao što su *RAS* i *SRC*, reguliraju ekspresiju gena i fosforilaciju proteina koneksina te inhibiraju međustaničnu komunikaciju i funkciju pukotinastih spojišta (206–209). Sukladno tome, u pojedinim humanim tumorima, primjerice tumorima dojke (210), ovarija (211), prostate (212), gušterače (213, 214) i u osteosarkomu (202), dokazana je smanjena ekspresija koneksina u odnosu na okolno zdravo tkivo. Nadalje, u nekim staničnim linijama karcinoma dojke hiperekspresija Cx43 i Cx26 suprimira maligni fenotip: dovodi do parcijalne rediferencijacije stanica te blokira proces EMT i angiogeneze (215). Zanimljivo je da iako *in vivo* inhibira tumorski rast u trodimenzionalnim kulturama tumorskih stanica, to nije zabilježeno u dvodimenzionalnim kulturama (215,216). Nadalje, obnova intercelularnog transporta putem pukotinastih spojišta i Cx43 u stanicama karcinoma jajnika inhibira njihov rast (211). Ovakva opažanja sugeriraju tumor-supresorski učinak koneksina i pukotinskih spojišta (217). Također, nekoliko je istraživanja pokazalo da Cx43 pokazuje tumor-supresorski učinak neovisno o funkciji intercelularnog transporta malih molekula putem

pukotinastih spojišta tj. da se anti-tumorski efekt koneksina može odvojiti od funkcije intercelularnog transporta putem pukotinastih spojišta (202,215,218). Taj je učinak posredovan C-terminalnom domenom Cx43 (202). Međutim, neka promatranja upućuju na to da uloga konksina nije isključivo anti-tumorska. Naime, novije spoznaje ukazuju da izraženost Cx43 nije snižena tijekom čitavog procesa tumorogeneze, već se u kasnijim fazama tumorogeneze povećava potičući migraciju karcinomskih stanica i invazivnost tumora (219). Tako se, na primjer, pretpostavlja da koneksini u primarnom karcinomu dojke djeluju kao tumor supresori, dok se u uznapredovalim fazama tumora mogu ponašati dvojako, ovisno o kontekstu, kao faktor supresije ili pak faktor daljnje progresije maligne bolesti (215,220). Naime, primarni tumori dojke negativni na Cx26 i Cx43 daju metastaze u limfne čvorove pozitivne na Cx26 i Cx43. Inicijalna istraživanja karcinoma želuca također upućuju na mogućnost da je izraženost Cx43 na tumorskim stanicama potrebna za uspješno metastaziranje u limfne čvorove ili peritonealnu diseminaciju bolesti, omogućujući dijapedezu stanica karcinoma kroz jednosloj mezotelijalnih stanica (221,222). Moguće objašnjenje ovih oprečnih rezultata istraživanja leži u činjenici da je učinjena korelacija izraženosti Cx i kliničko-patoloških parametara bez uzimanja u obzir prostorno-vremenske komponente izraženosti Cx, tj. činjenice da je izraženost Cx promjenjiva tijekom samog procesa tumorogeneze (215,223,224). Za sada se vrlo malo zna o promjenama u izraženosti Cx tijekom punog spektra razvoja i progresije karcinoma. Zadnjih godina uvelike se istražuju mogućnosti manipulacije izraženosti Cx u terapijske svrhe (183). Međutim, regulacija njihove izraženosti i funkcija Cx nisu u potpunosti razjašnjeni pa selektivna manipulacija i dalje predstavlja izazov za znanstvenike. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u cijelosti shvatio mehanizam regulacije ekspresije Cx te uloga Cx u pojedinim fazama karcinogeneze različitih primarnih sjela karcinoma.



Imunohistokemijska izraženost Cx43 i GJIC do sada nije ekstenzivnije istraživana u karcinomima želuca. Zanimljivu poveznicu Hp i Cx u razvoju karcinoma želuca u preglednom radu objedinili su Li i sur. (26). Infekcija izaziva upalnu reakciju te dolazi do stvaranja interleukina od kojih IL-1 $\beta$  preko AKT signalnog puta može inhibirati Cx43. Osim toga tijekom infekcije Hp izaziva promjene u acetilaciji histona i DNA metilaciji što dovodi do aktivacije brojnih transkripcijskih faktora koji mogu inhibirati i stvaranje Cx. Wu i sur. (225) su objavili istraživanje u kojem su analizirali izraženost Cx43 i Cx32 u karcinomima želuca. Pokazali su da je stopa izraženosti Cx43 u normalnoj želučanoj sluznici 100% dok je stopa izraženosti u karcinomima želuca 39.6%. Također su pokazali da postoji statistički značajna povezanost između izraženosti Cx43 i TNM stadija tumora te histološkog tipa tumora. Istraživali su i različite stanične linije kojima su potvrdili slabu do negativnu izraženost Cx i gubitak funkcije pukotinastih spojišta u linijama slabo diferenciranog karcinoma želuca. Zaključili su da je smanjena izraženost Cx43 povezana s pojavom, progresijom i metastatskim potencijalom karcinoma želuca. Tang i sur. (222) istraživali su imunohistokemijsku (ko)izraženost Cx43 i E-kadherina u primarnim tumorima želuca i pripadajućim metastazama u limfnim čvorovima. Dokazali su da je izraženost Cx43 i E-kadherina značajno reducirana u primarnom tumoru želuca u odnosu na okolnu zdravu sluznicu (za Cx43 31.6% vs. 100%). Smanjena izraženost Cx43 i E-kadherina u primarnom tumoru želuca bila je povezana sa slabijom diferencijacijom primarnog tumora, uznapredovalim TNM stadijem bolesti i metastaziranjem u limfne čvorove. 60% karcinoma bez metastaza i 25.8% karcinoma s metastazama u limfne čvorove bili su pozitivni na Cx43. Ekspresija Cx43, za razliku od E-kadherina, nije korelirala s petogodišnjim preživljenjem bolesnika. Međutim, imunohistokemijska izraženost Cx43 i E-kadherina bila je značajno veća u metastatskim limfnim čvorovima u usporedbi s pripadajućim primarnim tumorom želuca. Štoviše, neki primarni tumori negativni na Cx43 i E-kadherin dali su metastaze u

limfne čvorove koji su imunohistokemijski bili pozitivni na njih. Zaključili su da istovremeno smanjenje izraženosti Cx43 i E-kadherina može doprinosti nastanku karcinoma želuca, ali, s druge strane, povećanje njihove izraženosti može doprinosti metastaziranju karcinoma želuca u limfne čvorove. U kasnijoj studiji Tang i sur. (221) su i dokazali da je izraženost Cx43 snižena u stanicama karcinoma želuca (26.2%), ali je povišena u peritonealnim metastazama (69%). U modelu *in vitro* su dokazali da povećana ekspresija Cx43 u stanicama karcinoma želuca potiče adheziju karcinomskih stanica za mezotelne stanice potrbušnice neovisno o GJIC (vjerojatno međudjelujući s adhezijskim molekulama kao što je E-kadherin) te da Cx43 igra važnu ulogu u peritonealnom metastaziranju.

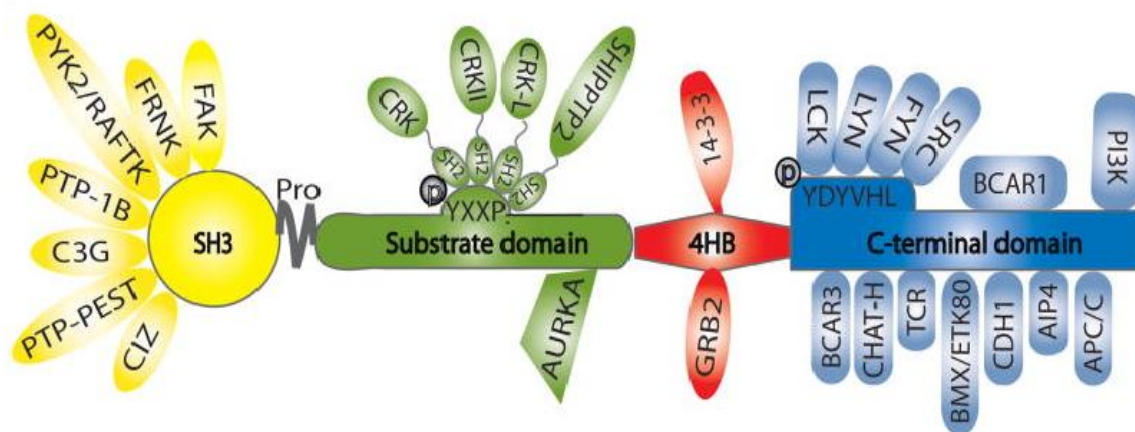
#### 1.4.2. **NEDD9**

NEDD9 (engl. *neural precursor cell expressed, developmentally downregulated protein 9*; sinonimi su HEF1, Cas-L i CASS2) je član CAS obitelji proteina (engl. *Crk-associated substrate*). Imaju očuvanu zajedničku strukturu obilježenu s četiri domene: SH3 domena na N-terminalnom kraju kojom se veže na tirozin kinazne proteine, nestrukturirana domena supstrata, domena od 4 zavojnice i evolucijski očuvana C-terminalna domena (Slika 8) (226). CAS proteini sudjeluju u brojnim biološkim funkcijama. Posebno su važne fokalna (žarišna) adhezija kojom stanice žarišno prijanjaju za izvanstanični matriks, potom sposobnost degradacije izvanstaničnog matriksa kao i komunikacija i odgovor na mehaničke promjene mikrookoliša (226,227). Mjesta fokalne adhezije imaju strukturu ulogu i predstavljaju mjesto vezanja aktinskog citoskeleta na citoplazmatskoj strani membrane s izvanstaničnim matriksom (engl. *extracellular matrix*, ECM). Oni nastaju oko integrinskih heterodimera, koji se vežu za komponente izvanstaničnog matriksa (kolagen, laminini,

proteoglikani, elastična vlakna). Dakle, molekule stanične adhezije omogućuju blisku povezanost epitelnih stanica, ali i njihovo učvršćivanje u bazalnu membranu, što svakako nije karakteristika mezenhimalnih stanica, koje karakterizira manjak spomenutih adhezijskih struktura (228). Uz to, to su mjesta prijenosa signala, koja pokreću signalne putove kao odgovor na prijanjanje regulirajući staničnu migraciju te invaziju stanica i preživljavanje kao i cilijarnu resorpciju i funkciju osteoklasta (226). Osim toga CAS proteini omogućavaju transport proteina u jezgru čime sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa te staničnoj apoptozi i proliferaciji. Kontrolna točka staničnog ciklusa CAS proteina je u mitozu, jer nedostatak CAS proteina blokira stanicu u G2 fazi. U kulturi stanica koje su u fazi mirovanja razine endogenog NEDD9 su niske, no ulaskom stanice u stanični ciklus razine NEDD9 proteina brzo rastu te su najveće u G2/M fazi ciklusa. U tom kontekstu NEDD9 se smatra glavnim koordinatorom različitih signalnih puteva koji utječu na stanični ciklus, proliferaciju, apoptozu, adheziju, migraciju i invazivnost stanica (226,227). Isto tako, tijekom apoptoze potreban je transport nekih proteina u jezgru (kao p53 i drugih transkripcijskih faktora), a CAS proteini omogućavaju apoptozu olakšavajući transport ovih esencijalnih proteina (226,229). Apoptoza je inhibirana u stanicama sa smanjenom razinom CAS proteina, dok stanična proliferacija korelira s CAS izraženošću.

Molekula NEDD9 je citoplazmatski protein, koja koliko je poznato, nema svoju enzimatsku aktivnost, ali sadrži niz interakcijskih domena s pomoću kojih ostvaruje interakciju s drugim signalnim proteinima i utječe na njihove signalne puteve (230–232). Nakon određenih poticaja NEDD9 se koncentrira u fokalnim adhezijama te u području centrosoma i mitotskog vretena tijekom G2 i M faze staničnog ciklusa. Supstratna domena NEDD9 je nestrukturirana, ali osjetljiva na istezanja N-terminalnih i C-terminalnih krajeva pri čemu se otvaraju SH2 vezna mjesta i postaju slobodna za fosforilaciju i vezivanje (Slika 8). Dakle, na taj način ostvarivanje interakcija s drugim proteinima dovodi do fosforilacije

NEDD9 što je ključna komponenta u njegovoj regulaciji, a fosforilacijski status ovisi o aktinskom citoskeletu. Neki lijekovi koji narušavaju strukturu aktinskih filamenata u stanici uzrokuju defosforilaciju NEDD9 (114).



Slika 8. Shematski prikaz strukture NEDD9 proteina te proteini s kojima stvara interakcije (Preuzeto iz: Tikhmanova i sur., 2010 (226))

Regulatorni protein NEDD9 integralna je sastavnica normalne i patološki promijenjene stanične biologije sudjelovanjem u kontroli migracije i kemotaksije, apoptoze, staničnog ciklusa i diferencijacije. NEDD9 je centralna komponenta integrin-ovisne signalne kaskade koja je osnova međusobne interakcije ECM i fokalnih adhezijskih proteina unutar stanice i koja aktivira FAK i Src kinaze koje potiču staničnu migraciju (233). Uz to, pojačana izraženost NEDD9 negativno djeluje na E-kadherin (koji čini adherentna međustanična spojišta, važan je za međustaničnu adheziju i prepoznavanje, određuje polarnost stanice, a čini i komponentu Wnt signalnog puta) i tako pozitivno utječe na EMT tumorskih stanica, njihovu migraciju i invazivnost (226,234–236). Miševi kojima je utišan NEDD9 gen („knock out“) se normalno razvijaju u embrionalno doba i postaju fertilni, ali imaju defekte imunološkog sustava i nisku populaciju B-stanica slezene. Kada se tako utiša

NEDD9 u limfocitima oni imaju loš kemotaktički odgovor i oslabljenu adheziju stanica (226).

Posljednjih godina istraživanja su pokazala da NEDD9 ima važnu ulogu u tumorogenezi, posebno u nastanku metastaza. Brojna istraživanja su pokazala različite mehanizme djelovanja NEDD9, ali točni molekularni mehanizmi nisu do kraja razjašnjeni (226,237-239). CAS/NEDD9 signalni putevi se aktiviraju kao odgovor na brojne signalne molekule važne tijekom tumorogeneze. Tako je npr. u mnogim slučajevima NEDD9 fosforiliran kao posljedica stimulacije raznim čimbenicima rasta (epidermalni čimbenik rasta, vaskularni endotelni čimbenik rasta, transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , inzulinu sličan čimbenik rasta, čimbenik rasta hepatocita i drugi). Obzirom da je neoštećen (intaktan) citoskelet potreban za CAS fosforilaciju potaknutu čimbenicima rasta, tretiranjem stanica citohalazinom D (inhibitor citoskeleta) uočljivo je sniženje razine fosforilacije NEDD9 (237). Osim toga NEDD9 sudjeluje i u stvaranju novih krvnih žila prilikom rasta tumora. Citoskeletna reorganizacija potrebna za polarizaciju i migraciju endotelnih stanica tijekom stvaranja nove krvne žile zahtijevaju aktivnost CAS ili NEDD9. Daljnji proces degradacije izvanstaničnog matriksa povećava razinu citokina i čimbenika rasta. U tom slučaju NEDD9 kompleks koji nastaje kao odgovor na lokalno nakupljanje VEGF (vaskularni endotelni čimbenik rasta) potiče Src/FAK ovisnu razgradnju ECM stvaranjem invadopodija koji sadrže matriks-metaloproteinaze. Dodatni efekt takvom odgovoru daje i mehanički signal koji ECM šalje tumorskoj stanici pokušavajući spriječiti njegovo širenje. Moramo zantiti da je tumorsko tkivo puno kruće i tvrđe od normalne stanice koja se ponaša fluidno. Konačno, EMT je ključni korak u metastaziranju tumora. Reorganizacijom citoskeleta epitelna stanica gubi međustaničnu povezanost kao i povezanost stanice s izvanstaničnim matriksom i bazalnom membranom. Takva tranzicija omogućava tumorskim stanicama preživljenje u cirkulaciji te migraciju na udaljena sjela metastaziranja.

Iako je meta-analiza Gu i sur. (240) iz 2019. godine pokazala da prekomjerna izraženost NEDD9 u različitim solidnim tumorima korelira s lošijim preživljenjem (i ukupnim i tzv. „disease-free“), rezultati u literaturi nisu konzistentni. Čak i u njihovom istraživanju izraženost NEDD9 nije imala podjednak utjecaj na preživljenje za sva sijela promatranih solidnih tumora. Do sada je pojačana izraženost NEDD9 povezivana s agresivnošću različitih malignih tumora: karcinoma jajnika (241), dojke (233,242,243), cerviksa uterusa (244), prostate (245), pluća (246–248), gušterače (214,249), kolona (235,250), melanoma (251) i glioblastoma (252) te T-stanične leukemije odraslih (253). Međutim, postoje i studije s oprečnim rezultatima. Tako postoje izvještaji da je povećana izraženost NEDD9 u negativnoj korelaciji s metastaziranjem karcinoma dojke u kosti (254). Isto tako Ostojić i sur. (255) povezuju pojačanu izraženost NEDD9 s boljim preživljenjem kod karcinoma pluća, Ledinski i sur. (256) kod karcinoma pločastih stanica glave i vrata. Razlog oprečnim rezultatima može biti različit utjecaj pojačane izraženosti NEDD9 u različitim tipovima stanica ili različiti utjecaj u različitim fazama razvoja tumora (242).

Recentno je objavljeno nekoliko studija koje povezuju agresivniji klinički tijek karcinoma želuca s pojačanom ekspresijom NEDD9. Pokazala su da je izraženost NEDD9 veća u karcinomu želuca nego u normalnoj želučanoj sluznici te da je povećana izraženost NEDD9 povezana s invazivnošću tumora, TNM stadijem, prisutnošću metastaza u limfne čvorove, prisutnošću udaljenih metastaza i lošijom prognozom bolesti (257–260). U modelu *in vitro* dokazan je utjecaj NEDD9 na EMT, dok se supresijom izraženosti NEDD9 uz pomoć siRNA suprimira EMT, snažno se inhibiraju maligna svojstva (proliferacija, migracija, invazivnost) te se potiče apoptoza stanica karcinoma želuca (261).

## **2. HIPOTEZA**

U metastazirajućim adenokarcinomima želuca smanjena je imunohistokemijska izraženost koneksina 43 i povećana imunohistokemijska izraženost NEDD9 u odnosu na nemetastazirajuće adenokarcinome želuca.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

#### **Opći cilj**

Odrediti i usporediti imunohistokemijsku izraženost koneksina 43 i NEDD9 u primarnom adenokarcinomu želuca s i bez metastaza u limfne čvorove te usporediti njihovu izraženost s različitim kliničkim i patohistološkim parametrima.

#### **Specifični ciljevi**

1. Odrediti izraženost koneksina 43 u primarnom adenokarcinomu želuca s i bez metastaza u limfne čvorove.
2. Odrediti izraženost NEDD9 u primarnom adenokarcinomu želuca s i bez metastaza u limfne čvorove.
3. Međusobno usporediti izraženost koneksina 43 i NEDD9 u primarnim adenokarcinomima želuca s i bez metastaza u limfne čvorove.
4. Usporediti izraženost koneksina 43 i NEDD9 s karakteristikama tumora: veličinom, dubinom invazije (pT stadij) tumora, vaskularnom invazijom, perineuralnom invazijom, statusom regionalnih limfnih čvorova (pN stadij), histološkim tipom tumora (WHO klasifikacija iz 2019. godine).
5. Usporediti izraženost koneksina 43 i NEDD9 s kliničkim parametrima: dob, spol, preživljenje.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Bolesnici

Provedena je presječna studija s retrospektivno uzetim podacima u razdoblju od 01.01.2005. do 31.12.2015. godine nakon resekcije želuca i regionalnih limfnih čvorova (D1 limfadenektomija s minimalno 10 izoliranih i patohistološki pregledanih limfnih čvorova) bolesnika s histološki potvrđenom dijagnozom adenokarcinoma želuca u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Istraživanje je obuhvatilo 108 uzoraka karcinoma želuca, od čega su 53 uzorka karcinoma želuca ograničenog na stijenku želuca bez prisutnih metastatskih limfnih čvorova te 55 uzoraka karcinoma želuca koji su razvili metastaze u limfne čvorove. Podaci o bolesnicima i histološkim karakteristikama karcinoma želuca prikupljeni su iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Klinike za unutarnje bolesti i Klinike za kirurgiju KBC Sestre milosrdnice te iz arhive Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ). Iz patohistološkog nalaza bolesnika preuzeti su podaci o dobi i spolu bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze te histološke karakteristike karcinoma želuca: veličina tumora, histološki tip tumora, patološki T i N stadij bolesti, prisutnost perineuralne i vaskularne invazije, dok smo iz povijesti bolesti bolesnika prikupili podatke o kliničkom stadiju bolesti. Podatak o vremenu do konačnog smrtnog ishoda bolesnika smo preuzeli iz baze podataka HZJZ-a. Datum operacije uzet je kao nulto vrijeme, a zadnja provjera konačnog ishoda bolesti obavljena je 30. studenog 2019. godine. Za četiri bolesnika (jednog bolesnika bez metastaza u limfne čvorove i tri bolesnika s metastazama u limfne čvorove) nismo uspjeli prikupiti podatak o ishodu bolesti.

U istraživanju nismo koristiti osobne podatke koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost bolesnika.

## 4.2. Metode

Materijal dobiven operativnim zahvatom je obrađen standardnom histološkom obradom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10 % puferiranom formalinu, dehidriranje u uzlaznom nizu alkohola, uklapanje u parafinske blokove te arhiviranje parafinskih kocki. Područje analize određeno je pregledavanjem svih uzoraka tumora na malom povećanju ( $\times 40$ ) na HE prerezima. Odabrani reprezentativni uzorci tumora iz više donorskih blokova određenih za tkivni mikropostroj (eng. *tissue microarray*) iglom su prebačeni u novi blok stvarajući više uzoraka u jednom parafinskom bloku (mikropostroj). Iz tako dobivenih parafinskih blokova s multiplim uzorcima tumora rezani su rezovi tkiva debljine 5  $\mu\text{m}$ , deparafinirani i rehidrirani kroz ksilol i silazni niz alkohola do vode. Materijal je nakon imunohistokemijskog bojenja u cijelosti analiziran, a izraženost protutijela određena je na minimalno 1000 stanica pod velikim vidnim povećanjem mikroskopa ( $\times 400$ ), na mjestu najjače reakcije (tzv. "hot spot"). Imunohistokemijska reakcija Cx43 i NEDD9 određena je u epitelnoj komponenti (u daljnjem tekstu epitel tumora) i stromalnoj komponenti (u daljnjem tekstu tumorska stroma) primarnih karcinoma želuca.

Za imunohistokemijsku analizu koristili smo primarno zečje poliklonalno protutijelo na NEDD9 (razrjeđenje 1:400, Abcam, Cambridge, UK, pozitivna kontrola tkivo bubrega) i mišje monoklonalno protutijelo na Cx43 (razrjeđenje 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, pozitivna kontrola: tkivo srčanog mišića). Imunohistokemijska analiza za navedena protutijela učinjena je indirektnom ABC tehnikom, LSAB metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate TM automatiziranom stroju za

imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaze protokola prema preporuci proizvođača.

Imunohistokemijska reakcija Cx43 i NEDD9 određena je semikvantitativno uzimajući u obzir intenzitet reakcije kako slijedi:

- intenzitet reakcije označen kao „0“ predstavlja odsutnost reakcije;
- intenzitet reakcije označen kao „1“ slabo izraženu reakciju;
- intenzitet reakcije označen kao „2“ umjereno izraženu reakciju;
- intenzitet reakcije označen kao „3“ jako izraženu reakciju.

Postotak imunoreaktivnih stanica određen je kako slijedi:

- „0“, nema reaktivnih stanica;
- „1“, do 10 % pozitivnih stanica;
- „2“, > 10-50 % pozitivnih stanica;
- „3“, > 50 % pozitivnih stanica.

Imunohistokemijski indeks bojenja (IIB) dobiven je kao umnožak intenziteta bojenja (IB) i postotka reaktivnih stanica (PRS):  $IIB=IR \times PRS$ , a iznosi od 0 do 9. IIB 0 predstavlja odsustvo reakcije, IIB 1-4 predstavlja slabu, a IIB 5-9 predstavlja jaku izraženost.

### **4.3. Statistička analiza**

Analizom snage testa za  $\chi^2$  test s pretpostavljenim učinkom veličine od 0,5, razinom značajnosti od 0,05 te jednim stupnjem slobode, za snagu testa od 95% bilo je potrebno najmanje 52 bolesnika po skupini. Analiza je provedena programom G\*Power for Windows, verzija 3.1.3 (<http://www.psych.uniduesseldorf.de/aap/projects/gpower/>).

Inicijalno je učinjena opisna statistika, a podaci su prikazani tablično i grafički. Distribucija podataka analizirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Pošto većina

varijabli nije pratila normalnu distribuciju, kontinuirane varijable izražene su medijanom i interkvartilnim rasponom (25% - 75%), a uspoređene su Mann-Whitney, odnosno Kruskal-Wallis testom. Kategoričke varijable su uspoređene Chi-kvadrat testom uz Yatesovu korekciju te Fisher exact testom. Krivulje preživljenja su kreirane po Kaplan-Meieru, a razlike između pojedinih skupina su dodatno uspoređene Log-Rank testom.

Povezanosti pojedinih parametara utvrđena je Spearmanovom analizom korelacija. Snaga korelacije određena je koeficijentom korelacije Rho, pri čemu je korelacija umjerene snage u rasponu koeficijenta od 0,20 do 0,40.

Analiza povezanosti pojedinih parametara s preživljenjem učinjena je Coxovom regresijom. Višestruka regresija je korištena u svim oblicima regresijske analize kako bi se utvrdilo postoji li neovisna povezanost s ishodom, odnosno kako bi se učinila korekcija za ometajuće čimbenike. Prilikom izvođenja višestruke regresije (istovremena analiza nekoliko parametara) korišten je model postepene retrogradne uvjetovane regresije (eng. *backward stepwise conditional regression*).

Statistička analiza napravljena je uz programsku podršku SPSS verzija 20.0. Za granicu statističke značajnosti određena je vrijednost  $p = 0,05$ .

## 5. REZULTATI

Istraživanje imunohistokemijske izraženosti proteina koneksina 43 (Cx 43) i NEDD9 provedeno je na 108 uzoraka primarnih karcinoma želuca. U Tablici 8 prikazane su njihove osnovne karakteristike.

Tablica 8. Značajke bolesnika i patohistološke karakteristike karcinoma želuca uključenih u istraživanje

		<b>Broj slučajeva (%)</b>	
Dob bolesnika (godine)	Medijan 68 (31-90)		
Spol bolesnika	Muški	54	50%
	Ženski	54	50%
Veličina tumora (cm)	Medijan 4,1 (1-16)		
Histološki tip	Intestinalni	38	35,2%
	Difuzni	17	15,7%
	Miješani	49	45,4%
	Ostalo	4	3,7%
pT stadij	1	23	21,3%
	2	18	16,7%
	3	57	52,8%
	4	10	9,2%
pN stadij	0	53	49,1%
	1	16	14,8%
	2	22	20,4%
	3	17	15,7%
Vaskularna invazija	Ne	74	68,5%
	Da	34	31,5%
Perineuralna invazija	Ne	68	63,0%
	Da	40	37,0%
Ishod praćenja (n=104)	Živi	30	28,8%
	Umrli	74	71,2%

Prosječna starost bolesnika uključenih u istraživanje bila je 66 godina s medijanom od 68 godina (u rasponu 31-90). Jednako su zastupljeni bolesnici oba spola. Prosječna veličina tumora bila je 5,2 cm s medijanom 4,1 cm (u rasponu 1-16 cm). Bolesnici su u 38% slučajeva imali karcinome ograničene na sluznicu i dosluznicu želuca (T1 i T2) te negativne limfne čvorove u 49,1% slučajeva.

Ukupno preživljenje bolesnika u našem istraživanju je 28,8%. Od 74 umrla bolesnika njih 49 (66,2%) je umrlo unutar 24 mjeseca od operacije.

U Tablici 9 prikazane su razlike u raspodjeli osnovnih parametara prema metastatskom statusu limfnih čvorova. Značajne razlike zabilježene su kod svih istraživanih parametara osim spola ( $P=0,178$ ). Vidimo da su bolesnici čiji karcinomi nisu razvili metastaze u limfne čvorove (N0) stariji od bolesnika s metastazama (medijan dobi 71 vs. 64 godine;  $P=0,009$ ), i imaju prosječno manje karcinome (medijan 3 cm vs. 5,5 cm;  $P=0,001$ ). Karcinomi bez metastaza pokazuju statistički značajno drugačiju raspodjelu histoloških podtipova u odnosu na karcinome s metastazama ( $P=0,013$ ). Tako su karcinomi bez metastaza najčešće intestinalnog tipa (47,2%) dok su karcinomi s metastazama najčešće miješanog tipa u 60% slučajeva. Isto tako, postoji statistički značajna razlika u dubini prodora u stijenku želuca (patološki T stadij, pT), pa karcinomi bez metastaza u 67,9% slučajeva imaju dubinu prodora T1 i T2 dok karcinomi s metastazama u 90,9% slučajeva prodiru dublje te su stadija T3 i T4. Karcinomi s metastazama imaju značajno češće prisutnu vaskularnu (45,5%) i perineuralnu (58,2%) invaziju od karcinoma bez metastaza.

Tablica 9. Razlike u ispitivanim parametrima karcinoma želuca između skupina bolesnika bez i s metastazama u limfne čvorove

	Status limfnih čvorova		P
	Karcinomi bez metastaza (A)	Karcinomi s metastazama (B)	
Dob (god)/medijan (raspon)	71 (31-86)	64 (39-90)	<b>0,009</b>
Veličina tumora (cm)/medijan (raspon)	3.0 (1.0-10.0)	5.5 (1.3-16.0)	<b>0,001</b>
Median preživljenja (mjeseci) (raspon)	96.0 (59.2-132.9)	13.0 (10.6-15.4)	<b>&lt;0,001</b>
Vaskularna invazija prisutna	9 (17%)	25 (45.5%)	<b>0,001</b>
Perineuralna invazija prisutna	8 (15.1%)	32 (58.2%)	<b>&lt;0,001</b>
Muški spol	23 (43.4%)	31 (56.4%)	0,178
Histološki tip			<b>0,013</b>
Intestinalni	25 (47.2%) <sup>B</sup>	13 (23.6%)	
Difuzni	9 (17%)	8 (14.5%)	
Miješani	16 (30.2%)	33 (60%) <sup>A</sup>	
Ostalo	3 (5.7%)	1 (1.8%)	
pT status			<b>&lt;0,001</b>
1	21 (39.6%) <sup>B</sup>	2 (3.6%)	
2	15 (28.3%)	3 (5.5%)	
3	14 (26.4%)	43 (78.2%) <sup>A</sup>	
4	3 (5.7%)	7 (12.7%)	

A - P<0,05 naspram istog parametra u koloni A

B - P<0,05 naspram istog parametra u koloni B

Iz Tablice 10 je vidljivo da lošije ukupno preživljenje imaju bolesnici s dubljim prodorom karcinoma (pT3 i pT4), više pozitivnih limfnih čvorova (pN3) te višim kliničkim stadijem bolesti i miješanim histološkim tipom karcinoma. Bolesnici kliničkog stadija I imaju smrtni ishod u 38,9%, s medijanom preživljenja od 131 mjesec dok stadij 2, 3 i 4 smrtni ishod imaju u 82,1%, 90,9% i 100%. Isto tako niti jedan bolesnik s dubinom prodora tumora T1 (maksimalno do submukoze) nije umro u našem istraživanju.

Bolesnici bez metastaza u limfne čvorove (pN0) imaju medijan preživljenja od 96 mjeseci, a do kraja istraživanja u toj skupini je umrlo 50% bolesnika. Bolesnici s tumorom proširenim u limfne čvorove imaju kraći medijan preživljenja (ukupni medijan od 13 mjeseci) ovisno o broju pozitivnih čvorova (N), a u toj skupini smrtni ishod je zabilježen u 90,7% bolesnika. Zahvaćenost limfnih čvorova bila je podjednaka u bolesnika oba spola.



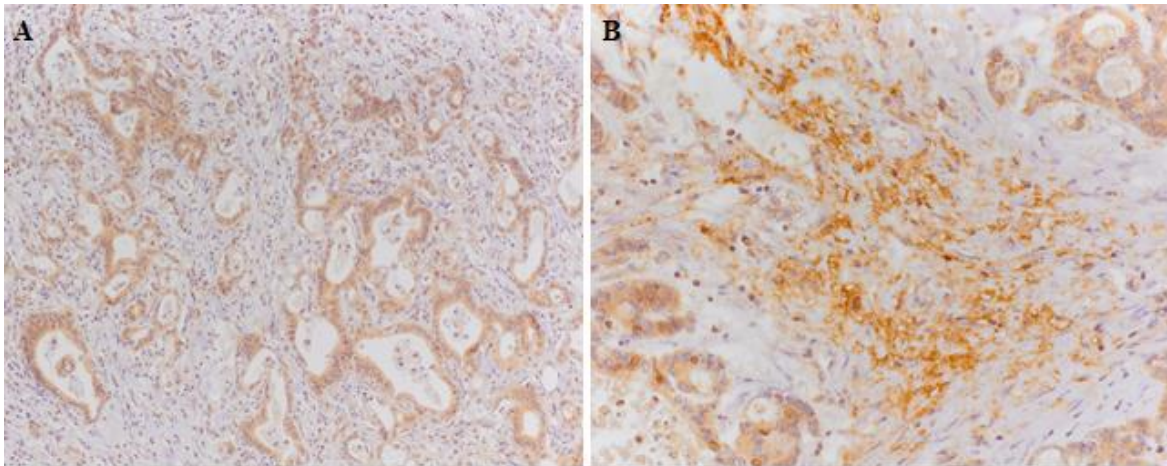
Tablica 10. Ukupno preživljenje bolesnika u mjesecima (medijan) ovisno o pojedinim kategoričkim varijablama

	Medijan (mjeseci)	SE	95% interval pouzdanosti		P
<b>pT status</b>					<b>&lt;0,001</b>
T1a / 1b	Nije dosegnut	-	-	-	
T2	96	30,5	36,2	155,8	
T3	16	3,2	9,8	22,2	
T4a / 4b	12	4,7	2,7	21,3	
<b>pN status</b>					<b>&lt;0,001</b>
N0	96	18,7	59,2	132,8	
N1	19	4,0	11,2	26,8	
N2	13	1,9	9,2	16,8	
N3	8	1,0	5,4	10,6	
<b>Tip tumora</b>					0,124
Intestinalni	42	20,2	2,3	81,7	
Difuzni	50	34,7	0,0	118	
Miješani	16	3,5	9,1	22,8	
Ostalo	Nije dosegnut	-	-	-	
<b>Klinički stadij bolesti</b>					<b>&lt;0,001</b>
1	131	-	-	-	
2	33	13,2	7,0	58,9	
3	13	2,3	8,5	17,5	
4	9	2,6	3,8	14,1	
<b>Spol</b>					0,504
Ženski	41	9,2	23,0	59,0	
Muški	20	7,3	5,7	34,2	

SE, standardna pogreška

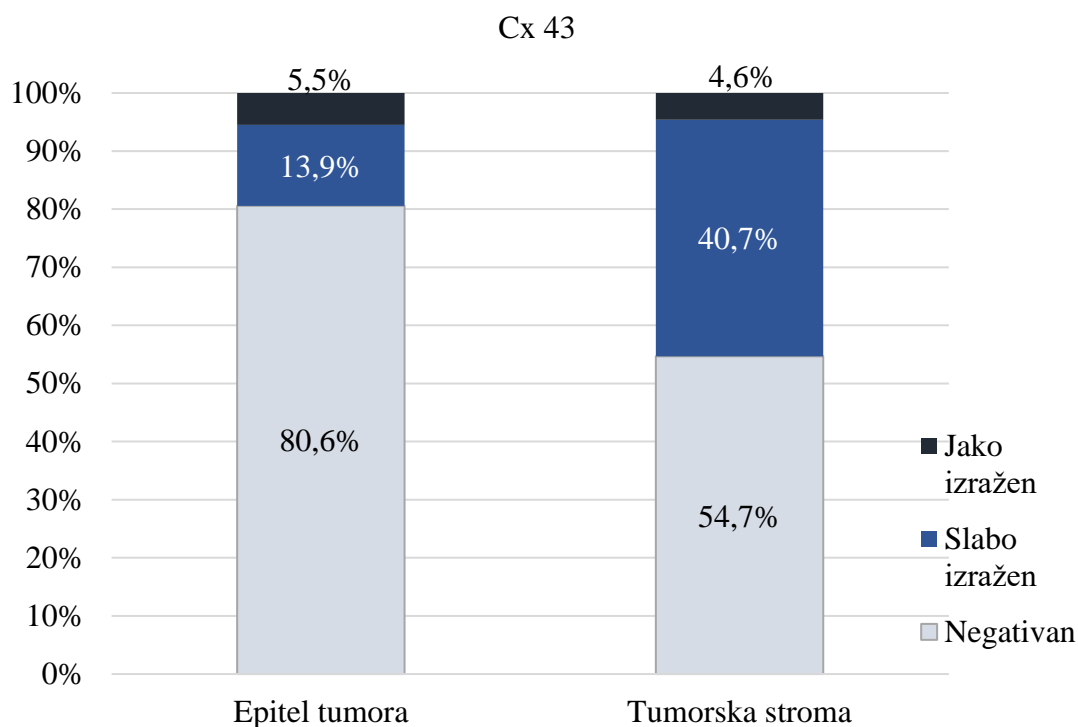
## 5.1. Koneksin 43

Imunohistokemijska izraženost koneksina 43 (Cx43) analizirana je u epitelnoj i stromalnoj komponenti primarnih karcinoma želuca (u daljnjem tekstu epitel tumora i tumorska stroma) te pokazuje citoplazmatski pozitivitet (Slika 9).



Slika 9. Imunohistokemijska izraženost Cx43 u epitelu i tumorskoj stromi karcinoma želuca. A, umjerena citoplazmatska izraženost Cx43 u više od 50% epitela tumora te slaba izraženost u tumorskoj stromi u manje od 10% stanica (x200); B, slaba citoplazmatska izraženost Cx43 u više od 10% stanica epitela tumora te jaka izraženost u više od 50% stanica u tumorskoj stromi karcinoma želuca (x400)

Iz Slike 10 je vidljivo da je, sveukupno gledano, Cx43 slabo izražen u epitelu tumora, jer 80,6% stanica potpuno negativno dok 19,4% stanica pokazuje pozitivitet, ali svega 5,5% jakog intenziteta. Istovremeno 45,3% tumorske strome izražava Cx43, no većinom slabog intenziteta. Cx43 je statistički značajno izraženiji u tumorskoj stromi nego u epitelu tumora ( $\chi^2=15,41$ ;  $P<0,001$ ).



Slika 10. Stupanj imunohistokemijske izraženosti Cx43 u epitelu tumora i tumorskoj stromi u ukupnom uzorku od 108 karcinoma želuca ( $P < 0,001$ )

Iz Tablice 11 vidimo da postoji statistički značajna razlika u izraženosti Cx43 u epitelu tumora ovisno o prisutnim metastazama u limfne čvorove. Tako je jača izraženost Cx43 u epitelu tumora s metastazama, jer 23,6% tih karcinoma izražava Cx43, od čega 10,9% karcinoma pokazuje jaku izraženost dok karcinomi bez metastaza ne pokazuju jaku izraženost Cx43 ( $P = 0,047$ ). Razlika izraženosti Cx43 u tumorskoj stromi nije statistički značajna ( $P = 0,712$ ).

Tablica 11. Raspodjela imunohistokemijskog intenziteta obojenja Cx43 u epitelu tumora i tumorskoj stromi prema statusu limfnih čvorova kod karcinoma želuca

	Status limfnih čvorova		P
	Bez metastaza	S metastazama	
<b>Cx43 u epitelu tumora</b>			<b>0,047</b>
Negativan	45 (84.9%)	42 (76.4%)	
Slabo izražen	8 (15.1%)	7 (12.7%)	
Jako izražen	0 (0%)	6 (10.9%)	
<b>Cx43 u tumorskoj stromi</b>			0,712
Negativan	31 (58.5%)	28 (50.9%)	
Slabo izražen	20 (37.7%)	24 (43.6%)	
Jako izražen	2 (3.8%)	3 (5.5%)	

Našim istraživanjem nismo utvrdili statistički značajnu razliku izraženosti Cx43 u epitelu tumora prema kliničkom stadiju bolesti, iako karcinomi kliničkog stadija 3 i 4 češće pokazuju izraženost Cx43 jakog intenziteta ( $P=0,170$ ) (Tablica 12).

Izraženost Cx43 u tumorskoj stromi statistički značajno korelira s kliničkim stadijem bolesti te je tako negativan u 71,1% stanica tumorske strome u kliničkom stadiju 1 u odnosu prema 44,1% u stadiju 3 ( $P=0,026$ ) (Tablica 12).

Tablica 12. Izraženosti Cx43 u epitelu tumora i tumorskoj stromi u odnosu na klinički stadij bolesti

		Klinički stadij bolesti n (%)				P
		1 (A)	2 (B)	3 (C)	4 (D)	
<b>Cx43 u epitelu tumora</b>	Negativan	31 (81,6)	25 (86,2)	26 (76,5)	5 (71,4)	0,170
	Slabo izražen	7 (18,4)	2 (6,9)	5 (14,7)	1 (14,3)	
	Jako izražen	0 (0,0)	2 (6,9)	3 (8,8)	1 (14,3)	
<b>Cx 43 u tumorskoj stromi</b>	Negativan	27 (71,1) <sup>B,C</sup>	13 (44,8)	15 (44,1)	4 (57,1)	<b>0,026</b>
	Slabo izražen	10 (26,3)	16 (55,2) <sup>A</sup>	16 (47,1)	2 (28,6)	
	Jako izražen	1 (2,6)	0 (0,0)	3 (8,8)	1 (14,3)	

A – P<0,05 naspram istog parametra u koloni A

B - P<0,05 naspram istog parametra u koloni B

C - P<0,05 naspram istog parametra u koloni C

Analizom korelacija prikazanih u Tablici 13 nismo uvdili statistički značajnu korelaciju izraženosti Cx43 u epitelu tumora niti s jednim istraživanim patohistološkim parametrom karcinoma želuca.

Utvdili smo značajnu pozitivnu korelaciju izraženosti Cx43 u tumorskoj stromi s veličinom tumora i dubinom prodora kroz stijenku želuca (T stadij) (Tablica 13). Tako je kod tumorske strome pozitivne na Cx43 medijan veličine karcinoma bio 6 cm što je statistički značajno u odnosu na 3,5 cm kod tumorske strome negativne na Cx43 (P=0,002).

Isto tako stroma tumora s dubinom prodora T1 pokazuje pozitivitet na Cx43 u 26% slučajeva za razliku od 57,9% slučajeva tumorske strome kod karcinoma T3 i 40% slučajeva jako izraženog Cx43 u tumorskoj stromi karcinoma dubine prodora T4 (P=0,03).

Tablica 13. Povezanost izraženosti Cx43 u epitelu tumora i tumorskoj stromi s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma želuca u ukupnom istraživanom uzorku (N=108).

Analiza Spearmanove korelacije

		<b>Cx43 epitelu tumora</b>	<b>Cx43 u tumorskoj stromi</b>
Dob	Rho	-0,056	0,099
	P	0,568	0,309
Veličina tumora	Rho	-0,071	0,296
	P	0,464	<b>0,002</b>
Histološki tip	Rho	-0,087	-0,050
	P	0,368	0,605
Vaskularna invazija	Rho	0,019	0,023
	P	0,840	0,813
Perineuralna invazija	Rho	0,010	0,109
	P	0,912	0,258
pT stadij (T1-T4)	Rho	-0,035	0,209
	P	0,714	<b>0,030</b>
pN stadij (N0-N3)	Rho	0,049	0,077
	P	0,610	0,429
Status limfnih čvorova (Poz/neg)	Rho	0,107	0,076
	P	0,266	0,433
Spol (Ž-0, M-1)	Rho	-0,070	-0,167
	P	0,471	0,083

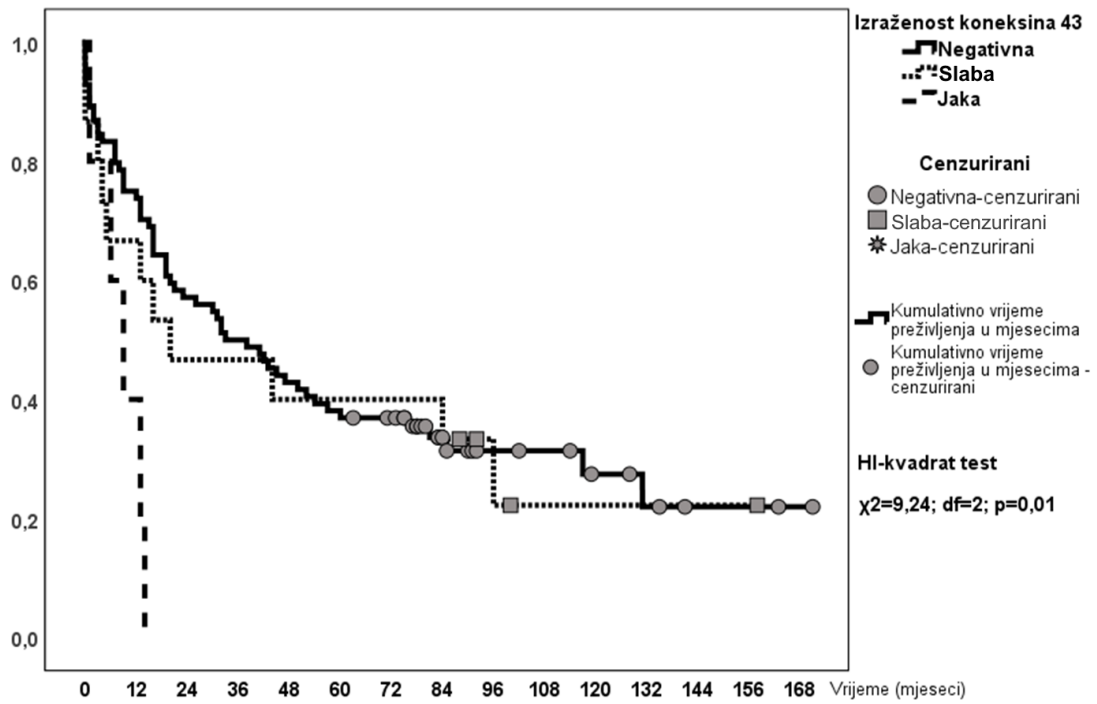
Univarijatnom analizom nađena je statistički značajna razlika u preživljenju ovisno o izraženosti Cx43 u epitelu tumora, no ne i njegovoj izraženosti u tumorskoj stromi. Bolesnici s negativnim Cx43 u epitelu tumora imali su značajno bolje preživljenje naspram bolesnika u kojih je Cx43 bio jako izražen (medijan 33 mjeseca, naspram 9 mjeseci; P=0,01) (Tablica 14, Slika 11). S druge strane, nije nađeno statistički značajne povezanosti između preživljenja i izraženosti Cx43 u tumorskoj stromi (Tablica 14). Ukoliko razlike u preživljenju prikazujemo dvogodišnjim preživljenjem, vidimo da je značajno više bolesnika koji su preživjeli nakon dvije godine imalo negativnu izraženost na Cx43 (P=0,021) (Tablica 15).

Rezultati dobiveni univarijatnom analizom bit će potvrđeni nakon multivarijatne analize, koja će biti prikazana nakon prikaza analize preživljenja za izraženost NEDD9.

Tablica 14. Ukupno preživljenje bolesnika u mjesecima prema izraženosti Cx43 u stanicama karcinoma i tumorskoj stromi

	Medijan (mjeseci)	SE	95% interval pouzdanosti		P
<b>Cx43 u epitelu tumora</b>					<b>0.010</b>
Negativan	33	8,7	15,9	50,0	
Slabo izražen	20	20,0	0,0	59,1	
Jako izražen	9	3.3	2.6	15,4	
<b>Cx43 u tumorskoj stromi</b>					0.620
Negativan	42	9,1	24,0	59,9	
Slabo izražen	20	8,1	4,1	35,9	
Jako izražen	16	12,0	0,0	39,6	

SE – standardna pogreška



Slika 11. Krivulje ukupnog preživljenja bolesnika prema izraženosti Cx43 u epitelu tumora



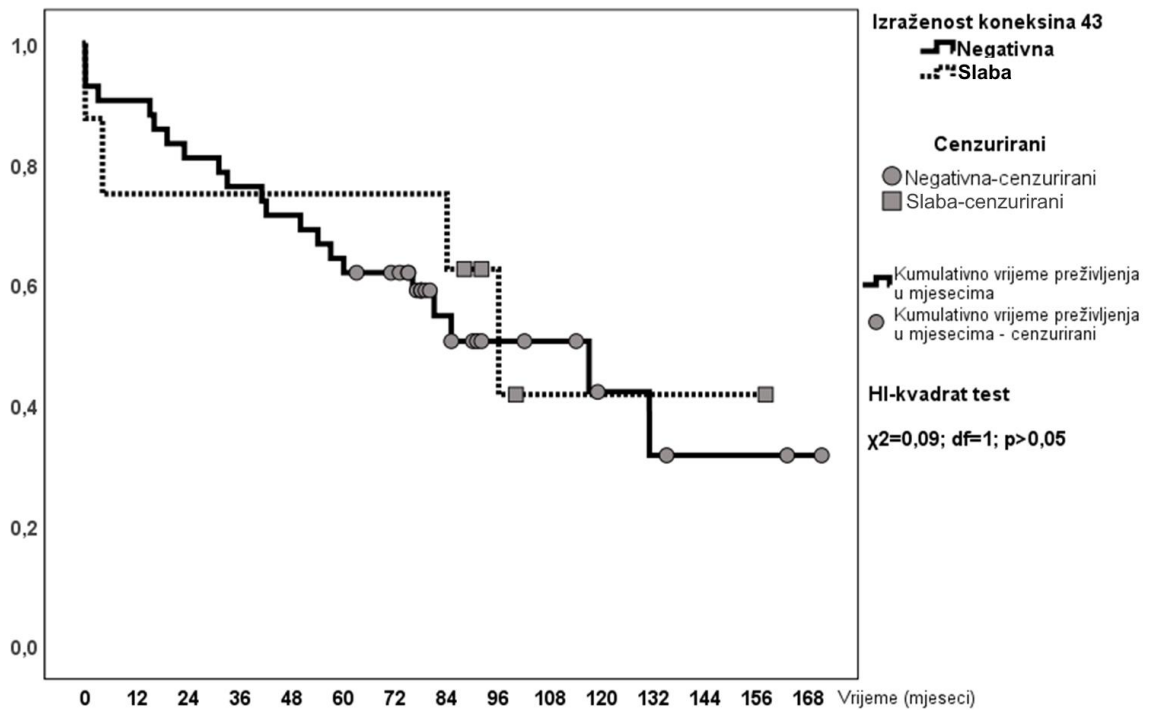
Tablica 15. Usporedba preživljenja bolesnika nakon dvije godine obzirom na izraženost Cx43 u epitelu tumora svih bolesnika te zasebno po skupinama bolesnika bez i s metastazama u limfne čvorove

		Preživljenje nakon 2 godine		P
		Živi (A)	Umrli (B)	
<b>Svi bolesnici</b>				
Cx 43 u epitelu tumora	Negativan	48 (87.3%) <sup>B</sup>	36 (73.5%)	<b>0,021</b>
	Slabo izražen	7 (12.7%)	8 (16.3%)	
	Jako izražen	0 (0%)	5 (10.2%) <sup>A</sup>	
<b>Bez metastaza u limfne čvorove</b>				
Cx 43 u epitelu tumora	Negativan	34 (85%)	8 (80%)	0,653
	Slabo izražen	6 (15%)	2 (20%)	
	Jako izražen	0 (0%)	0 (0%)	
<b>S metastazama u limfne čvorove</b>				
Cx 43 u epitelu tumora	Negativan	14 (93.3%)	28 (71.8%)	0,077
	Slabo izražen	1 (6.7%)	6 (15.4%)	
	Jako izražen	0 (0%)	5 (12.8%)	

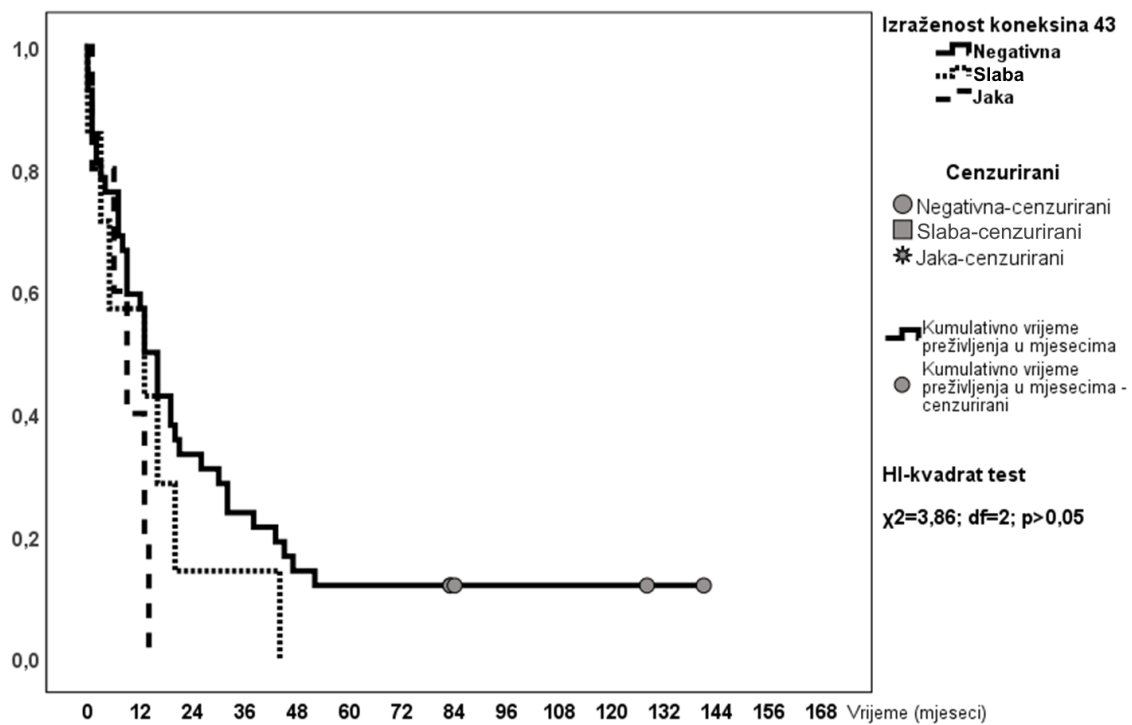
A -  $P < 0.05$  naspram istog parametra u koloni A

B -  $P < 0.05$  naspram istog parametra u koloni B

Učinjena je i dodatna podanaliza preživljenja zasebno u bolesnika s i bez metastaza u limfne čvorove, no tada zbog smanjenja analizirane populacije niti u jednoj od analiziranih skupina nije nađeno značajne povezanosti između Cx43 i preživljenja (Slika 12, 13).



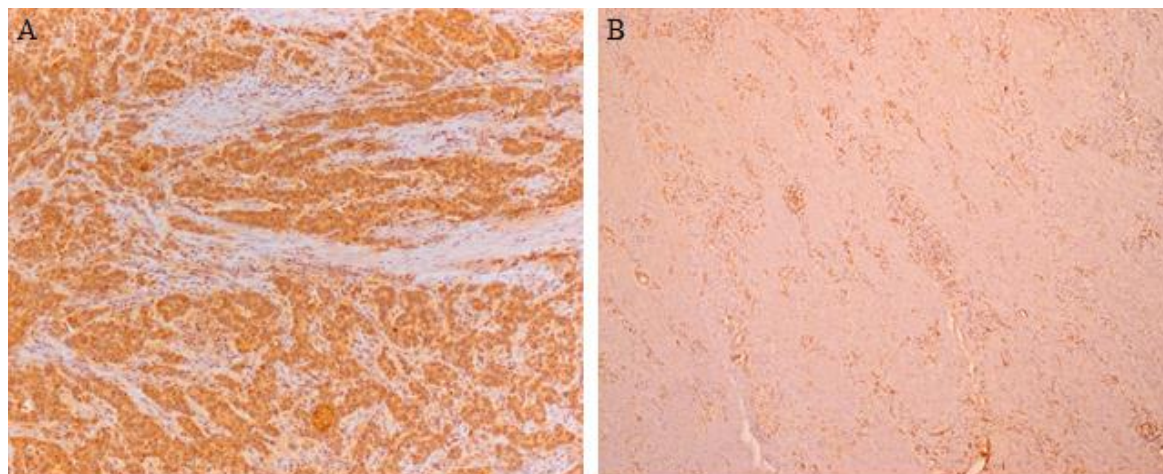
Slika 12. Krivulje ukupnog preživljenja prema izraženosti Cx43 u epitelu tumora bolesnika bez metastaza u limfne čvorove



Slika 13. Krivulje ukupnog preživljenja prema izraženosti Cx43 u epitelu tumora bolesnika s metastazama u limfne čvorove

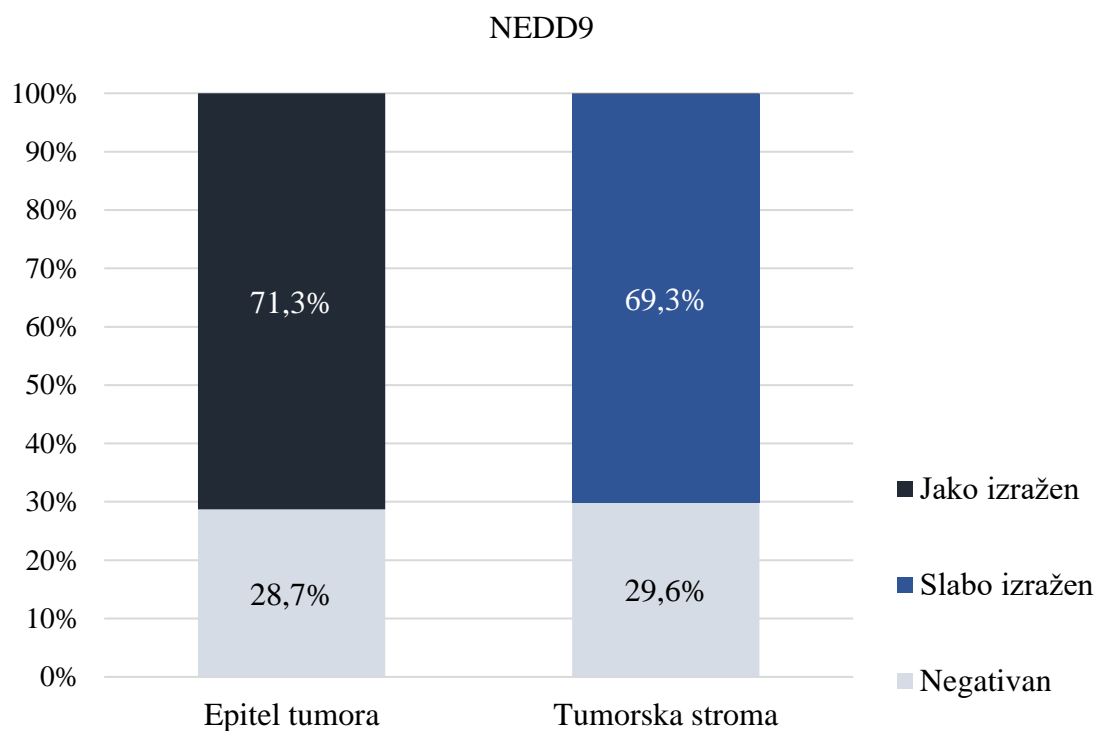
## 5.2. Protein NEDD9

Imunohistokemijska izraženost NEDD9 također je analizirana u epitelu tumora i tumorskoj stromi te pokazuje citoplazmatski pozitivitet (Slika 14).



Slika 14. Imunohistokemijska izraženost NEDD9 u epitelu tumora i tumorskoj stromi karcinoma želuca. A, jaka citoplazmatska izraženost NEDD9 u više od 50% epitela tumora bez izraženosti u tumorskoj stromi (x200); B, umjerena epitelna citoplazmatska izraženost NEDD9 u do 10% stanica, uz slabu izraženost u više od 50% tumorskoj stromi (x100)

Iz Slike 15 je vidljivo da NEDD9 pokazuje jako obojenje u epitelu tumora u 71,3% slučajeva ukupnog istraživanog uzorka od 108 karcinoma želuca dok je u 28,7% slučajeva negativan. NEDD9 je također izražen u tumorskoj stromi u 69,3% uzoraka karcinoma želuca, ali slabijim intenzitetom obojenja. U ukupnom uzorku nema statistički značajne razlike izraženosti NEDD9 između epitela tumora i tumorske strome ( $\chi^2=0,002$ ;  $P=0,965$ ). Naprotiv, primjećujemo visoku korelaciju istovremene izraženosti NEDD9 u epitelnoj i stromalnoj komponenti karcinoma želuca.



Slika 15. Stupanj imunohistokemijske izraženosti NEDD9 u epitelu tumora i tumorskoj stromi u ukupnom uzorku od 108 karcinoma želuca ( $P=0,965$ )

Obzirom na visok stupanj izraženosti NEDD9 u epitelnoj komponenti karcinoma u našem istraživanju nismo utvrdili statistički značajnu razliku između karcinoma bez i s metastazama ( $P=0,447$ ). Također nije zabilježena razlika u izraženosti NEDD9 u tumorskoj stromi ( $P=0,347$ ) (Tablica 16).

Tablica 16. Intenzitet imunohistokemijskog obojenja NEDD9 u epitelu tumora i tumorskoj stromi prema statusu limfnih čvorova

	Status limfnih čvorova		P
	Bez metastaza	S metastazama	
<b>NEDD9 u karcinomu</b>			0,447
Negativan	17 (32,1)	14 (25,5)	
Jako izražen	36 (67,9)	41 (74,5)	
<b>NEDD9 u stromi</b>			0,347
Negativan	18 (34,0)	14 (25,5)	
Slabo izražen	34 (64,2)	41 (74,5)	
Jako izražen	1 (1,9)	0 (0,0)	

Izraženost NEDD9 u epitelu tumora, kao i u tumorskoj stromi, statistički značajno korelira s kliničkim stadijem bolesti. Ta statistički značajna korelacija najjače je izražena kod karcinoma kliničkog stadija 1 u odnosu prema ostalim kliničkim stadijima ( $P=0,016$ ). Iz Tablice 17 vidimo da su karcinomi kliničkog stadija 1 dvostuko češće negativni na NEDD9 od karcinoma stadija 2 i 3, a čak tri puta češće negativni nego oni kliničkog stadija 4.

Tablica 17. Distribucija imunohistokemijskog intenziteta obojenja NEDD9 prema kliničkom stadiju bolesti

		Klinički stadij				P
		<b>1 (A)</b>	<b>2 (B)</b>	<b>3 (C)</b>	<b>4 (D)</b>	
<b>NEDD9 u epitelu tumora</b>	Negativan	17 (44,7%)	6 (20,7%)	7 (20,6%)	1 (14,3%) <sup>A</sup>	<b>0,016</b>
	Jako izražen	21 (55,3%)	23 (79,3%) <sup>A</sup>	27 (79,4%) <sup>A</sup>	6 (85,7%) <sup>A</sup>	
<b>NEDD9 u tumorskoj stromi</b>	Negativan	18 (47,4%)	6 (20,7%)	7 (20,6%)	1 (14,3%) <sup>A</sup>	<b>0,021</b>
	Slabo izražen	19 (50,0%)	23 (79,3%) <sup>A</sup>	27 (79,4%) <sup>A</sup>	6 (85,7%) <sup>A</sup>	
	Jako izražen	1 (2,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

A – P<0,05 naspram istog parametra u koloni A

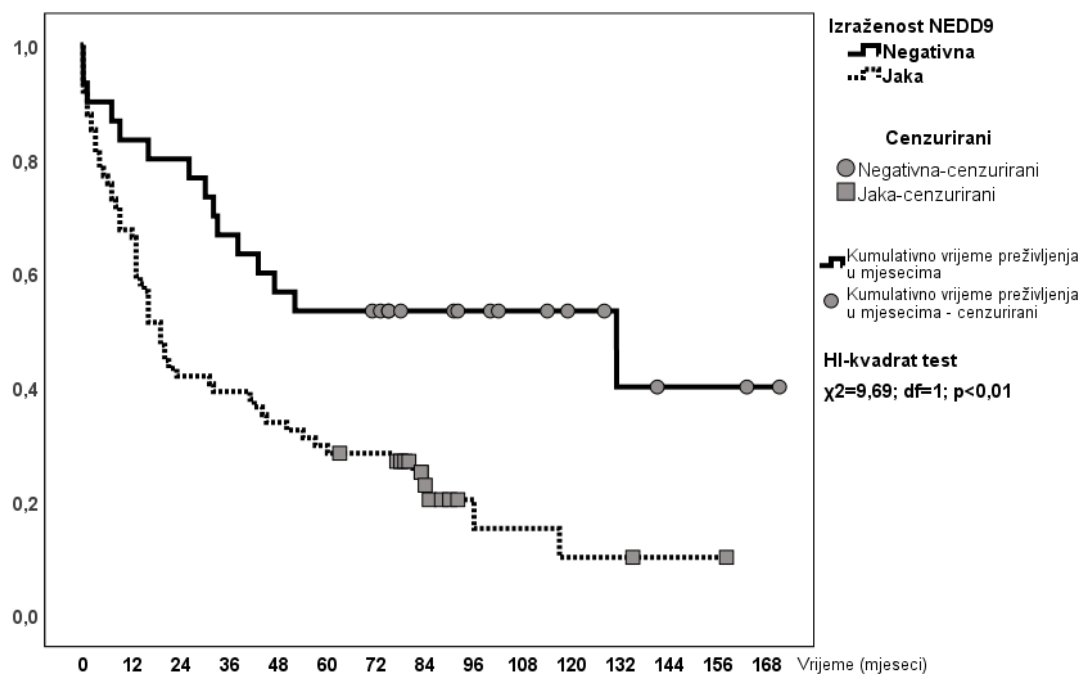
Iz tablice korelacija vidimo da izraženost NEDD9 u epitelu tumora i tumorskoj stromi pokazuje gotovo identične koeficijente korelacije (Tablica 18). Izraženost NEDD9 je u korelaciji s veličinom karcinoma, dubinom prodora karcinoma u stijenku želuca (T stadij) te prisutnom perineuralnom invazijom. Tako kod karcinoma čije stanice ne izražavaju NEDD9 medijan veličine iznosi 3 cm dok je kod NEDD9-pozitivnih karcinoma medijan veličine 5,5 cm (P=0,001). Karcinomi T1 stadija su NEDD9-negativni u 47,8% slučajeva, T2 u 38,9%, T3 u 19,3%, a T4 u svega 10% slučajeva (P<0,001). Karcinomi negativni na NEDD9 imaju prisutnu perineuralnu invaziju u 19,5% slučajeva i vaskularnu invaziju u 22,6%, za razliku od 36,4% slučajeva s vaskularnom i 42,8% s perineuralnom invazijom kod karcinoma pozitivnih na NEDD9. NEDD9 ne pokazuje niti statistički značajnu korelaciju s histološkim tipom tumora (P=0,849).

Tablica 18. Povezanost izraženosti NEDD9 u stanicama karcinoma i okolnoj stromi s kliničko-patološkim karakteristikama u ukupnom istraživanom uzorku (N=108). Analiza Spearmanove korelacije

		<b>NEDD9 u epitelu tumora</b>	<b>NEDD9 u tumorskoj stromi</b>
Dob	Rho	-0,016	-0,039
	<b>P</b>	0,869	0,686
Veličina tumora	Rho	0,310	0,327
	<b>P</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Histološki tip	Rho	-0,018	0,006
	<b>P</b>	0,849	0,948
Vaskularna invazija	Rho	0,165	0,177
	P	0,086	0,065
Perineuralna invazija	Rho	0,189	0,203
	<b>P</b>	<b>0,049</b>	<b>0,034</b>
pT stadij (T1-T4)	Rho	0,318	0,346
	<b>P</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
pN stadij (N0-N3)	Rho	0,098	0,116
	P	0,311	0,229
Status limfnih čvorova (poz/neg)	Rho	0,073	0,093
	P	0,452	0,337
Spol (Ž-0, M-1)	Rho	0,021	0,000
	P	0,833	1,00

Univarijantnom analizom je potvrđena statistički značajna povezanost preživljenja i izraženosti NEDD9 u epitelu tumora (Slika 16). Isti rezultat bio bi dobiven i kada bi se analizirala povezanost preživljenja i izraženosti NEDD9 u tumorskoj stromi, obzirom na

stupanj korelacije između izraženosti u epitelu i stromi bio >95%. Stoga smo daljnje analize nastavili samo s izraženosti NEDD9 u epitelu tumora.



Slika 16. Krivulje ukupnog preživljenja bolesnika prema izraženosti NEDD9 u epitelu tumora

Medijan ukupnog preživljenja bolesnika s karcinomima koji ne izražavaju NEDD9 bio je 131 mjesec dok su bolesnici čiji karcinomi izražavaju NEDD9 imali medijan preživljenja svega 19 mjeseci ( $P=0,002$ ) (Tablica 19, Slika 16). Ukoliko razlike u preživljenju prikazujemo dvogodišnjim preživljenjem, vidimo da je značajno više bolesnika koji su preživjeli nakon dvije godine imalo negativnu izraženost na NEDD9 ( $P=0,002$ ) (Tablica 20).



Tablica 19. Ukupno preživljenje bolesnika ovisno o izraženosti NEDD9 u epitelu tumora

	Medijan (mjeseci)	SE	95% interval pouzdanosti		P
<b>NEDD9 u epitelu tumora</b>					<b>0,002</b>
Negativan	131	67,6	0,0	263,5	
Jako izražen	19	2,4	14,3	23,7	

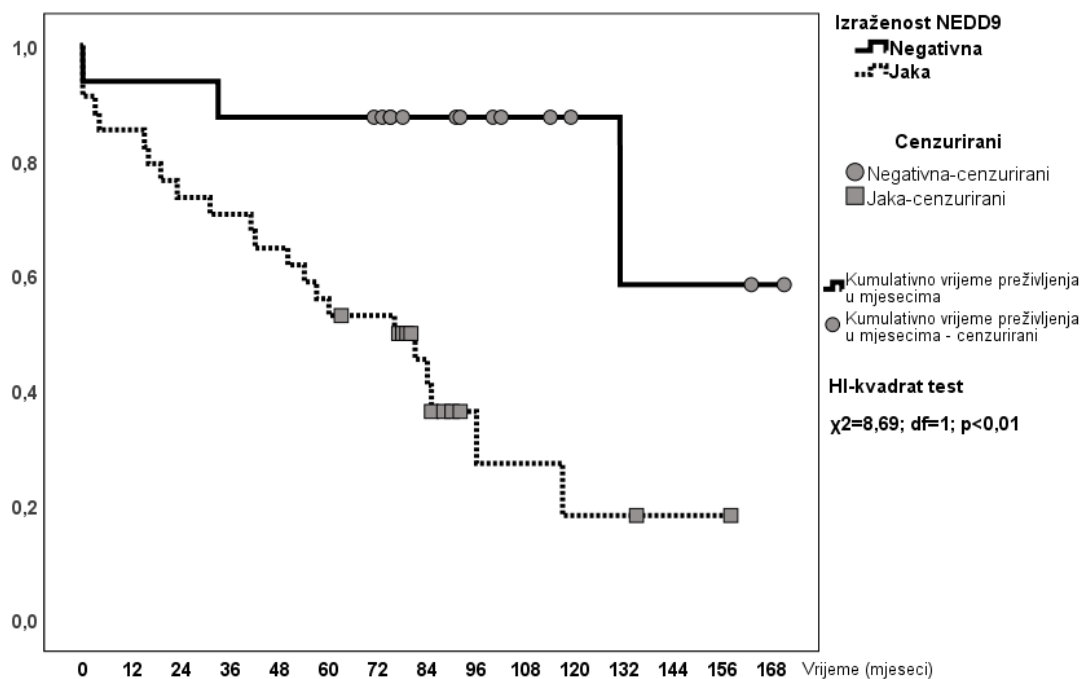
Tablica 20. Usporedba preživljenja nakon dvije godine od operacije obzirom na izraženost NEDD9 u epitelu tumora svih bolesnika te zasebno u bolesnika bez i s metastazama u limfne čvorove

		Preživljenje nakon 2 godine		P
		Živi	Umrli	
<b>Svi bolesnici</b>				
NEDD9 u epitelu tumora	Negativan	24 (43,6%)	6 (12,2%)	<b>&lt;0,001</b>
	Jako izražen	31 (56,4%)	43 (87,8%)	
<b>Bez metastaza u limfne čvorove</b>				
NEDD9 u epitelu tumora	Negativan	15 (37,5%)	1 (10,0%)	0,138
	Jako izražen	25 (62,5%)	9 (90,0%)	
<b>S metastazama u limfne čvorove</b>				
NEDD9 u epitelu tumora	Negativan	9 (60,0%)	5 (2,8%)	<b>0,001</b>
	Jako izražen	6 (40,0%)	34 (87,2%)	

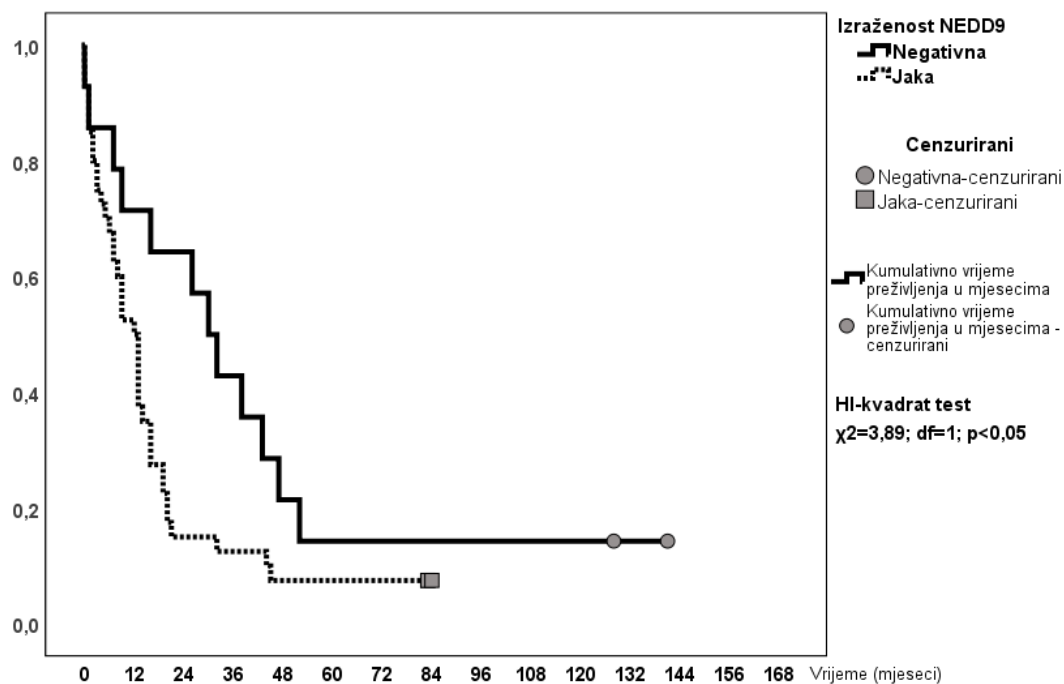
Učinjena je i dodatna podanaliza preživljenja zasebno u bolesnika s i bez metastaza u limfne čvorove. Povezanost izraženosti NEDD9 u epitelu i preživljenja je bila prisutna u bolesnika s i bez metastaza u limfne čvorove, iako je razlika u preživljenju bila značajno

veća u bolesnika bez metastaza u limfnim čvorovima (Slika 17 i 18). U skupini bolesnika bez metastaza u limfnim čvorovima, medijan preživljenja bolesnika s negativnom izraženosti NEDD9 nije dosegnut, a u bolesnika s jakom izraženošću na NEDD9 medijan preživljenja je iznosio 76 mjeseci ( $\chi^2 = 8,69$ ;  $P=0.003$ ) (Slika 17). U bolesnika s prisutnim metastazama u limfne čvorove, medijan preživljenja u bolesnika s negativnom izraženošću NEDD9 je iznosio 30 mjeseci, a u bolesnika s jakom izraženošću na NEDD9 medijan preživljenja je iznosio 12 mjeseci ( $\chi^2 = 3,89$ ;  $P=0.048$ ) (Slika 18).

U skupinama bolesnika bez metastaza i s metastazama u limfne čvorove lošije preživljenje značajno ovisi o jače izraženom NEDD9, što je kod bolesnika bez metastaza statistički značajnije izraženo ( $\chi^2 = 8,69$ ;  $P < 0,01$ ) (Slike 17 i 18).



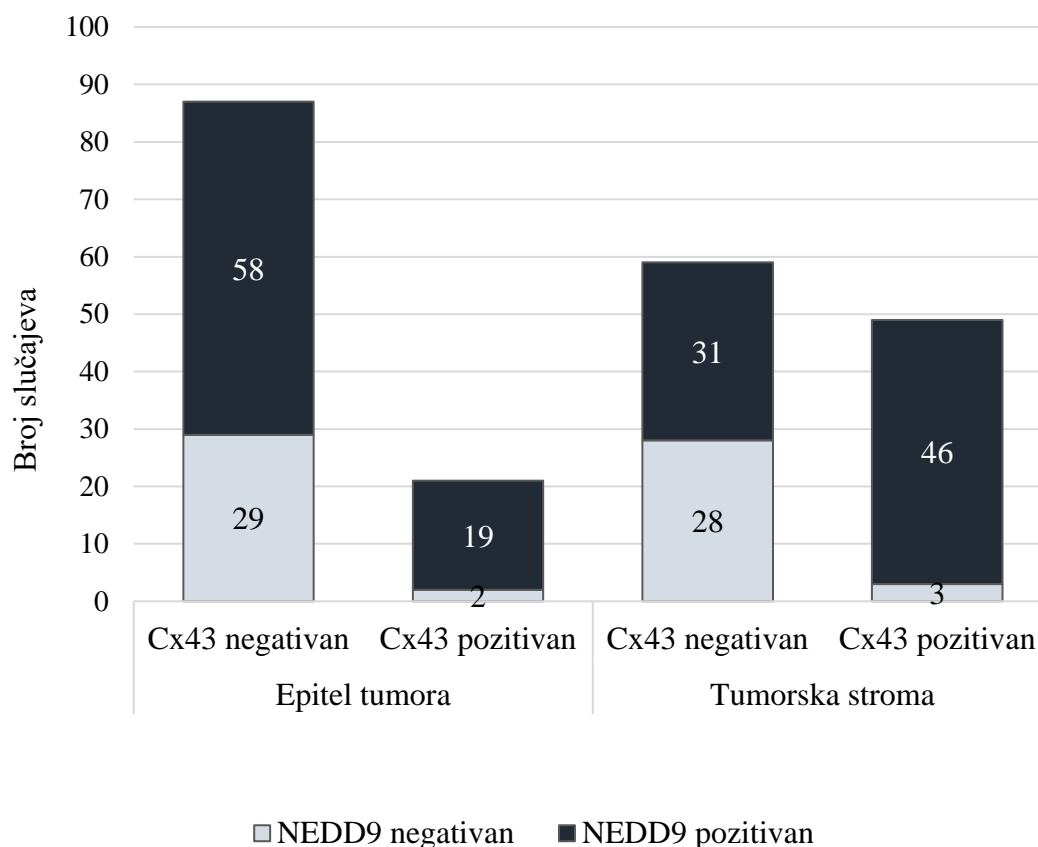
Slika 17. Krivulje ukupnog preživljenja prema izraženosti NEDD9 u epitelu tumora bolesnika bez metastaza u limfne čvorove



Slika 18. Krivulje ukupnog preživljenja prema izraženosti NEDD9 u epitelu tumora bolesnika s metastazama u limfne čvorove

### 5.3. Povezanost izraženosti koneksina 43 i NEDD9

U ukupnom uzorku karcinoma želuca, u slučaju negativnog statusa NEDD9 u epitelu tumora u 93,5% slučajeva u istim stanicama nema niti izraženosti Cx43 i isti obrazac zabilježen je i u 90,3% slučajeva u tumorskoj stromi. Odnosno, u epitelu tumora i tumorske strome koje izražavaju Cx43 istovremeno je izražen i NEDD9, ali ne o obrnuto (Slika 19). Kada promatramo NEDD9 pozitivne stanice karcinoma tada je Cx43 pozitivan tek u 24,7% epitela tumora i 59,7% tumorske strome.



Slika 19. Raspodjela izraženosti NEDD9 prema statusu izraženosti Cx43 u epitelu tumora i tumorskoj stromi u ukupnom uzorku 108 karcinoma želuca

Spearmanova analiza korelacija pokazuje da su izraženost Cx43 i NEDD9 u statistički značajnoj korelaciji (Tablica 21). Cx43 izražen u epitelu tumora je u značajnoj korelaciji s NEDD9 u epitelu tumora ( $P=0,027$ ) i tumorskoj stromi ( $P=0,029$ ), a ta korelacija je još jača u slučaju izraženosti Cx43 u stromi ( $P<0,001$ ). Istovremena izraženost NEDD9 u epitelu tumora i stromi je u gotovo apsolutnoj korelaciji jer je koeficijent korelacije  $Rho=0,997$  dok izraženost Cx43 u epitelu tumora nije u značajnoj korelaciji s njegovom izraženosti u stromi ( $Rho=0,10$ ;  $P=0,305$ ).

Tablica 21. Povezanost izraženosti Cx43 i NEDD9 u epitelu tumora i tumorskoj stromi.  
Analiza Spearmanove korelacije

		Cx43 u epitelu tumora	Cx 43 u tumorskoj stromi	NEDD9 u epitelu tumora	NEDD9 u tumorskoj stromi
Cx43 u epitelu tumora	Rho	1,000	0,100	0,213	0,210
	P	-	0,305	<b>0,027</b>	<b>0,029</b>
Cx43 u tumorskoj stromi	Rho	0,100	1,000	0,453*	0,484*
	P	0,305	-	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
NEDD9 u epitelu tumora	Rho	0,213	0,453*	1,000	0,967*
	P	<b>0,027</b>	<b>&lt;0,001</b>	-	<b>&lt;0,001</b>
NEDD9 u tumorskoj stromi	Rho	0,210	0,484*	0,967*	1,000
	P	<b>0,029</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	-

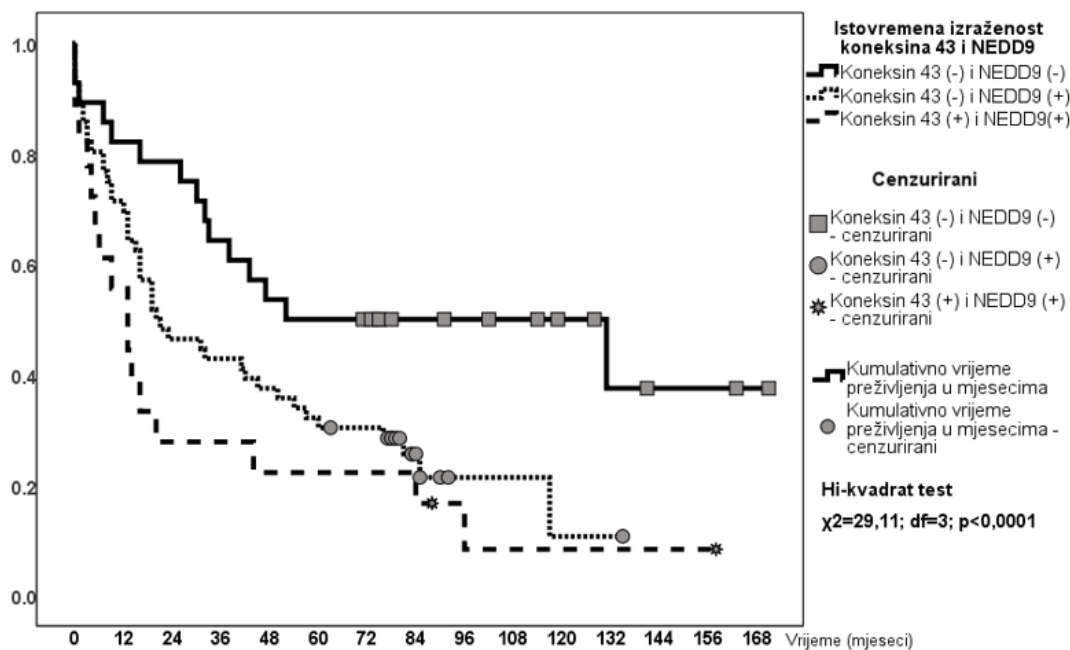
\* koeficijent korelacije Rho veći od 0,40 - jaka korelacija

U ukupnom uzorku karcinoma želuca, u 26,9% slučajeva karcinomi ne izražavaju niti jedan istraživani protein, u 53,7% slučajeva izražen je samo NEDD9, a samo u dva slučaja samo Cx43 dok u 17,6% slučajeva karcinomi izražavaju oba proteina.

Spearmanovom analizom korelacija također smo utvrdili da postotak karcinoma koji ne izražavaju oba istraživana proteina statistički značajno opada s dubinom prodora u stijenku želuca (Rho=0,215; P=0,027). Tako u stadiju T1 52,3% karcinoma ne izražava niti jedan protein dok su karcinomi stadija T3 i T4 u manje od 20% slučajeva negativni na oba proteina. Slična značajna korelacija zabilježena je i s kliničkim stadijem bolesti gdje u stadiju 1 41,7% karcinoma ne izražava oba proteina. Karcinomi kliničkog stadija 2 u najvećem broju slučajeva (79,3%) izražavaju samo NEDD9. Nismo zabilježili statistički

značajnu korelaciju histološkog tipa karcinoma s istovremenom izraženošću oba proteina. Ipak, intestinalni i miješani tip karcinoma u 50% slučajeva pokazuju samo pozitivitet na NEDD9, dok difuzni tip u 76,5% slučajeva izražava oba istraživana proteina.

Praćenjem ukupnog preživljenja bolesnika utvrdili smo da preživljenje statistički značajno ovisi o stupnju istovremene izraženosti oba proteina. Tako karcinomi koji izražavaju oba proteina imaju medijan preživljenja od 13 mjeseci, za razliku od medijana preživljenja od 52 mjeseca u bolesnika koji imaju negativnu izraženost oba proteina ( $P=0.009$ ) (Slika 20 i Tablica 22). Kada smo preživljenje analizirali odvojeno u skupini bolesnika s i bez metastaza u limfne čvorove, razlika u preživljenju je ostala statistički značajna u bolesnika bez metastaza, dok se izgubila statistička značajnost u bolesnika s metastazama u limfne čvorove (Tablica 22).



Slika 20. Krivulja ukupnog preživljenja bolesnika ovisno o istovremenoj izraženoj Cx43 i NEDD9 u epitelnoj komponenti karcinoma želuca

Tablica 22. Medijani ukupnog preživljenja ovisno o istovremenoj izraženosti Cx43 i NEDD9 u epitelnoj komponenti karcinoma želuca u cjelokupnoj ispitivanoj populaciji te posebno u bolesnika bez i s metastazama u limfne čvorove

	Medijan	SE	95% interval pouzdanosti		P
<b>Svi bolesnici</b>					<b>0,009</b>
Cx43 negativan /NEDD9 negativan	52,0	42,3	0,0	135,0	
Cx43 negativan /NEDD9 pozitivan	20,0	8,0	4,3	35,7	
Cx43 pozitivan /NEDD9 pozitivan	13,0	4,2	4,7	21,3	
<b>Bez metastaza u limfnim čvorovima</b>					<b>0,027</b>
Cx43 negativan /NEDD9 negativan	-	-	-	-	
Cx43 negativan /NEDD9 pozitivan	60,0	14,5	31,6	88,4	
Cx43 pozitivan /NEDD9 pozitivan	84,0	45,1	0,0	172,3	
<b>S metastazama u limfnim čvorovima</b>					<b>0,070</b>
Cx43 negativan /NEDD9 negativan	30,0	5,6	19,0	41,0	
Cx43 negativan /NEDD9 pozitivan	12,0	2,2	7,7	16,3	
Cx43 pozitivan /NEDD9 pozitivan	9,0	4,0	1,1	16,9	

#### **5.4. Analiza višestruke regresije**

Analizom višestruke regresije, promjenom nekoliko modela i različitih varijabli uključenih u analizu, utvrdili smo da su T i N stadiji bolesti te izraženost Cx43 i NEDD9 neovisni prognostički pokazatelji preživljenja bolesnika s karcinomom želuca (Tablica 23).

U prvom koraku smo u analizu uvrstili dob, spol, tip tumora, veličinu tumora te vaskularnu i perineuralnu invaziju (Model 1). Od svih navedenih varijabli su samo veličina tumora i prisustvo perineuralne invazije bili neovisni prognostički čimbenici. Potom smo iz analize uklonili veličinu tumora, a uvrstili T i N status (Model 2), nakon čega su samo T i N status bili neovisni prognostički čimbenici. Potom je u modelu 3 analizirana samo epitelna ekspresija Cx43 i NEDD9 u kojem je sam NEDD9 bio neovisan prognostički faktor. No kada smo u konačni model uvrstili T i N status te izraženost Cx43 i NEDD9, utvrdili smo kako su sve četiri varijable neovisni prognostički čimbenici (Tablica 23).



Tablica 23. Model višestruke regresije kojom je analizirana povezanost pojedinih parametara s preživljenjem

	<b>B</b>	<b>SE</b>	<b>Wald</b>	<b>HR</b>	<b>95% CI</b>		<b>P</b>
<b>Model 1</b>							
Veličina tumora	.127	.036	12.448	1.135	1.058	1.218	.000
Perineuralna invazija	-.889	.271	10.730	.411	.242	.700	.001
<b>Model 2</b>							
T status	.443	.164	7.324	1.557	1.130	2.146	.007
N status	.469	.119	15.567	1.598	1.266	2.017	.000
<b>Model 3</b>							
Izraženost NEDD9 u epitelu	1.348	.450	8.986	3.849	1.595	9.293	.003
<b>Model 4</b>							
Izraženost Cx43 u epitelu	.436	.220	3.913	1.547	1.004	2.383	.048
Izraženost NEDD9 u epitelu	1.924	.544	12.517	6.846	2.358	19.875	.000
T status	.429	.183	5.528	1.536	1.074	2.197	.019
N status	.490	.122	16.105	1.633	1.285	2.075	.000

B – nestandardizirani koeficijent korelacije; SE – standardna pogreška nestandardiziranog koeficijenta korelacije; CI – interval pouzdanosti; HR – omjer hazarda (eng. *hazard ratio*)

## 6. RASPRAVA

Naše istraživanje provedeno je na uzorku 108 bolesnika s karcinomom želuca čija je smrtnost od ove bolesti bila preko 70%. Cx43 i NEDD9 su određivani u epitelnoj komponenti karcinoma i tumorskoj stromi.

Rezultati istraživanja pokazuju nedostatak izraženosti proteina Cx43 u većini karcinoma želuca dok oko 20% karcinoma izražava Cx43, uglavnom slabo. Jako izraženost Cx43 pokazuje samo oko 5% karcinoma s tim da postotak karcinoma koji jako izražavaju Cx43 raste s pojavom metastaza u limfne čvorove. Prema postojećoj literaturi koneksini su važan dio stanične membrane koji omogućava međustaničnu komunikaciju preko koneksinskih kanala/pukotinastih spojišta, a Cx43 je najčešći i jedan od najvažnijih koneksina. Cx43 „*knock-out*“ miševi ne mogu preživjeti. Prema *Human Protein Atlasu* (262) epitelne stanice brojnih organa izražavaju Cx43, a na mRNA i proteinskom nivou posebno je jako izražen u stanicama endokrinih žlijezda, srčanog mišića, mozga i koži. U nekim organima jača je proteinska nego mRNA izraženost (probavni trakt, bubreg, testisi) zbog 20 gena uključenih u njihovo stvaranje te post-translacijsku modifikaciju. Isti atlas upućuje da se u normalnoj sluznici gastrointestinalnog trakta od ždrijela do debelog crijeva ekspresija Cx43 smanjuje. Stoga je bilo za očekivati da bi dobro diferencirani karcinomi želuca trebali izražavati koneksine i druge slične komunikacijske i adhezijske molekule. Maes i sur. (263) su potvrdili izraženost Cx43 u tkivu želuca, ne samo kod čovjeka već i kod miševa, štakora, pasa, zečeva i dr. Drugi rad Maes i sur. (264) pokazuje da su brojne druge bolesti, ne samo karcinomi, povezane sa smanjenom izraženosti brojnih koneksina na staničnim membranama. Smanjena izraženost Cx43 zabilježena je u Hirschprungovoj bolesti, upalnim stanjima i ulkusu, divertikulima i spontanim neonatalnim perforacijama želuca. Wu i sur. (225) su metodom Western blota utvrdili izraženost proteina Cx43 u 100% uzoraka zdrave

sluznice želuca te u 40% stanica karcinoma želuca, što su potvrdili i na staničnim linijama dobro i slabo diferenciranih karcinoma želuca. Valja napomenuti da je navedena metoda daleko osjetljivija od metode imunohistokemijskog bojenja koju smo koristili u našem istraživanju, ali ne određuje točnu lokalizaciju proteina (epitelne stanice karcinoma ili tumorska stroma). Ako uzmemo u obzir da je i u njihovom slučaju Cx43 detektiran u samo 40% slučajeva karcinoma možemo reći da je naš rezultat vrlo sličan, uzevši u obzir prag detekcije obje metode (225).

Naši podaci upućuju da je u intestinalnom tipu karcinoma Cx43 nešto više izražen (23,7%) nego u difuznom tipu (17,6%) i miješanom tipu (18,4%), doduše bez statistički značajne razlike. Bilo bi čak i očekivano da difuzni tip karcinoma želuca uopće ne izražava Cx43 obzirom da taj histološki tip karakterizira slaba kohezivnost među stanicama, za razliku od žljezdanih formacija karakterističnih za intestinalni tip. Pregledom jačine izraženosti zapravo smo utvrdili da difuzni tip slabo izražava Cx43, dok intestinalni i miješani tip u više od 50% pozitivnih stanica jako izražavaju Cx43. U našem istraživanju imamo veći postotak karcinoma miješanog tipa nego je to referirano u WHO klasifikaciji pa je moguće da je to utjecalo na nedostatak statistički značajne razlike (160).

U ovom istraživanju izraženost Cx43 u epitelnoj komponenti karcinoma nije u statistički značajnoj korelaciji niti s jednim istraživanim histopatološkim parametrom (veličina tumora, histološki tip, pT i pN, vaskularna i perineuralna infiltracija), kao niti s kliničkim stadijem bolesti, dobi i spolom bolesnika. Iako smo zabilježili porast broja karcinoma koji jače izražavaju Cx43 s višim kliničkim stadijem bolesti (posebice kod kliničkog stadija IV) i većim brojem pozitivnih limfnih čvorova, nije na razini statističke značajnosti. Isti rezultat dobili su Tanaka i sur. (265) na karcinomima pločastih stanica jednjaka. Za razliku od našeg rezultata Wu i sur. (225) su utvrdili korelaciju Cx43 s histološkim tipom i TNM stadijem karcinoma želuca.

Iz toga proizlazi pitanje zbog čega je došlo do gotovo potpunog gubitka izraženosti Cx43 u stanicama karcinoma želuca, a zatim njegove ponovne pojave u višim stadijima bolesti. Prema našim rezultatima moglo bi se zaključiti da negdje u ranoj karcinogenezi dolazi do smanjenog stvaranja Cx43 ili njegove degradacije te da je pozitivan nalaz u karcinomima višeg kliničkog stadija posljedica neke druge patološke aktivacije i njegovog nakupljanja s moguće drugačijom funkcijom od primarnog stvaranja hemikanala pukotinastih spojišta. U našim rezultatima čak i karcinomi plitkog prodora u stijenku želuca (T1 i T2) pokazuju pozitivitet u samo 20% slučajeva.

Prva saznanja o međustaničnoj komunikaciji datiraju još s kraja 19. stoljeća, a prvi značajniji radovi o funkciji koneksina objavljeni su još prije više od 50 godina (266). Današnja saznanja upućuju da održavanjem normalne funkcije pukotinastih spojišta, Cx imaju ulogu tumor-supresora. Međutim, tijekom karcinogeneze dolazi do gubitka Cx43, što je potvrđeno eksperimentom *in vivo* na Cx43 „knock-out“ miševima koji su podložniji razvoju karcinoma (266). Jedino ostaje pitanje prethodi li karcinogenezi poremećaj u međustaničnoj konekciji i gubitak Cx, što bi se prema modelu miša moglo zaključiti. S druge strane, neki radovi navode da gubitkom određenih Cx nije došlo do gubitka pukotinastih spojišta.

Brojna stanja i bolesti povezane su s poremećajem funkcija Cx. Tako su, pored već navedenih bolesti i Alzheimerova bolest, psorijaza, astma, infarkt, dijabetes, celijakija, Chronova bolesti i dr. povezane s poremećajem u funkciji Cx (267). Međustanična komunikacija omogućava parakrinu izmjenu molekula, čime se stanice mogu zaštititi od propadanja npr. u slučaju fokalne hipoksije/ishemije izmjenom esencijalnih molekula za oporavak stanica. Također, koneksini i pukotinasta spojišta igraju važnu ulogu u cijeljenju rana i oporavku oštećenog tkiva. S druge strane izmjena molekula omogućava širenje toksičnih molekula na okolne stanice i pojačava toksični efekt. Zbog dvojakog efekta još do

danas funkcija Cx i njihov značaj nisu do kraja razjašnjeni. Cx43 izražen je u kružnom mišićnom sloju stijenke atruma i korpusa želuca (velika krivina), ali ne i u dijelu fundusa i pilorusu (264). Nema podataka o tome omogućava li nedostatak Cx u tim slojevima sluznice želuca brži prodor karcinoma i agresivnije ponašanje. Prema Maes i sur. (264) proteini pukotinastih spojišta u sluznici želuca omogućavaju izlučivanje kiseline, gastro-duodenalnu i crijevnu pokretljivost te sudjeluju u stvaranju prirodene imunosti crijeva. Gubitak međustanične komunikacije preko pukotinastih spojišta povezan je s razvojem čira na želucu. Isto tako infekcija *Helicobacter pylorii* (Hp) povećava rizik za razvoj peptičnog ulkusa, karcinoma želuca ili limfoma. Zbog izlučivanja toksičnih produkata *CagA* dolazi do poremećaja u staničnoj proliferaciji te sporijeg zarastanja ulkusa, gdje koneksini imaju važnu ulogu u regeneraciji tkiva. *CagA* pozitivan soj Hp čak i u kulturi stanica *in vitro* blokira sintezu Cx43 hipermetilacijom njegovog promotora. Obzirom da je naše istraživanje retrospektivnog karaktera nemamo podataka o infekciji Hp kod naših bolesnika.

Međutim, neki od autora naglašavaju tumor-supresor funkciju pojedinih Cx (268). Iako je njihova lokalizacija primarno membranska, translokacija Cx26 u citoplazmu ima tumor-supresorski učinak (269). Za razliku od njega Cx43 je definiran kao propagator proliferacije, invazivnosti i metastatskog potencijala. Također postoji ideja da Cx43 pomaže stanicama karcinoma u ostvarivanju kontakta s mezenhimalnih stanicama čime je omogućeno metastaziranje. Prema Yeh i sur. (270) lokalizacija Cx43 u citoplazmi i organelama, a ne primarno na membrani, pokazuje njegovu potpuno drugu funkciju. Tako gubitak membranskog Cx43 u stanicama karcinoma omogućava njegovo rasijavanje i cirkuliranje po tijelu, a ponovna lokalizacija na membrani metastatskih karcinoma omogućava rast metastaza po organima (271). I u našem slučaju izraženost Cx43 javlja se i u citoplazmi stanica karcinoma što jasno upućuje na poremećaj njegove funkcije, a jaču izraženost pokazuju karcinomi s metastazama u limfne čvorove. Moguće je da nedostatak

Cx43 i hemikanala na membrani stanice (vakuolizacija) inducira preveliku transkripciju njegovog gena, čime se on nakuplja u citoplazmi. Također, postoji mogućnost mutacija u samom genu te stvaranju defektnog proteina (samo aktivna C-terminalna domena) koji više ne može tvoriti hemikanale, ali može svojom C-krajem vezati druge proteine i aktivirati brojne signalne puteve, ili dolazi do njegovog nakupljanja u mitohondrijima ili endoplazmatskom retikulumu. Zapravo bi bilo zanimljivo proširiti naše istraživanje i analizirati izraženost Cx43 u samim metastazama limfnih čvorova. Možda bi to mogao biti biljeg agresivnog ponašanja karcinoma i izuzetno loše prognoze bolesnika.

Iako nismo zabilježili značajnu korelaciju izraženosti Cx43 s istraživanim histopatološkim parametrima, Cx43 izražen u epitelnoj komponenti karcinoma u korelaciji je s kraćim preživljenjem bolesnika. Smrtnost u našoj skupini bolesnika je bila relativno visoka te je unutar prve dvije godine umrlo oko 45% bolesnika, a ukupno više od 70%. Praćenjem dvogodišnjeg preživljenja utvrdili smo da je veći broj umrlih u skupini bolesnika s karcinomima koji izražavaju Cx43 ( $P=0,021$ ). Tako nažalost najveći broj bolesnika čiji karcinomi izražavaju Cx43 umiru unutar prve dvije godine. Kada smo učinili analizu preživljenja posebno u skupini bolesnika s i bez metastaza u limfne čvorove, navedena statistička značajnost se izgubila, prije svega zbog dvostruko manje ispitivane populacije. No ova činjenica ne mijenja konačni zaključak da je Cx43 prognostički čimbenik u bolesnika s karcinomom želuca. Analizom višestruke regresije potvrdili smo da je izraženost Cx43 u stanicama karcinoma želuca pokazatelj lošijeg preživljenja bolesnika s karcinomom želuca, neovisno o drugim prognostičkim čimbenicima. Zanimljivo je da u višestrukoj regresiji u kojoj su kao nezavisne varijable korištene samo Cx43 i NEDD9, Cx43 se nije pokazao kao nezavisni prognostički čimbenik, a nakon dodatka T i N statusa su i Cx43 i NEDD9 bili neovisni prognostički čimbenici. Iz ovoga možemo zaključiti da postoji

određena međuovisnost ova četiri parametara koju višestruka regresija uzima u obzir, a prethodno smo i pokazali da postoji povezanost izraženosti Cx43 i veličine tumora.

U literaturi preživljenje bolesnika ovisno o izraženosti Cx43 ponajprije ovisi o sijelu karcinoma. Tako radovi uglavnom prikazuju izraženost Cx43 kao pokazatelj lošijeg preživljenja bolesnika s pločastim karcinomom jednjaka (265), pluća i kolona dok je Chasampalioiti i sur. (272) pokazatelj boljeg preživljenja bolesnika s karcinomom dojke. Zapravo je zanimljivo što autori pokazuju, možemo reći, potpuno drugačiju sliku. Kada pogledamo njihove rezultate onda je vidljivo da gubitak izraženosti Cx43 korelira s pojavom trostruko negativnih karcinoma dojke, visokog proliferacijskog statusa (jer se Cx43 gubi tijekom diobe i proliferacije), ali je ukupno preživljenje ipak oko 200 mjeseci. Autori naglašavaju poveznicu jače izraženog Cx43 čak i tijekom proliferacije ukoliko je signalni put preko aktivacije estrogenom dominantan (272,273).

U našem istraživanju pratili smo i izraženost Cx43 u tumorskoj stromi. Naši rezultati pokazuju statistički značajno veći udio karcinoma želuca s Cx43-pozitivnom tumorskom stromom, uglavnom slabe izraženosti, nego što je udio Cx43 pozitivnih u epitelnoj komponenti karcinoma. Karcinomi s metastazama imaju neznatno češće pozitivnu stromu, ali je zanimljivo da izraženost Cx43 u stromi statistički značajno korelira s većim karcinomima, dubljeg prodora u stijenku želuca te uznapređovalijim kliničkim stadijem bolesti. Karcinomi sa stromom pozitivnom na Cx43 bili su gotovo dvostruko veći, i više nego duplo češće, višeg kliničkog stadija bolesti. Međutim, nema značajne korelacije s pojavom vaskularne ili perineuralne infiltracije. Osim toga pojavljuje se tendencija ka značajnoj korelaciji sa ženskim spolom koju, na žalost, ne možemo objasniti. U našem istraživanju imamo jednak omjer bolesnika oba spola, dok je inače karcinom želuca nešto češći kod muškaraca. Možda naš rezultat upućuje na metaboličke razlike između spolova koje bi svakako trebalo dodatno istražiti, jer se otvara mogućnost i za terapijske implikacije.

Prema radu Jukić i sur. (274) alfa receptori za estrogen su izraženi u epitelnim stanicama karcinoma želuca kao i u fibroblastima, monocitima i masnim stanicama okolne strome te mogu utjecati na slabiju pokretljivost stanica karcinoma. To bi donekle moglo objasniti manju smrtnost i bolji medijan petogodišnjeg preživljavanja bolesnika u našem istraživanju.

Mehanizam djelovanja Cx43 u tumorskoj stromi još uvijek je nepoznanica. Neki stariji radovi su utvrdili izraženost koneksina u stromi raznih karcinoma, ali noviji radovi pokušavaju objasniti mehanizme djelovanja. Radić i sur. (275) su utvrdili značajno jaču izraženost Cx43 u stromi karcinoma kolona s metastazama (M1 stadij). Lou i njegovi suradnici (276) pokazali su da kod karcinoma pluća jedino Cx43 ima sposobnost integrirati se u membranu karcinoma i CAF (*engl.* cancer associated fibroblasts), posebno u zoni infiltrativnog rasta karcinoma. Prema njima, ta veza čak ne mora biti bilateralna, kao što je to nužno u interakciji dvije epitelne stanice. Kanali koje stvara Cx43 omogućavaju transport ATP i ADP te glukoza-6-fosfata i laktata, esencijalnih za život stanice. Na taj način dolazi do preživljenja, promocije metastaziranja te pojave rezistencije karcinoma na terapiju. Još jedan eksperiment na kulturi stanica primarno bez Cx43 pokazuje da dolazi do migracije i pojave Cx43 kada se nađu u istoj kulturi sa stanicama koje sadrže Cx 43, što svakako upućuje na prisutnost koneksina u okolnom mediju (277). Vidimo da je u našem istraživanju stromalna izraženost Cx43 jedino značajna kod lokalnog širenja i infiltracije karcinoma u okolno tkivo. Pretpostavljamo da tu postoji povezanost s CAF koji osiguravaju esencijalne molekule. Osim toga Luo i sur. (276) napominju da zbog stvaranja jednosmjernog pukotinastog spojišta iz CAF u stanice karcinoma, dolazi do indukcije epitelno-mezenhimalne tranzicije te aktivacije PIK3/Akt/MAPK signalnog puta u stanicama karcinoma.

Osim Cx43 istraživali smo i izraženost NEDD9 u karcinomima želuca. Za razliku od Cx43, u našem istraživanju NEDD9 je jako izražen u više od dvije trećine epitelnih stanica



karcinomima želuca kao i njihovoj stromi. Zapravo, izraženost NEDD9 u karcinomu gotovo apsolutno korelira s njegovom izraženošću u tumorskoj stromi, osim što je intenzitet obojenja u stromi slabiji. Upravo iz tog razloga nismo radili detaljne analize izraženosti NEDD9 u epitelu i tumorskoj stromi, jer je za očekivati da bi rezultati bili identični, a potencijalno bi istovremena analiza ova dva parametra ometala izvođenje višestruke regresije.

Prema *Human Protein Atlas* bazi (278) transkripcija gena NEDD9 je relativno niska (mRNA) u svim tkivima osim masnog tkiva i pluća, a na proteinskom nivou uglavnom je slabo citoplazmatski izražen u gotovo svim tkivima. Međutim, prema istoj bazi većina stanica karcinoma izražava NEDD9 u visokom postotku u citoplazmi i u jezgri, a karcinomi prostate, karcinomi dojke i ginekološki karcinomi te Non-Hodgkin limfom ga izražavaju jako. Većina radova potvrđuje jaču izraženost NEDD9, na razini mRNA i proteina, u stanicama karcinoma raznih sijela u odnosu na stanice benignih promjena kao i normalno tkivo želuca koje pokazuje najnižu razinu proteina NEDD9 (214,250,257,279). Također radovi potvrđuju da se niska izraženost proteina NEDD9 javlja u mukozi stijenke želuca, a izraženost raste s promjenama u sluznici od hiperplazija do karcinoma (260,280–282). Imunohistokemijska izraženost NEDD9 prvenstveno ovisi o odabiru primarnog protutijela, pa će tako u slučaju poliklonalnog protutijela reakcija biti jača. Sam protein prolazi post-translacijsku modifikaciju te dolazi u četiri izoforme koje se međusobno razlikuju po mjestu fosforilacije te mjestu i funkciji koju obavlja NEDD9. Izoforma p115 i njegova fosforilirana forma p105 pojavljuju se kasnije u staničnom ciklusu dok p65 i p55 nastaju kao posljedica cijepanja pomoću kaspaza također u staničnom ciklusu. Zbog složene prirode modifikacija fosforilacije NEDD9, trenutno se malo zna o pojedinoj ulozi svakog od fosforilacijskih mjesta i njihovom posredovanju stanične signalizacije preko NEDD9. Naše primarno protutijelo je poliklonalno te pokriva sve izoforme proteina NEDD9, tako da ne možemo

dalje raspravljati o mogućim fosforiliranim formama NEDD9 koje mogu aktivirati pojedine signalne puteve uključene u proliferaciju, migraciju, apoptozu i druge procese važne u malignoj transformaciji (283,284).

Prema našim rezultatima izraženost NEDD9 raste s agresivnijim histopatološkim karakteristikama karcinoma pa su tako NEDD9 pozitivni karcinomi veći, dubljeg prodora kroz stijenku želuca, češće s prisutnom perineuralnom infiltracijom i višeg kliničkog stadija bolesti te tendencijom ka značajnoj vaskularnoj infiltraciji. Karcinomi s metastazama i histološki difuzni tip imaju češće izražen NEDD9, ali bez statističke značajnosti. Naši rezultati u potpunosti odgovaraju rezultatima drugih autora, osim što u našem slučaju nije detektirana korelacija NEDD9 s pozitivnim statusom limfnih čvorova (257,260,281). Možemo pretpostaviti da se statistička značajnost izgubila zbog planskog grupiranja slučajeva u skupine karcinoma želuca bez metastaza i skupinu s metastazama, dok su u većini drugih istraživanja kohorte bile negrupirane pa su stoga obuhvaćale veći udio karcinoma s metastazama u limfne čvorove. Ni drugi radovi nisu utvrdili korelaciju NEDD9 s histološkim tipom karcinoma želuca (260) niti kod karcinoma kolona (285).

Naši rezultati također pokazuju da izraženost NEDD9 u epitelu tumora značajno korelira s kraćim preživljenjem bolesnika te su bolesnici s negativnim statusom NEDD9 imali daleko bolje preživljenje. Tako više od 90% bolesnika ima dvogodišnje preživljenje u slučaju negativnog NEDD9 uz medijan preživljenja od 131 mjesec. Zanimljivo je da, iako nismo utvrdili statistički značajnu povezanost izraženosti NEDD9 sa statusom pozitivnih limfnih čvorova, u bolesnika s pozitivnim limfnim čvorovima pozitivan NEDD9 u epitelu tumora izdvaja skupinu bolesnika s visokom smrtnošću te je njihovo dvogodišnje preživljenje oko 15% s medijanom od 19 mjeseci. Ovaj podatak je dosta loš, ali ukazuje na moguće terapijske implikacije NEDD9 u karcinomima želuca, posebno u bolesnika s pozitivnim limfnim čvorovima.

I ovi rezultati odgovaraju rezultatima drugih autora, ako pratimo samo preživljenje bolesnika s karcinomom želuca (257,281). NEDD9 je pokazatelj lošeg preživljenja i kod karcinoma drugih sijela, što je dokazano u velikoj meta-analizi Gu i suradnika (240). Ipak, neki radovi upućuju na NEDD9 kao pokazatelj dobre prognoze karcinoma glave i vrata (256) i pluća (255), dok neki autori nisu utvrdili korelaciju izraženosti NEDD9 s preživljenjem bolesnika s karcinomom gušterače (214) i kolona (250). U radu Ostojić i sur. (255) naglašavaju značajnu izraženost NEDD9 u jezgrama stanica karcinoma pluća koja korelira s njegovom izraženosti u citoplazmi istih stanica.

Multivarijantnom analizom potvrdili smo neovisnu prognostičku vrijednost NEDD9 u karcinomima želuca. Obzirom na visoku izraženost NEDD9 u karcinomima višeg kliničkog stadija, a slabu izraženost u ranoj fazi karcinogeneze (stadij 1), anti-NEDD9 ciljana terapija mogla bi biti visoko selektivna i učinkovita, posebice što zdrava tkiva izražavaju niske razine NEDD9 i na razini proteina i mRNA. Obzirom na dokazanu jaču izraženost NEDD9 u stanicama karcinoma, pokušalo se koristiti izraženost NEDD9 u serumu bolesnika kao biljeg progresije bolesti, ali za sada povišene vrijednosti NEDD9 u serumu nemaju prognostički značaj (286–289). Jako je zanimljivo da svi radovi pokazuju i izraženost NEDD9 u serumu zdravih donora, doduše u značajno nižim koncentracijama.

Ono što NEDD9 izdvaja od većine do sada istraživanih proteina, kao biljega agresivnosti karcinoma, je to što NEDD9 nema nikakvu katalitičku funkciju. Zbog toga se ne može smatrati onkogenom, ali s druge strane kao „nosač“ proteina ostvaruje interakcije s brojnim proteinima i aktivan je u brojnim signalnim procesima. Za integrin-ovisnu signalnu kaskadu koja kontrolira kretanje stanica i prijanjanje na ECM važan je signalni put preko NEDD9 koji je i efektor nizvodno u signalnom putu TGF- $\beta$  koji ima utjecaj na razvoja tkiva i EMT. NEDD9 sudjeluje u migraciji T-stanica preko reakcije na signale koji proizlaze iz receptora T i B stanica, integrina, hemokinskih receptora i tirozin kinaza receptora, kao i

citoplazmatskih onkogeni. Nizvodna regulacija preko NEDD9 uključuje različite molekule i signalne puteve te omogućava NEDD9 da utječe na stanične procese kao što su migracije, invazije, preživljavanja, resorpcije cilija i mitozu (290).

Već smo iz naših rezultata, ali i onih drugih autora, utvrdili značaj Cx43 i NEDD9 u karcinomima želuca. Štoviše, naše istraživanje je također potvrdilo da su oba biljega neovisni prognostički pokazatelji lošijeg preživljenja bolesnika s karcinomom želuca. Međutim, u do danas objavljenoj literaturi, ne postoje saznanja koreliraju li ova dva biljega međusobno te koji je njihov značaj kod karcinoma želuca, ali moguće i kod karcinoma drugih sijela. Tako su naši rezultati analize istovremene izraženosti oba proteina dali vrlo zanimljiva opažanja. Stanice karcinoma i okolne tumorske strome koje izražavaju Cx43 istovremeno izražavaju i NEDD9 te je podudarnost vrlo visoka. Analiza korelacija je pokazala da je izraženost Cx43 u epitelnoj komponenti karcinoma u značajnijoj korelaciji s NEDD9 nego s vlastitom izraženošću u stromi. Istovremeno je korelacija stromalnog Cx43 u jakoj korelaciji s NEDD9 u karcinomu i stromi. Isto tako smo utvrdili da s dubinom prodora karcinoma i višim kliničkim stadijem bolesti raste broj karcinoma koji izražavaju oba proteina. Također smo uočili da difuzni tip karcinoma želuca u najvećem postotku (76,5%) od svih histoloških tipova izražava oba istraživana proteina, iako nema statističke značajnosti. Bolesnici s karcinomima pozitivnim na oba proteina imaju medijan preživljenja od 13 mjeseci, odnosno bolesnici čiji karcinomi ne pokazuju niti jedan od istraživanih proteina imaju najbolje petogodišnje preživljenje. Vidimo da agresivniji oblici karcinoma želuca pokazuju pozitivitet na oba proteina. Bilo bi zanimljivo vidjeti nastavlja li se taj trend i kod metastaza u druge organe. Tako su Jurčić i sur. (250) pokazali najjaču izraženost NEDD9 u metastazama karcinoma kolona u jetru te lošije preživljenje bolesnika s NEDD9 negativnim metastazama u jetru (iako bez statističke značajnosti).

Zanimljiv rad prezentirali su Gabbasov i sur. (291) na modelu soja miševa (MISIIR-TAg) kod kojih dolazi do spontanog razvoja karcinoma ovarija, ali su genetskom modifikacijom stvorili dva podsoja: NEDD9+ i NEDD9-. Iako su karcinomi sporije rasli i bili nešto manji kod NEDD9- miševa, u svih miševa je došlo do razvoja metastaza i progresije bolesti te autori zaključuju da NEDD9 nije nužan za razvoj karcinoma, ali ga svakako podržava. Međutim, istraživanje Meng i sur. (284) na kulturi stanica karcinoma kolona pokazuju da utišavanjem ekspresije gena NEDD9 dolazi do povećanja izraženosti E-cadherina (epitelni biljeg) i smanjenja izraženosti vimentina (mezenhimalni biljeg). Stoga prema nekim autorima NEDD9 doprinosi EMT, posebice utjecajem na lizosomalnu degradaciju E-cadherina, koji je negativni regulator  $\beta$ -katenina (285,292). Rad Semelakova i sur. (293) pokazuje da je vimentin jedan od vodećih proteina u interakciji s prekomjerno izraženim NEDD9. Uobičajeno je vimentin vezan na BCAR/p130Cas (paralog NEDD9) i fosforiliran na Ser56 te sudjeluje kao intermedijarni filament u staničnim ciklusima. Međutim, vezan na NEDD9 nije fosforiliran na Ser56 te možda omogućava pojačano izlučivanje matrix metaloproteinaza 9, remodeliranje citoskeleta prema mezenhimalnim karakteristikama i razvoj invadopodija (mjesto fokalnog izlučivanja matriks metaloproteaze 9) i podopodija (294,295). Osim toga NEDD9 stabilizira stvaranje i dinamiku žarišnih mjesta adhezije interakcijom s integrinima.

Dodatni efekt na EMT NEDD9 ostvaruje stimulacijom TGF- $\beta$  i aktivacijom Wnt signalnog puta (292). Isto tako, aktivacijom Wnt signalnog puta dolazi do remodeliranja Cx43, a pretpostavlja se da je Cx43 dio kompleksa s  $\beta$ -kateninom prije njegovog oslobađanja aktivacijom Wnt signalnog puta (271,296,297). EMT inducirana putem TGF- $\beta$  smanjuje translaciju Cx43 bez obzira na razinu mRNA, ali se produžava njegovo vrijeme poluživota (296), što može biti razlog njegovom nakupljanju. Zapravo, ovaj kompleksni mehanizam ključan u upalnim procesima i cijeljenju rana još uvijek se istražuje. Današnje

spoznaje naglašavaju važnu funkciju tumorske strome u progresiji karcinoma. Štoviše, remodeliranje tumorske strome najvjerojatnije je ključno za njegovu invaziju. Još uvijek ostaje nejasno iz kojeg smjera potječe primarni signal. Remodeliraju li karcinomi staničnu membranu te je permeabiliziraju što omogućava transport iona  $Ca^{++}$  u stanicu ili iz okoline dolaze razni čimbenici koji potiču te procese u stanici? Je li hipoksija nastala zbog rasta i diobe karcinomskih stanica uzrok daljnjim procesima? Kao što smo već ranije spomenuli, tumorsku stromu velikom većinom čine CAF sa zadaćom održavanja okoliša povoljnog za rast karcinoma. CAF moduliraju mikrookoliš prvenstveno izlučivanjem raznih autokrinih i parakrinih citokina i drugih čimbenika kritičnih za proliferaciju tumorskih stanica, angiogenezu, invaziju, upalu, metastaziranje i rezistenciju na lijekove (295). Ti čimbenici uključuju različite čimbenike rasta, citokine i kemokine, poput epidermalnog čimbenika rasta, čimbenika rasta hepatocita, vaskularnog endotelnog čimbenika rasta, interleukine, a ključni su i proizvođači MMP-a te tako igraju važnu ulogu u moduliranju mikrookruženja što u konačnici rezultira promocijom invazivnog fenotipa stanica raka. Morfološki su slične mezenhimalnim stanicama i izražavaju neke od mezenhimalnih biljega ( $\alpha$ -glatkomišićni aktin, protein za aktivaciju fibroblasta, protein specifičan za fibroblast-1, receptor faktora rasta iz trombocita  $\alpha/\beta$  i vimentin). CAF nastaju mezenhimalnom tranzicijom različitih stanica (matičnih stanica, zaostalih fibroblasta ili pericita, endotelnih stanica i epitelnih stanica, adipocita). Tang je već ranije pokazao da je Cx43 potreban stanicama karcinoma želuca koje žele migrirati kroz mezenhimalni okoliš (221).

Zanimljivo je da sve više istraživanja utvrđuje određenu ulogu Cx43 i NEDD9 u procesu nastanka i progresije malignih bolesti. Za sada ne postoji ciljana terapija za niti jedan od ova dva proteina u liječenju maligniteta bilo kojeg sijela. Obzirom da NEDD9 nema katalitičku domenu već je samo „nosač“ za druge proteine teže je pronaći terapijsku opciju. Postoje neka istraživanja koja pokazuju da utišavanje gena unošenjem male

interferirajuće RNA (siRNA), odnosno snižavanje razine proteina NEDD9, smanjuje invazivni potencijal karcinoma, ali najveći problem nastaje u načinu transporta i unošenja siRNA u ciljanu stanicu (298). Osim toga, vitamin D štiti stanice od EMT i obnavlja E-kadherin (292), blokiranjem TGF- $\beta$  suprimira Wnt signalni put i poništava EMT (292), a tretiranje stanica s inhibitorom ERK kinaze također dovodi do obnavljanja E-kadherina (236). Također neki radovi pokazuju učinak terapije inhibitorima proteina Aurora A (alisertib) na sniženje razine NEDD9, kao i moguća primjena inhibitora FAK i Src (290). Razvoj ciljane terapije na Cx43 uključuje: peptidne analoge s PDZ veznom domenom Cx43; potom Carbenoxolone koji je inhibitor Cx43; pojačivače Cx43 koji podizanjem razine koneksina 43 induciraju apoptozu stanice kao npr. transretinoična kiselina i dioscin; te primjena liposomalnih nanonosaa ili onih obogaćeni cis-platinom koji uz pomoć ciljanih monoklonskih protutijela inhibiraju vanstaničnu petlju Cx43 (199).

Na kraju možemo zaključiti da jača izraženost Cx43 i NEDD9 u našem istraživanju ukazuje na agresivniji fenotip karcinomima želuca. Štoviše, istovremena izraženost oba proteina odvaja bolesnike s izuzetno lošim preživljenjem, odnosno, bolesnici čiji karcinomi ne pokazuju imunohistokemijsku izraženost ovih proteina imaju daleko bolje preživljenje. Obzirom da naši rezultati pokazuju neovisnu prediktivnu vrijednost oba proteina, daljnja istraživanja trebalo bi nastaviti na metastatskim sjelima karcinoma želuca kako bismo dobili precizniju sliku procesa progresije maligne bolesti. To bi ujedno moglo doprinijeti potvrdi kako ova dva proteina mogu biti mete ciljane terapije, a možda istovremena blokada obaju proteina može postići bolju supresiju proliferacije i invazivnog potencijala karcinoma želuca.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Karcinomi želuca slabije izražavaju Cx43 u epitelu tumora, a jače u tumorskoj stromi.
2. Karcinomi želuca s metastazama u limfne čvorove statistički značajno jače izražavaju Cx43 u epitelu tumora nego karcinomi bez metastaza ( $P=0,047$ ).
3. Izraženost Cx43 u stromi tumora u korelaciji je s većim tumorom, dubljim prodorom u stijenu želuca (pT) te višim kliničkim stadijem bolesti.
4. Bolesnici s Cx43 izraženim u epitelu tumora imaju loše dvogodišnje preživljenje.
5. NEDD9 je izražen u dvije trećine karcinoma želuca u epitelu tumora kao i tumorskoj stromi, s međusobno statistički značajnom korelacijom.
6. Izraženost NEDD9 u epitelu i stromi tumora u korelaciji je s većim tumorom, dubljim prodorom u stijenu želuca (pT) i višim kliničkim stadijem bolesti te prisutnošću perineuralne invazije.
7. Bolesnici s izraženim NEDD9 u karcinomu imaju lošije preživljenje u odnosu na one koji nemaju izražen NEDD9, što dodatno dolazi do izražaja kod bolesnika bez metastaza u limfne čvorove.
8. Istovremeno negativni Cx43 i NEDD9 u epitelu tumora pokazatelj su dobrog preživljenja bolesnika.
9. Analizom višestruke regresije utvrdili smo da su izraženost Cx43 i NEDD9 u epitelnim stanicama karcinoma, uz T i N stadij bolesti, neovisni prognostički pokazatelji preživljenja bolesnika s karcinomom želuca.



## 8. SAŽETAK

Najvažnije karakteristike karcinoma želuca su invazivnost i veliki metastatski potencijal. Sve je više dokaza da koneksini koji izgrađuju međustanična pukotinasta spojišta i NEDD9 protein igraju važnu ulogu u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji i metastaziranju tumora različitih sijela. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti i usporediti imunohistokemijsku izraženost koneksina 43 (Cx43) i NEDD9 u 108 uzoraka primarnog adenokarcinoma želuca (53 bez metastaza i 55 s metastazama u limfne čvorove) te korelirati njihovu izraženost s različitim kliničkim i patohistološkim parametrima. U našem istraživanju većina karcinoma nije izražavala Cx43 u epitelnoj komponenti, dok je u stromi pokazala veću izraženost ( $P < 0,001$ ). Izraženost Cx43 u stromi korelirala je s višim stadijem bolesti ( $P = 0,03$ ) i veličinom tumora ( $P = 0,002$ ). Većina karcinoma izražavala je NEDD9 istovremeno u epitelnoj i stromalnoj komponenti karcinoma. Izraženost NEDD9 bila je u značajnoj korelaciji s veličinom tumora ( $P = 0,001$ ), perineuralnom invazijom ( $P = 0,049$ ) te kliničkim stadijem bolesti ( $P < 0,001$ ). Neovisni loši prognostički čimbenici bili su jaka izraženost Cx43 u epitelu (HR 1.55, 95% CI 1.00 - 2.38,  $P = 0.048$ ), jaka izraženost NEDD9 u epitelu (HR 6.85, 95% CI 2.36 - 19.88,  $P < 0.001$ ) te viši T status (HR 1.54, 95% CI 1.07 - 2.20,  $P = 0.019$ ) i viši N status (HR 1.63, 95% CI 1.29 - 2.08,  $P < 0.001$ ). Potrebna su daljnja istraživanja na većem uzorku karcinoma želuca i njihovim metastatskim sijelima kako bi se potvrdio prognostički značaj Cx43 i NEDD9.

**Ključne riječi:** karcinom želuca, koneksin 43, NEDD9, preživljenje

## 9. SUMMARY

### **Immunohistochemical expression of connexin 43 and NEDD9 in gastric cancer**

**Ivan Lerotić, Zagreb 2021**

Invasive growth and metastatic potential are considered to be the most important features of gastric cancer. Growing evidence suggests that connexins, who form intercellular gap junctions, and NEDD9 protein have an important role in epithelial-mesenchymal transition and metastasis of cancer of various primary sites. Aim of this study was to determine and correlate immunohistochemical expression of connexin 43 (Cx43) and NEDD9 in 108 samples of gastric adenocarcinoma (53 without and 55 with lymph node involvement) with various clinical and pathohistological parameters.

According to our results, most cancers didn't express Cx43 in cancer cells but demonstrated expression in the stroma ( $P < 0.001$ ). Stromal Cx43 expression correlated both with higher disease stage ( $P = 0.03$ ) and size of the tumor ( $P = 0.002$ ). Most cancers expressed NEDD9 simultaneously in epithelial and stromal component. NEDD9 expression correlated with tumor size ( $P = .001$ ), perineural invasion ( $P = .049$ ) and clinical disease stage ( $P < .001$ ). Increased epithelial Cx43 expression (HR 1.55, 95%CI 1.00 - 2.38,  $P = 0.048$ ), increased epithelial NEDD9 expression (HR 6.85, 95% CI 2.36 - 19.88,  $P < 0.001$ ), advanced T status (HR 1.54, 95% CI 1.07 - 2.20,  $P = 0.019$ ) and advanced N status (HR 1.63, 95% CI 1.29 - 2.08,  $P < 0.001$ ) were identified to be independent predictors of poor prognosis. These findings warrant further investigation in larger cohorts of patients with gastric cancer and various metastatic sites.

**Keywords:** gastric cancer, connexin 43, NEDD9, overall survival

## 10. LITERATURA

1. Lindsay J, Langmead L, Preston SL. Gastrointestinal disease. U: Kumar P, Clark M. *Clinical Medicine*. 9. izd. Edinburgh: Elsevier Ltd; 2017. Str. 357-436.
2. Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R. *Waldeyerova anatomija čovjeka*. 17 izd. Zagreb: Golden Marketing - tehnička knjiga; 2009.
3. Semrin MG. Anatomy, histology, and developmental anomalies of the stomach and duodenum. U: Feldman M, Friedman L, Brandt L, Chung R, Rubin D, Wilcox C, ur. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 11. izd. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2020. Str. 720–34.
4. De Hertogh G, Van Eyken P, Ectors N, Tack J, Geboes K. On the existence and location of cardiac mucosa: An autopsy study in embryos, fetuses, and infants. *Gut*. 2003;52(6):791–6.
5. Schubert ML, Kaunitz JD. Gastric secretion. U: Feldman M, Friedman L, Brandt L, Chung R, Rubin D, Wilcox C, ur. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 11. izd. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2020. Str. 764–81.
6. Bhutta ZA, Sadiq K. Protein Digestion and Bioavailability. U: *Encyclopedia of Human Nutrition*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2012. Str. 116–22.
7. Malvezzi M, Bonifazi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Decarli A, i sur. An age-period-cohort analysis of gastric cancer mortality from 1950 to 2007 in Europe. *Ann Epidemiol*. 2010;20(12):898–905.
8. Stomach Cancer — Cancer Stat Facts. [Internet]. Pristupljeno: 12.09.2020. Dostupno na: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>
9. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87–108.
10. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893–917.
11. Arnold M, Ferlay J, Van Berge MI, Soerjomataram I. Global burden of oesophageal and gastric cancer by histology and subsite in 2018. *Gut*. 2020;69:1564–71.
12. McMichael AJ, McCall MG, Hartshore JM, Woodings TL. Patterns of gastrointestinal cancer in european migrants to Australia: The role of dietary change. *Int J Cancer*. 1980;25(4):431–7.
13. Quante M, Bornschein J. Adenocarcinoma of the Stomach and Other Gastric Tumors. U: *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 11. izd. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2020. Str. 820–41.
14. Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg Oncol Clin N Am*; 2002;11:235–56.
15. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA J Am Med Assoc*. 1991;265(10):1287–9.

16. Abdi-Rad A, Ghaderi-sohi S, Nadimi-Barfroosh H, Emami S. Trend in incidence of gastric adenocarcinoma by tumor location from 1969-2004; a study in one referral center in Iran. *Diagn Pathol.* 2006;1(1):5.
17. El-Serag HB, Mason AC, Petersen N, Key CR. Epidemiological differences between adenocarcinoma of the oesophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA. *Gut.* 2002;50(3):368–72.
18. Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Veltruski J, Glibo M, Stavinoha M, i sur. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017.[Internet] Hrv zavod za javno Zdravstvo 2020. Pristupljeno 26.8.2020. Dostupno na <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2017-final.pdf>.
19. Etemadi A, Safiri S, Sepanlou SG, Ikuta K, Bisignano C, Shakeri R, i sur. The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(1):42–54.
20. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31–49.
21. Chen YC, Fang WL, Wang RF, Liu CA, Yang MH, Lo SS, i sur. Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2016;22(1):197–202.
22. Laurén PA, Nevalainen TJ. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma a time-trend study in finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer.* 1993;71(10):2926–33.
23. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, i sur. Gastric Precancerous Process in a High Risk Population: Cohort Follow-up. *Cancer Res.* 1990;50(15):4737-40.
24. Muñoz N, Matko I. Histological types of gastric cancer and its relationship with intestinal metaplasia. *Recent Results Cancer Res.* 1972;39:99–105.
25. 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.
26. Lee CW, Rickman B, Rogers AB, Ge Z, Wang TC, Fox JG. Helicobacter pylori eradication prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice. *Cancer Res.* 2008;68(9):3540–8.
27. Cai X, Carlson J, Stoicov C, Li H, Wang TC, Houghton J. Helicobacter felis eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology.* 2005;128(7):1937–52.
28. Koeppl M, Garcia-Alcalde F, Glowinski F, Schlaermann P, Meyer TF. Helicobacter pylori infection causes characteristic DNA damage patterns in human cells. *Cell Reports.* 2015;11:1703–13.
29. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Siu HC, Leung SY, Stratton MR. A mutational signature in gastric cancer suggests therapeutic strategies. *Nat Commun.* 2015;6:8683.

30. Quante M, Bhagat G, Abrams JA, Marache F, Good P, Lee MD, i sur. Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of barrett-like metaplasia. *Cancer Cell*. 2012;21(1):36–51.
31. Weaver JMJ, Ross-Innes CS, Shannon N, Lynch AG, Forshef T, Barbera M, i sur. Ordering of mutations in preinvasive disease stages of esophageal carcinogenesis. *Nat Genet*. 2014;46(8):837–43.
32. Secrier M, Li X, De Silva N, Eldridge MD, Contino G, Bornschein J, i sur. Mutational signatures in esophageal adenocarcinoma define etiologically distinct subgroups with therapeutic relevance. *Nat Genet*. 2016;48(10):1131–41.
33. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, Takashi S, i sur. Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell*. 2011;19(2):257–72.
34. Jiang L, Gonda TA, Gamble M V., Salas M, Seshan V, Tu S, i sur. Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. *Cancer Res*. 2008;68(23):9900–8.
35. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, i sur. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202–9.
36. Kim J, Bowlby R, Mungall AJ, Robertson AG, Odze RD, Cherniack AD, i sur. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature*. 2017;541(7636):169–74.
37. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, i sur. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*. 2015;21(5):449–56.
38. Nagaraja AK, Kikuchi O, Bass AJ. Genomics and targeted therapies in gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2019;9:1656–72.
39. Scott D, Weeks D, Melchers K, Sachs G. The life and death of *Helicobacter pylori*. *Gut*. 1998;43:56-60
40. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:615–40.
41. Everhart JE. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*. 2000;29(3):559–78.
42. Amieva MR, El-Omar EM. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*. 2008;134(1):306–23.
43. Ahmed A, Smoot D, Littleton G, Tackey R, Walters CS, Kashanchi F, i sur. *Helicobacter pylori* inhibits gastric cell cycle progression. *Microbes Infect*. 2000;2(10):1159–69.
44. Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Sueoka N, Yoshida M, Wakatsuki Y, i sur. *Helicobacter pylori* membrane protein 1: a new carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. *Cancer Res*. 2001;61(17):6356–9.

45. Baik S, Youn H, Chung M, Lee W, Cho M, Ko G, i sur. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res.* 1996;56(6):1279–82.
46. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee C-W, Pang B, Borenshtein D, i sur. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2516-25.
47. Eaton KA, Mefford M, Thevenot T. The Role of T Cell Subsets and Cytokines in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Gastritis in Mice. *J Immunol.* 2001;166(12):7456–61.
48. Roth K, Kapadia S, Martin S, Lorenz R. Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. *J Immunol.* 1999;163(3):1490–7.
49. Sutton P, Kolesnikow T, Danon S, Wilson J, Adrian L. Dominant nonresponsiveness to *Helicobacter pylori* infection is associated with production of interleukin 10 but not gamma interferon. *Infect Immun.* 2000;68(8):4802–4.
50. Fox J, Sheppard B, Dangler C, Whary M, Ihrig M, Wang T. Germ-line p53-targeted disruption inhibits helicobacter-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Res.* 2002;62(3):696–702.
51. Smythies LE, Waites KB, Lindsey JR, Harris PR, Ghiara P, Smith PD. *Helicobacter pylori* -induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN- $\gamma$ , gene-deficient mice. *J Immunol.* 2000;165(2):1022–9.
52. Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN, i sur. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med.* 2000;6(5):536–42.
53. Segal I, Ally R, Mitchell H. *Helicobacter pylori*-An African perspective. *QJM - Mon J Assoc Physicians.* 2001;94(10):561–5.
54. Whary MT, Sundina N, Bravo LE, Correa P, Quinones F, Caro F, i sur. Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*: Possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(6):1464–9.
55. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, i sur. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1997;388:539–47.
56. Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest.* 2001;107:767–73.
57. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, i sur. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(25):14625–30.
58. Crabtree JE, Taylor JD, Heatley R V., Shallcross TM, Rathbone BJ, Wyatt JI, i sur. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet.* 1991;338(8763):332–5.

59. Kuipers EJ, Pérez-pérez GI, Meuwissen SGM, Blaser MJ. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: Importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(23):1777–80.
60. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995;55(10):2111-5.
61. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. *Gut.* 1997;40(3):297–301.
62. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, i sur. Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(3):1003–8.
63. Vicari JJ, Peek RM, Falk GW, Goldblum JR, Easley KA, Schnell J, i sur. The seroprevalence of cagA-positive Helicobacter pylori strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology.* 1998;115(1):50–7.
64. Ito Y, Azuma T, Ito S, Miyaji H, Hirai M, Yamazaki Y, i sur. Analysis and typing of the vacA gene from cagA-positive strains of Helicobacter pylori isolated in Japan. *J Clin Microbiol.* 1997;35(7):1710–4.
65. Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Fukuta K, Ohtani M, Ito Y, i sur. Correlation between variation of the 3' region of the cagA gene in Helicobacter pylori and disease outcome in Japan. *J Infect Dis.* 2002;186(11):1621–30.
66. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science.* 2003;301(5636):1099–102.
67. Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, i sur. Helicobacter pylori sabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science.* 2002;297(5581):573–8.
68. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Borén T, Rad R, Schepp W, i sur. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12778–83.
69. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *J Clin Path - Mol Pathol.* 2000;53:255–61.
70. Wu MS, Shun CT, Wu CC, Hsu TY, Lin MT, Chang MC, i sur. Epstein-Barr virus - Associated gastric carcinomas: Relation to H. pylori infection and genetic alterations. *Gastroenterology.* 2000;118(6):1031–8.
71. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Processed meat consumption, dietary nitrosamines and stomach cancer risk in a cohort of Swedish women. *Int J Cancer.* 2006;119(4):915–9.
72. Knekt P, Järvinen R, Dich J, Hakulinen T. Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: A follow-up study. *Int J Cancer.* 1999;80(6):852–6.

73. Jakszyn P, Bingham S, Pera G, Agudo A, Luben R, Welch A, i sur. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. *Carcinogenesis*. 2006;27(7):1497–501.
74. Van Loon AJM, Botterweck AAM, Goldbohm RA, Brants HAM, Van Klaveren JD, Van Den Brandt PA. Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: A prospective cohort study. *Br J Cancer*. 1998;78(1):129–35.
75. Zhang FX, Miao Y, Ruan JG, Meng SP, Dong J Da, Yin H, i sur. Association between nitrite and nitrate intake and risk of gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Med Sci Monit*. 2019;25:1788–99.
76. D’Elia L, Rossi G, Ippolito R, Cappuccio FP, Strazzullo P. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: A meta-analysis of prospective studies. *Clin Nutr*. 2012;31(4):489–98.
77. Fox J, Dangler C, Taylor N, King A, Koh T, Wang T. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res*. 1999;59(19):4823–8.
78. Kobayashi M, Tsubono Y, Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S. Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: A 10-year follow-up of the JPHC study cohort I. *Int J Cancer*. 2002;102(1):39–44.
79. Gonzalez CA, Lujan-Barroso L, Bueno-De-Mesquita HB, Jenab M, Duell EJ, Agudo A, i sur. Fruit and vegetable intake and the risk of gastric adenocarcinoma: A reanalysis of the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST) study after a longer follow-up. *Int J Cancer*. 2012;131(12):2910–9.
80. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Fruit and vegetable consumption and incidence of gastric cancer: A prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(10):1998–2001.
81. Ji BT, Chow WHO, Yang G, McLauchlin JK, Zheng W, Shu XO, i sur. Dietary habits and stomach cancer in Shanghai, China. *Int J Cancer*. 1998;76(5):659–64.
82. Ito LS, Inoue M, Tajima K, Yamamura Y, Kodaera Y, Hirose K, i sur. Dietary factors and the risk of gastric cancer among Japanese women: A comparison between the differentiated and non-differentiated subtypes. *Ann Epidemiol*. 2003;13(1):24–31.
83. Botterweck A, Van den Brandt P, Goldbohm R. Vitamins, carotenoids, dietary fiber, and the risk of gastric carcinoma: results from a prospective study after 6.3 years of follow-up. *Cancer*. 2000;88(4):737–48.
84. Ekström AM, Serafini M, Nyrén O, Hansson LE, Ye W, Wolk A. Dietary antioxidant intake and the risk of cardia cancer and noncardia cancer of the intestinal and diffuse types: A population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer*. 2000;87(1):133–40.
85. Trédaniel J, Boffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A. Tobacco smoking and gastric cancer: Review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 1997;72(4):565–73.
86. González CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, i sur. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2003;107(4):629–34.



87. Sung NY, Choi KS, Park EC, Park K, Lee SY, Lee AK, i sur. Smoking, alcohol and gastric cancer risk in Korean men: The National Health Insurance Corporation Study. *Br J Cancer*. 2007;97(5):700–4.
88. Sjødahl K, Lu Y, Nilsen TLL, Ye W, Hveem K, Vatten L, i sur. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: A population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer*. 2007;120(1):128–32.
89. Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, Pinheiro-Torres T, Pinto I, Santos-Pereira R, i sur. Smoking and gastric cancer: Systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control*. 2008;19(7):689–701.
90. Zendehdel K, Nyrén O, Luo J, Dickman PW, Boffetta P, Englund A, i sur. Risk of gastroesophageal cancer among smokers and users of Scandinavian moist snuff. *Int J Cancer*. 2008;122(5):1095–9.
91. Rota M, Pelucchi C, Bertuccio P, Matsuo K, Zhang Z-F, Ito H, i sur. Alcohol consumption and gastric cancer risk-A pooled analysis within the StoP project consortium. *Int J Cancer*. 2017;141(10):1950–62.
92. Han X, Xiao L, Yu Y, Chen Y, Shu HH. Alcohol consumption and gastric cancer risk: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget*. 2017;8(47):83237–45.
93. Wang PL, Xiao FT, Gong BC, Liu FN. Alcohol drinking and gastric cancer risk: A meta-analysis of observational studies. *Oncotarget*. 2017;8(58):99013–23.
94. He Z, Zhao TT, Xu HM, Wang ZN, Xu YY, Song YX, i sur. Association between alcohol consumption and the risk of gastric cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget*. 2017;8(48):84459–72.
95. Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Mouw T, Subar AF, Hollenbeck AR, i sur. A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *Am J Epidemiol*. 2007;165(12):1424–33.
96. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Alcoholic beverage consumption and gastric cancer risk: A prospective population-based study in women. *Int J Cancer*. 2007;120(2):373–7.
97. Duell EJ, Sala N, Travier N, Muñoz X, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, i sur. Genetic variation in alcohol dehydrogenase (ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH7) and aldehyde dehydrogenase (ALDH2), alcohol consumption and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC) Cohort. *Carcinogenesis*. 2012;33(2):361–7.
98. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008;371(9612):569–78.
99. Merry AHH, Schouten LJ, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA. Body mass index, height and risk of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia: A prospective cohort study. *Gut*. 2007;56(11):1503–11.
100. Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL, Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, i sur. Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(2):150–5.

101. Lindblad M, Rodríguez LAG, Lagergren J. Body mass, tobacco and alcohol and risk of esophageal, gastric cardia, and gastric non-cardia adenocarcinoma among men and women in a nested case-control study. *Cancer Causes Control*. 2005;16(3):285–94.
102. O’Doherty MG, Freedman ND, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. A prospective cohort study of obesity and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma in the NIH-AARP diet and health study. *Gut*. 2012;61(9):1261–8.
103. MacInnis RJ, English DR, Hopper JL, Giles GG. Body size and composition and the risk of gastric and oesophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2006;118(10):2628–31.
104. Kant P, Hull MA. Excess body weight and obesity-the link with gastrointestinal and hepatobiliary cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8:224–38.
105. Zanghieri G, Gregorio C Di, Sacchetti C, Fante R, Sassatelli R, Cannizzo G, i sur. Familial occurrence of gastric cancer in the 2-year experience of a population-based registry. *Cancer*. 1990;66(9):2047–51.
106. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: Genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncology*. 2015;16:e60–70.
107. Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. *Lancet*. 2016;388:2654–64.
108. Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, Cole TRP, Evans DGR, Jankowski JA, i sur. Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 1999;8(4):607–10.
109. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, i sur. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998;392(6674):402–5.
110. Shinmura K, Kohno T, Takahashi M, Sasaki A, Ochiai A, Guilford P, i sur. Familial gastric cancer: Clinicopathological characteristics, RER phenotype and germline p53 and E-cadherin mutations. *Carcinogenesis*. 1999;20(6):1127–31.
111. Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, Senz J, De Luca A, Chun N, i sur. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Am Med Assoc*. 2007;297(21):2360–72.
112. Lynch HT, Kaurah P, Wirtzfeld D, Rubinstein WS, Weissman S, Lynch JF, i sur. Hereditary diffuse gastric cancer: Diagnosis, genetic counseling, and prophylactic total gastrectomy. *Cancer*. 2008;112(12):2655–63.
113. Masciari S, Larsson N, Senz J, Boyd N, Kaurah P, Kandel MJ, i sur. Germline E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. *J Med Genet*. 2007;44(11):726–31.
114. Pharoah PDP, Guilford P, Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*. 2001;121(6):1348–53.
115. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P, Batts KP, Dahms BB, i sur. Classification and grading of Gastritis: The updated Sydney system. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(10):1161–81.

116. Lahner E, Bordi C, Cattaruzza MS, Iannoni C, Milione M, Delle Fave G, i sur. Long-term follow-up in atrophic body gastritis patients: Atrophy and intestinal metaplasia are persistent lesions irrespective of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22(5):471–81.
117. Siurala M, Lehtola J, Ihamäki T. Atrophic gastritis and its sequelae. Results of 19-23 years' follow-up examinations. *Scand J Gastroenterol.* 1974;9(5):441–6.
118. De Vries AC, Haringsma J, Kuipers EJ. The detection, surveillance and treatment of premalignant gastric lesions related to *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2007;12:1–15.
119. de Vries AC, van Grieken NCT, Looman CWN, Casparie MK, de Vries E, Meijer GA, i sur. Gastric Cancer Risk in Patients With Premalignant Gastric Lesions: A Nationwide Cohort Study in the Netherlands. *Gastroenterology.* 2008;134(4):945–52.
120. Kokkola A, Sjöblom SM, Haapiainen R, Sipponen P, Puolakkainen P, Järvinen H. The risk of gastric carcinoma and carcinoid tumours in patients with pernicious anaemia. A prospective follow-up study. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33(1):88–92.
121. Kato I, Tominaga S, Ito Y, Kobayashi S, Yoshii Y, Matsuura A, i sur. A Prospective Study of Atrophic Gastritis and Stomach Cancer Risk. *Japanese J Cancer Res.* 1992;83(11):1137–42.
122. Tatsuta M, Iishi H, Nakaizumi A, Okuda S, Taniguchi H, Hiyama T, i sur. Fundal atrophic gastritis as a risk factor for gastric cancer. *Int J Cancer.* 1993;53(1):70–4.
123. Cassaro M, Rugge M, Gutierrez O, Leandro G, Graham DY, Genta RM. Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(6):1431–8.
124. Schafer LW, Larson DE, Melton LJ, Higgins JA, Zinsmeister AR. Risk of Development of Gastric Carcinoma in Patients With Pernicious Anemia: A Population-Based Study in Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* 1985;60(7):444–8.
125. Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, i sur. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology.* 2000;118(1):36–47.
126. Watson SA, Grabowska AM, El-Zaatari M, Takhar A. Gastrin - Active participant or bystander in gastric carcinogenesis? *Nat Rev Cancer.* 2006;6:936–46.
127. Correa P, Piazuelo MB, Wilson KT. Pathology of gastric intestinal metaplasia: Clinical implications. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:493–8.
128. de Vries AC, Haringsma J, de Vries RA, ter Borg F, Nagtzaam NM, Steyerberg EW, i sur. The use of clinical, histologic, and serologic parameters to predict the intragastric extent of intestinal metaplasia: a recommendation for routine practice. *Gastrointest Endosc.* 2009;70(1):18–25.
129. Capelle LG, de Vries AC, Haringsma J, Ter Borg F, de Vries RA, Bruno MJ, i sur. The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. *Gastrointest Endosc.* 2010;71(7):1150–8.
130. Jass JR, Filipe MI. The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. *Histochem J.* 1981;13(6):931–9.

131. Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut*. 1991;32(10):1110–3.
132. Leung WK, Sung JY. Review article: Intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:1209–16.
133. Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, i sur. Gastric dysplasia: The Padova International classification. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(2):167–76.
134. Rugge M, Farinati F, Di Mario F, Baffa R, Valiante F, Cardin F. Gastric epithelial dysplasia: A prospective multicenter follow-up study from the interdisciplinary group on gastric epithelial dysplasia. *Hum Pathol*. 1991;22(10):1002–8.
135. Rugge M, Cassaro M, Di Mario F, Leo G, Leandro G, Russo VM, i sur. The long term outcome of gastric non-invasive neoplasia. *Gut*. 2003;52(8):1111–6.
136. Di Gregorio C, Morandi P, Fante R, De Gaetani C. Gastric dysplasia. A follow-up study. *Am J Gastroenterol*. 1993;88(10):1714–9.
137. Lansdown M, Quirke P, Dixon MF, Axon ATR, Johnston D. High grade dysplasia of the gastric mucosa: A marker for gastric carcinoma. *Gut*. 1990;31(9):977–83.
138. Voutilainen M, Mäntynen T, Kunnamo I, Juhola M, Mecklin JP, Färkkilä M. Impact of clinical symptoms and referral volume on endoscopy for detecting peptic ulcer and gastric neoplasms. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38(1):109–13.
139. Burt RW. Gastric Fundic Gland Polyps. *Gastroenterology*. 2003;125(5):1462–9.
140. Borch K, Skarsgård J, Franzén L, Mårdh S, Rehfeld JF. Benign gastric polyps: Morphological and functional origin. *Dig Dis Sci*. 2003;48(7):1292–7.
141. Jalving M, Koornstra JJ, Wesseling J, Boezen HM, De Jong S, Kleibeuker JH. Increased risk of fundic gland polyps during long-term proton pump inhibitor therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24(9):1341–8.
142. Zea-Iriarte WL, Sekine I, Itsuno M, Makiyama K, Naito S, Nakayama T, i sur. Carcinoma in Gastric Hyperplastic Polyps: A Phenotypic Study. *Dig Dis Sci*. 1996;41(2):377–86.
143. Attard TM, Cuffari C, Tajouri T, Stoner JA, Eisenberg MT, Yardley JH, i sur. Multicenter Experience with Upper Gastrointestinal Polyps in Pediatric Patients with Familial Adenomatous Polyposis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:681–6.
144. Kamiya T, Morishita T, Asakura H, Miura S, Munakata Y, Tsuchiya M. Long-term follow-up study on gastric adenoma and its relation to gastric protruded carcinoma. *Cancer*. 1982;50(11):2496–503.
145. Goddard AF, Badreldin R, Pritchard DM, Walker MM, Warren B. The management of gastric polyps. *Gut*. 2010;59:1270–6.
146. Hansson LE, Nyrén O, Hsing AW, Bergström R, Josefsson S, Chow WH, i sur. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med*. 1996;335(4):242–9.
147. Molloy RM, Sonnenberg A. Relation between gastric cancer and previous peptic ulcer disease. *Gut*. 1997;40(2):247–52.

148. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Winchester D, Osteen R. Cancer of the stomach: A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg.* 1993;218(5):583–92.
149. Gururatsakul M, Holloway RH, Talley NJ, Holtmann GJ. Association between clinical manifestations of complicated and uncomplicated peptic ulcer and visceral sensory dysfunction. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(6):1162–9.
150. Barkun A, Leontiadis G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. *Am J Med.* 2010;123(4):358–66.e2.
151. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *NEJM.* 1995;333:32–41.
152. Morgenstern L. The Virchow-Troisier node: A historical note. *Am J Surg.* 1979;138(5):703.
153. Graham DY, Schwartz JT, Cain GD. GFP evaluation of biopsy number in the diagnosis of esophageal and gastric carcinoma. *Gastroenterology.* 1982;82(2):228–31.
154. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. *Gastrointest Endosc.* 2003;58(6 Suppl):S3–43.
155. Yao K, Doyama H, Gotoda T, Ishikawa H, Nagahama T, Yokoi C, i sur. Diagnostic performance and limitations of magnifying narrow-band imaging in screening endoscopy of early gastric cancer: a prospective multicenter feasibility study. *Gastric Cancer.* 2014;17(4):669–79.
156. Muto M, Katada C, Sano Y, Yoshida S. Narrow band imaging: A new diagnostic approach to visualize angiogenesis in superficial neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3(7 Suppl 1):S16–20.
157. Hallinan JTPD, Venkatesh SK. Gastric carcinoma: imaging diagnosis, staging and assessment of treatment response. *Cancer Imaging.* 2013;13:212–27.
158. Kochi M, Fujii M, Kanamori N, Kaiga T, Kawakami T, Aizaki K, i sur. Evaluation of serum CEA and CA19-9 levels as prognostic factors in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2000;3(4):177–86.
159. Mihmanli M, Dilege E, Demir U, Coskun H, Eroglu T, Uysalol MD. The use of tumor markers as predictors of prognosis in gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* 2004;51(59):1544–7.
160. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours. 5 izd. Lyon: IARC publications; 2019.
161. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. *Patologija.* Zagreb. Medicinska naklada; 2017.
162. Gotoda T. Endoscopic resection of early gastric cancer: The Japanese perspective. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006;22:561–9.
163. Hu B, Hajj N El, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastroint Oncol.* 2012;3:251–61.

164. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, i sur. The vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. 2000;47(2):251–5.
165. Ajani J, In H, Sano T. *AJCC Cancer Staging Manual*. In: Amin M, ur. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8 izd. Chicago; 2017.
166. Ajani JA, D'Amico TA, Almhanna K, Bentrem DJ, Chao J, Das P, i sur. Gastric Cancer, Version 3.2016; NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Comp Canc Netw*; 2016;14:1286–312.
167. Smyth EC, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D, i sur. Gastric cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;27(5):38–49.
168. Kim SJ, Kim HH, Kim YH, Hwang SH, Lee HS, Park DJ, i sur. Peritoneal metastasis: Detection with 16- or 64 -detector row CT in patients undergoing surgery for gastric cancer. *Radiology*. 2009;253(2):407–15.
169. Vreugdenburg TD, Ma N, Duncan JK, Riitano D, Cameron AL, Maddern GJ. Comparative diagnostic accuracy of hepatocyte-specific gadoxetic acid (Gd-EOB-DTPA) enhanced MR imaging and contrast enhanced CT for the detection of liver metastases: a systematic review and meta-analysis. *Int J Colorec Dis*. 2016;31:1739–49.
170. Borggreve AS, Goense L, Brenkman HJF, Mook S, Meijer GJ, Wessels FJ, i sur. Imaging strategies in the management of gastric cancer: Current role and future potential of MRI. *Br J Radiol*. 2019;92:20181044.
171. Mansfield PF. Surgical management of invasive gastric cancer - UpToDate. [Internet]. Pristupljeno: 16.10.2020. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/surgical-management-of-invasive-gastric-cancer/print>
172. Mamon H, Enzinger PC. Adjuvant and neoadjuvant treatment of gastric cancer - UpToDate. [Internet]. Pristupljeno: 16.10.2020. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/adjuvant-and-neoadjuvant-treatment-of-gastric-cancer>
173. Longo D, Fauci A, Kasper DSH, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine: Vol. 1 i 2*, 19. izd. McGraw-Hill. New York. 2015.
174. Bourke MJ, Neuhaus H, Bergman JJ. Endoscopic Submucosal Dissection: Indications and Application in Western Endoscopy Practice. *Gastroenterology*. 2018;154(7):1887-1900.e5.
175. Rubin H. Contact Interactions Between Cells That Suppress Neoplastic Development: Can They Also Explain Metastatic Dormancy? *Adv Cancer Res*. 2008;100:159–202.
176. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:442–54.
177. Thiery JP, Chopin D. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18(1):31–42.
178. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: The “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:453–8.
179. Bennett MVL, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Sáez JC. Gap

- junctions: New tools, new answers, new questions. *Neuron*. 1991;6:305–20.
180. Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, Flora A De. Connexin 43 hemichannels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells. *FASEB J*. 2001;15(1):10–2.
  181. Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. Functional hemichannels in astrocytes: A novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci*. 2003;23(9):3588–96.
  182. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, i sur. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: A novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell*. 2005;16(7):3100–6.
  183. Kandouz M, Batist G. Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2010;14:681–92.
  184. Yeager M, Harris AL. Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19:521–8.
  185. Shibata Y, Kumai M, Nishii K, Nakamura K. Diversity and molecular anatomy of gap junctions. Vol. 34, *Medical Electron Microscopy*. 2001. p. 153–9.
  186. Scemes E, Spray DC, Meda P. Connexins, pannexins, innexins: Novel roles of “hemichannels.” *Pflugers Arch*. 2009;457:1207–26.
  187. Maeda S, Nakagawa S, Suga M, Yamashita E, Oshima A, Fujiyoshi Y, i sur. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature*. 2009;458(7238):597–602.
  188. Sáez JC, Berthoud VM, Brañes MC, Martínez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions. *Physiological Rev*. 2003;83:1359–400.
  189. Solan JL, Lampe PD. Connexin43 phosphorylation: Structural changes and biological effects. *Biochem J*; 2009;419:261–72.
  190. Lodish H, Berk A, Zipursky S. Second Messengers. In: *Molecular Cell Biology*. 4 izd. New York: WH Freeman; 2000. str. 436–81.
  191. Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci*; 2005,6:191–200.
  192. Morley GE, Taffet SM, Delmar M. Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys J*. 1996;70(3):1294–302.
  193. Delmar M, Coombs W, Sorgen P, Duffy HS, Taffet SM. Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovasc Res*. 2004;62:268–75.
  194. Thimm J, Mechler A, Lin H, Rhee S, Lal R. Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels. *J Biol Chem*. 2005;280(11):10646–54.
  195. Gomes P, Srinivas SP, Van Driessche W, Vereecke J, Himpens B. ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(4):1208–18.
  196. Retamal MA, Schalper KA, Shoji KF, Orellana JA, Bennett MVL, Sáez JC. Possible

- involvement of different connexin43 domains in plasma membrane permeabilization induced by ischemia-reperfusion. *J Membr Biol*; 2007;218:49–63.
197. Retamal MA, Schalper KA, Shoji KF, Bennett MVL, Sáez JC. Opening of connexin 43 hemichannels is increased by lowering intracellular redox potential. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(20):8322–7.
  198. Homma N, Alvarado JL, Coombs W, Stergiopoulos K, Taffet SM, Lau AF, i sur. A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin 43 channels. *Circ Res*. 1998 Jul;83(1):27–32.
  199. Bonacquisti EE, Nguyen J. Connexin 43 (Cx43) in cancer: Implications for therapeutic approaches via gap junctions. *Cancer Lett*. 2019;442:439–44.
  200. Wei CJ, Xu X, Lo CW. Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:811–38.
  201. Pointis G, Fiorini C, Gilleron J, Carette D, Segretain D. Connexins as precocious markers and molecular targets for chemical and pharmacological agents in carcinogenesis. *Curr Med Chem*. 2007;14(21):2288–303.
  202. Zhang YW, Kaneda M, Morita I. The Gap Junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem*. 2003;278(45):44852–6.
  203. Nishitani A, Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Hashimoto K, Nakagomi N, i sur. Differential expression of connexin 43 in gastrointestinal stromal tumours of gastric and small intestinal origin. *J Pathol*. 2005;206(4):377–82.
  204. Pahuja M, Anikin M, Goldberg GS. Phosphorylation of connexin 43 induced by Src: Regulation of gap junctional communication between transformed cells. *Exp Cell Res*. 2007;313(20):4083–90.
  205. Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, Tanaka T, Zaidan-Dagli ML, Omori Y. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *Comptes Rendus l'Academie des Sci - Ser III*. 1999;322(2–3):151–9.
  206. Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Dotto GP. The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol Cell Biol*. 1991;11(10):5364–71.
  207. Leithe E, Rivedal E. Epidermal growth factor regulates ubiquitination, internalization and proteasome-dependent degradation of connexin 43. *J Cell Sci*; 2004;117:211–20.
  208. Tai MH, Upham BL, Olson LK, Tsao MS, Reed DN, Trosko JE. Cigarette smoke components inhibited intercellular communication and differentiation in human pancreatic ductal epithelial cells. *Int J Cancer*. 2007;120(9):1855–62.
  209. Peterson-Roth E, Brdlik CM, Glazer PM. Src-Induced Cisplatin resistance mediated by cell-to-cell communication. *Cancer Res*. 2009;69(8):3619–24.
  210. Laird D, Fistouris P, Batist G, Al E. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res*. 1999;59(16):4104–10.
  211. Fernstrom MJ, Koffler LD, Abou-Rjaily G, Boucher PD, Shewach DS, Ruch RJ. Neoplastic reversal of human ovarian carcinoma cells transfected with Connexin43. *Exp Mol Pathol*. 2002;73(1):54–60.



212. Tsai H, Werber J, Davia MO, Edelman M, Tanaka KE, Melman A, i sur. Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;227(1):64–9.
213. Forster T, Rausch V, Zhang Y, Isayev O, Heilmann K, Schoensiegel F, i sur. Sulforaphane counteracts aggressiveness of pancreatic cancer driven by dysregulated Cx43-mediated gap junctional intercellular communication. *Oncotarget.* 2014;5(6):1621-34.
214. Radulović P, Krušlin B. Immunohistochemical expression of NEDD9, E-cadherin and  $\gamma$ -catenin and their prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Bosn J Basic Med Sci.* 2018;18(3):246-51.
215. McLachlan E, Shao Q, Wang HL, Langlois S, Laird DW. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. *Cancer Res.* 2006;66(20):9886–94.
216. Qin H, Shao Q, Curtis H, Galipeau J, Belliveau DJ, Wang T, i sur. Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. *J Biol Chem.* 2002;277(32):29132–8.
217. Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1719:125-45.
218. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: A myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal.* 2009;7:4.
219. Elzarrad MK, Haroon A, Willecke K, Dobrowolski R, Gillespie MN, Al-Mehdi AB. Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. *BMC Med.* 2008;6:20. doi:10.1186/1741-7015-6-20
220. Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, Koda M, Wincewicz A, Baltaziak M, i sur. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006;59(4):429–33.
221. Tang B, Peng Z hong, Yu P wu, Yu G, Qian F, Zeng D zhu, i sur. Aberrant expression of Cx43 is associated with the peritoneal metastasis of gastric cancer and Cx43-mediated gap junction enhances gastric cancer cell diapedesis from peritoneal mesothelium. *PLoS One.* 2013;8(9):e74527. doi: 10.1371/journal.pone.0074527
222. Tang B, Peng ZH, Yu PW, Yu G, Qian F. Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes. *Med Oncol.* 2011;28(2):502-8.
223. Kamibayashi Y, Oyamada Y, Mori M, Oyamada M. Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo. *Carcinogenesis.* 1995;16(6):1287-97.
224. Pollmann MA, Shao Q, Laird DW, Sandig M. Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast Cancer Res.* 2005;7(4):R522-34.
225. Wu J, Zhou HF, Wang CH, Zhang B, Liu D, Wang W, i sur. Decreased expression of Cx32 and Cx43 and their function of gap junction intercellular communication in gastric

- cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2007;29(10):742-7.
226. Tikhmyanova N, Little JL, Golemis EA. CAS proteins in normal and pathological cell growth control. *Cell Mol Life Sci*; 2010;67:1025-48.
  227. Singh MK, Cowell L, Seo S, O'Neill GM, Golemis EA. Molecular basis for HEF1/NEDD9/Cas-L action as a multifunctional co-ordinator of invasion, apoptosis and cell cycle. *Cell Biochem Biophys*; 2007;48:54-72.
  228. Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, i sur. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med*. 2003;24(4-5):219-30.
  229. Singh MK, Dadke D, Nicolas E, Serebriiskii IG, Apostolou S, Canutescu A, i sur. A novel Cas family member, HEPL, regulates FAK and cell spreading. *Mol Biol Cell*. 2008;19(4):1627-36.
  230. Minegishi M, Tachibana K, Sato T, Iwata S, Nojima Y, Morimoto C. Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate- related protein that is involved in  $\beta$ 1 integrin-mediated signaling in lymphocytes. *J Exp Med*. 1996;184(4):1365-75.
  231. Law SF, O'Neill GM, Fashena SJ, Einarson MB, Golemis EA. The Docking Protein HEF1 Is an Apoptotic Mediator at Focal Adhesion Sites. *Mol Cell Biol*. 2000;20(14):5184-95.
  232. Pugacheva EN, Golemis EA. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol*. 2005;7(10):937-46.
  233. Izumchenko E, Singh MK, Plotnikova O V., Tikhmyanova N, Little JL, Serebriiskii IG, i sur. NEDD9 promotes oncogenic signaling in mammary tumor development. *Cancer Res*. 2009;69(18):7198-206.
  234. Hong SM, Li A, Olino K, Wolfgang CL, Herman JM, Schlick RD, i sur. Loss of E-cadherin expression and outcome among patients with resectable pancreatic adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2011;24(9):1237-47.
  235. Li Y, Bavarva JH, Wang Z, Guo J, Qian C, Thibodeau SN, i sur. HEF1, a novel target of Wnt signaling, promotes colonic cell migration and cancer progression. *Oncogene*. 2011;30(23):2633-43.
  236. Kong C, Wang C, Wang L, Ma M, Niu C, Sun X, i sur. NEDD9 is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes invasion in aggressive breast cancer. *PLoS One*. 2011;6(7):e22666. DOI: 10.1371/journal.pone.0022666
  237. Guerrero MS, Parsons JT, Bouton AH. Cas and NEDD9 contribute to tumor progression through dynamic regulation of the cytoskeleton. *Genes and Cancer*. 2012;3(5-6):371-81.
  238. Barrett A, Pellet-Many C, Zachary IC, Evans IM, Frankel P. P130Cas: A key signalling node in health and disease. *Cell Signal*. 2013;25:766-77.
  239. National Institute for Health and Care Excellence, NICE. [Internet]. Pristupljeno: 08.11.2020. Dostupno na: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng151>
  240. Gu Y, Lu J, Chen C, Zheng F. NEDD9 overexpression predicts poor prognosis in solid cancers: A meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*. 2019;12:4213-22.

241. Donninger H, Bonome T, Radonovich M, Pise-Masison CA, Brady J, Shih JH, i sur. Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. *Oncogene*. 2004;23(49):8065–77.
242. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, i sur. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005;436(7050):518–24.
243. Štajduhar E, Sedić M, Leniček T, Radulović P, Kerenji A, Krušlin B, i sur. Expression of growth hormone receptor, plakoglobin and NEDD9 protein in association with tumour progression and metastasis in human breast cancer. *Tumor Biol*. 2014;35(7):6425–34.
244. Sima N, Cheng X, Ye F, Ma D, Xie X, Lü W. The Overexpression of Scaffolding Protein NEDD9 Promotes Migration and Invasion in Cervical Cancer via Tyrosine Phosphorylated FAK and SRC. *PLoS One*. 2013;8(9):e74594. doi: 10.1371/journal.pone.0074594.
245. Morimoto K, Tanaka T, Nitta Y, Ohnishi K, Kawashima H, Nakatani T. NEDD9 crucially regulates TGF- $\beta$ -triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: Involvement in cancer progressiveness. *Prostate*. 2014;74(8):901–10.
246. Chang JX, Gao F, Zhao GQ, Zhang GJ. Role of NEDD9 in invasion and metastasis of lung adenocarcinoma. *Exp Ther Med*. 2012;4(5):795–800.
247. Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichihara H, Kichikawa Y, i sur. Impact of the integrin signaling adaptor protein NEDD9 on prognosis and metastatic behavior of human lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(22):6326–38.
248. Miao Y, Li AL, Wang L, Fan CF, Zhang XP, Xu HT, i sur. Overexpression of NEDD9 is associated with altered expression of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and N-cadherin and predictive of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Pathol Oncol Res*. 2013;19(2):281–6.
249. Xue YZ, Sheng YY, Liu ZL, Wei ZQ, Cao HY, Wu YM, i sur. Expression of NEDD9 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its clinical significance. *Tumor Biol*. 2013;34(2):895–9.
250. Jurčić P, Radulović P, Balja MP, Milošević M, Krušlin B. E-cadherin and NEDD9 expression in primary colorectal cancer, metastatic lymph nodes and liver metastases. *Oncol Lett*. 2019;17(3):2881–9.
251. Kim M, Gans JD, Nogueira C, Wang A, Paik JH, Feng B, i sur. Comparative Oncogenomics Identifies NEDD9 as a Melanoma Metastasis Gene. *Cell*. 2006;125(7):1269–81.
252. Natarajan M, Stewart JE, Golemis EA, Pugacheva EN, Alexandropoulos K, Cox BD, i sur. HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene*. 2006;25(12):1721–32.
253. Iwata S, Souta-Kuribara A, Yamakawa A, Sasaki T, Shimizu T, Hosono O, i sur. HTLV-I Tax induces and associates with Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L). *Oncogene*. 2005;24(7):1262–71.
254. Simpson KJ, Selfors LM, Bui J, Reynolds A, Leake D, Khvorova A, i sur. Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nat*

Cell Biol. 2008;10(9):1027–38.

255. Ostojić J, Brčić L, Hrabač P, Seiwerth S. Expression of NEDD9 in transbronchial biopsies of lung adenocarcinoma. *Acta Clin Croat.* 2018;57(2):251–6.
256. Ledinsky Opačić I, Gršić K, Šitić S, Penavić I, Pastorčić Grgić M, Šarčević B. Positive expression of NEDD9 in head nad neck cancer is related to better survival period. *Acta Clin Croat.* 2019;58(4):655–61.
257. Shi R, Wang L, Wang T, Xu J, Wang F, Xu M. NEDD9 overexpression correlates with the progression and prognosis in gastric carcinoma. *Med Oncol.* 2014;31(3):852. DOI: 10.1007/s12032-014-0852-4.
258. Zhang Q, Wang H, Ma Y, Zhang J, He X, Ma J, i sur. Overexpression of Nedd9 is a prognostic marker of human gastric cancer. *Med Oncol.* 2014;31(7):33. DOI: 10.1007/s12032-014-0033-5.
259. Feng J, Zhao J, Xie H, Yin Y, Luo G, Zhang J, i sur. Involvement of NEDD9 in the invasion and migration of gastric cancer. *Tumor Biol.* 2015;36(5):3621–8.
260. Zhang S Sen, Wu LH, Liu Q, Chen KS, Zhang XF. Elevated expression of NEDD9 is associated with metastatic activity in gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 2015;8:633–40.
261. Zhang S, Wu L, Liu Q, Chen K, Zhang X. Impact on growth and invasion of gastric cancer cell lines by silencing NEDD9. *Onco Targets Ther.* 2015;8:223–31.
262. GJA1 protein expression summary - The Human Protein Atlas. [Internet]. Pristupljeno: 31.10.2020. Dostupno na: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000152661-GJA1>
263. Maes M, Cogliati B, Crespo Yanguas S, Willebrords J, Vinken M. Roles of connexins and pannexins in digestive homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(15):2809–21.
264. Maes M, Crespo Yanguas S, Willebrords J, Cogliati B, Vinken M. Connexin and pannexin signaling in gastrointestinal and liver disease. *Transl Res.* 2015;16:332–43.
265. Tanaka T, Kimura M, Ishiguro H, Mizoguchi K, Takeyama H. Connexin 43 expression is associated with poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol.* 2016;4(6):989–93.
266. Mesnil M, Aasen T, Boucher J, Chépiéd A, Cronier L, Defamie N, i sur. An update on minding the gap in cancer. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2018;1860:237–43.
267. Hernández-Guerra M, Hadjihambi A, Jalan R. Gap junctions in liver disease: Implications for pathogenesis and therapy. *J Hepatol.* 2019;70(4):759–72.
268. Naser Al Deen N, AbouHaidar M, Talhouk R. Connexin43 as a tumor suppressor: proposed Connexin43 mRNA-circularRNAs-microRNAs axis towards prevention and early detection in breast cancer. *Frontiers Med.* 2019;6:192.
269. Wu JI, Wang LH. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. *J Biomed Sci.* 2019;26:8.
270. Yeh ES, Williams CJ, Williams CB, Bonilla IV, Klauber-DeMore N, Phillips SL. Dysregulated connexin 43 in HER2-positive drug resistant breast cancer cells enhances proliferation and migration. *Oncotarget.* 2017;8(65):109358–69.

271. Wu J-I, Wang L-H. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):1–14.
272. Chasampalioti M, Green AR, Ellis IO, Rakha EA, Jackson AM, Spendlove I, i sur. Connexin 43 is an independent predictor of patient outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;174(1):93–102.
273. Grek CL, Rhett JM, Bruce JS, Ghatnekar GS, Yeh ES. Connexin 43, breast cancer tumor suppressor: Missed connections? *Cancer Letters.* 2016;374:117–26.
274. Jukic Z, Radulovic P, Stojković R, Mijic A, Grah J, Kruslin B, i sur. Gender difference in distribution of estrogen and androgen receptors in intestinal-type gastric cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(1):197–202.
275. Radić J, Krušlin B, Šamija M, Ulamec M, Milošević M, Jazvić M, i sur. Connexin 43 expression in primary colorectal carcinomas in patients with stage III and IV disease. *Anticancer Res.* 2016;36(5):2189–96.
276. Luo M, Luo Y, Mao N, Huang G, Teng C, Wang H, i sur. Cancer-associated fibroblasts accelerate malignant progression of non-small cell lung cancer via connexin 43-formed unidirectional gap junctional intercellular communication. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(1):315–36.
277. Zhang X, Sun Y, Wang Z, Huang Z, Li B, Fu J. Up-regulation of connexin-43 expression in bone marrow mesenchymal stem cells plays a crucial role in adhesion and migration of multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(1):211–8.
278. NEDD9 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. Pristupljeno 01.11.2020. Dostupno na: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111859-NEDD9>
279. Tang Z. Effects of human enhancer of filamentation 1 (HEF1) gene on the proliferation, invasion and metastasis of bladder cancer cells. *J BUON.* 2018;23(3):782–6.
280. Gao, J; Hu, S; Fang Y. Relationship Between the Expression of NEDD 9 in Gastric Cancer and the Invasion and Metastasis of the Tumor. *Anal Quant Cytopathol histopathology.* 2017;39:247-53.
281. Liu Y, Wang D, Zhao KL, Zhu JW, Yin HB, Wei YZ, i sur. NEDD9 overexpression correlates with poor prognosis in gastric cancer. *Tumor Biol.* 2014;35(7):6351–6.
282. Kumar GP, Krishna V, Prabahkar BT. Differential genotypical expression of a NEDD9 in normal and tumor tissues: a possible pharmacological target. *Int J Basic Clin Pharmacol.* 2018;7(3):423-8.
283. Manegold P, Taukert J, Neeff H, Fichtner-Feigl S, Thomusch O. The minimum distal resection margin in rectal cancer surgery and its impact on local recurrence - A retrospective cohort analysis. *Int J Surg.* 2019;69:77–83.
284. Meng H, Wu J, Huang Q, Yang X, Yang K, Qiu Y, i sur. NEDD9 promotes invasion and migration of colorectal cancer cell line HCT116 via JNK/EMT. *Oncol Lett.* 2019;18(4):4022–9.
285. Xue YZ, Wu TL, Dai YY, Sheng YY, Wu YM, Xia BL, i sur. NEDD9 expression is correlated with epithelial-to-mesenchymal transition markers in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2017;10(8):8640–6.
286. Erturk K, Tas F, Serilmez M, Bilgin E, Duranyildiz D. Significance of serum neural

- precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 9 in melanoma. [Internet]. *Mol Clin Oncol*. 2018;8(1):204-8.
287. Afsar CU, Karabulut M, Karabulut S, Ozal ST, Cikot M, Serilmez M, i sur. Clinical significance of serum NEDD9 levels in patients with pancreatic cancer. *Biomolecules*. 2018;8(4):169.
  288. Karabulut M, Alis H, Afsar CU, Karabulut S, Kocatas A, Oguz H, i sur. Serum neural precursor cell-expressed, developmentally down regulated 9 (NEDD9) level may have a prognostic role in patients with gastric cancer. *Biomed Pharmacother*. 2015;73:140–6.
  289. Arslan E, Aral H, Aksoy T, Afşar ÇU, Karabulut S, Trabulus FDC, i sur. Comparison of serum NEDD-9, CA 15-3, and CEA levels and PET metabolic parameters in breast cancer patients with 18 F-FDG PET/CT. *Rev Assoc Med Bras*. 2020;66(5):673–9.
  290. Shagisultanova E, Gaponova A V., Gabbasov R, Nicolas E, Golemis EA. Preclinical and clinical studies of the NEDD9 scaffold protein in cancer and other diseases. *Gene*. 2015;567:1–11.
  291. Gabbasov R, Xiao F, Howe CG, Bickel LE, O'Brien SW, Benrubi D, i sur. NEDD9 promotes oncogenic signaling, a stem/mesenchymal gene signature, and aggressive ovarian cancer growth in mice. *Oncogene*. 2018;37(35):4854–70.
  292. Sari E, Oztay F, Tasci AE. Vitamin D modulates E-cadherin turnover by regulating TGF- $\beta$  and Wnt signalings during EMT-mediated myofibroblast differentiation in A459 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020;202:105723. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2020.105723.
  293. Semelakova M, Grauzam S, Betadthunga P, Tiedeken J, Coaxum S, Neskey DM, i sur. Vimentin and non-muscle myosin IIA are members of the neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 9 (NEDD9) interactome in Head and neck squamous cell carcinoma cells. *Transl Oncol*. 2019 1;12(1):49–61.
  294. Grauzam S, Brock AM, Holmes CO, Tiedeken JA, Boniface SG, Pierson BN, i sur. NEDD9 stimulated MMP9 secretion is required for invadopodia formation in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(39):25503–16.
  295. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Mol Cancer*. 2019;18(1):1–24.
  296. James CC, Zeitz MJ, Calhoun PJ, Lamouille S, Smyth JW. Altered translation initiation of Gjal limits gap junction formation during epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*. 2018;29(7):797–808.
  297. Hou X, Khan MRA, Turmaine M, Thrasivoulou C, Becker DL, Ahmed A. Wnt signaling regulates cytosolic translocation of connexin 43. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2019;317(2):248–61.
  298. Wu T, Dai Y, Xue L, Sheng Y, Zhong Y, Xue Y. Silencing NEDD9 by lentivirus-delivered shRNA inhibits the growth of BxPC-3 cells in vitro and in vivo. *Transl Cancer Res*. 2019;8(5):1873–81.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen je 19. travnja 1978. godine u Splitu gdje je pohađao osnovnu i srednju školu te je 1996. godine maturirao u I. jezičnoj gimnaziji. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je 2002. godine. Nakon pripravničkog staža u KBC Zagreb i položenog državnog ispita, od 2004. do 2006. godine bio je znanstveni novak na projektima „Uloga hepatotropnih virusa u razvoju karcinoma jetre i potencijalna terapija“ i „Nealkoholna masna bolest jetre u sklopu metaboličkog sindroma“ koji su se provodili u KBC Sestre milosrdnice. Godine 2010. položio je specijalistički ispit iz interne medicine, a 2015. godine je postao uži specijalist gastroenterologije. Od 2010. godine radi na Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Sestre milosrdnice.

Autor i koautor je većeg broja stručnih i znanstvenih radova. 14 radova mu je objavljeno u časopisima referiranim u međunarodnim indeksnim publikacijama, od čega ih je 8 indeksirano u Current Contents (CC). Koautor je triju knjiga: Dyspepsia in clinical practice (Springer), Gastrointestinal Complications of Diabetes (Springer) i Ultrazvuk abdomena (Medicinska naklada).

Završio je poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Oženjen je i otac dvoje djece.