



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Ирфан Ф. Ђоровић

**Улога осовине IL-33/ST2 у
имунопатогенези експерименталног
акутног оштећења желуца**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2026



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Irfan F. Ćorović

**The Role of the IL-33/ST2 Axis in the
Immunopathogenesis of Experimental
Acute Gastric Injury**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2026

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Ирфан Ђоровић
Датум и место рођења: 04.11.1993. године, Тутин
Садашње запослење: Општа болница Нови Пазар; доктор медицине, специјализант интерне медицине
Докторска дисертација
Наслов: Улога осовине IL-33/ST2 у имунопатогенези експерименталног акутног општећења желуца
Број страница: 93
Број слика: 36 (21 графикон, 12 слика, 3 табеле)
Број библиографских података: 334
Установа и место где је рад израђен: Факултет Медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицинске науке
Ментор: др сци. мед. Бојана Симовић Марковић , виши научни сарадник Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-03-558/26, 10.07.2024. године

Doctoral Dissertation identification page

Author
Name and surname: Irfan Ćorović
Date and place of birth: 4 November 1993, Tutin
Current employment: General Hospital of Novi Pazar, Serbia; MD, Internal medicine resident
Doctoral Dissertation
Title: The Role of the IL-33/ST2 Axis in the Immunopathogenesis of Experimental Acute Gastric Injury
No. of pages: 93
No. of images: 36 (21 charts, 12 images, 3 tables)
No. of bibliographic data: 334
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medical sciences
Mentor: MD, PhD, Bojana Simović Marković, Senior Research Associate at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Microbiology and immunology
Topic Application Date: 15.04.2024.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-558/26, 10.07.2024.

Пре свега, захваљујем се свом ментору, вишем научном сараднику Бојани Симовић Марковић, на несебично пренетом знању и истрајном вођству кроз све фазе израде ове дисертације, као и на пријатељству које је из тог односа трајно проистекло.

Поред стручне подршке, захвалност дугујем и др Исидори Станисављевић и Филипу Михајловићу, чије је пријатељство било ослонац у најтежим тренуцима, а чија су ведрина и блискост рад на овој тези учинили лакшим, забавнијим и људски испуњенијим.

Неизмерну захвалност дугујем својим родитељима, Вахиди и Фаруку, и сестри Емини, на стрпљењу које није постављало питања, на подршци која није тражила објашњења и на вери која није посустајала. Без ваше безусловне љубави, ниједан корак овог пута не би био могућ; зато овај успех припада и вама.

Мојој Лејли, хвала ти на љубави која уме да ћути и да разуме, на стрпљењу које траје и онда када све друго посустане. Са тобом сам налазио смирај и спокој и онда када су мисли биле немирне, и снагу да наставим онда када је било најзахтевније. Ти си моја инспирација, мотивација и разлог због кога желим да будем бољи - не само у ономе што постижем, већ у начину на који живим и мислим.

САЖЕТАК

Пептичка улкусна болест представља значајан глобални здравствени проблем због високе учесталости и озбиљних клиничких компликација. Боље разумевање инфламацијских путева који учествују у оштећењу слузнице желуца може отворити нове могућности за циљане терапијске интервенције. Експериментална манипулација IL-33/ST2 осовине показала је да може утицати на ток инфламације и оштећења епитела у гастроинтестиналном тракту.

Циљ студије је да се испита ефекат делеције ST2 на различите токове инфламације и механизме ћелијске смрти у експерименталном моделу акутног оштећења желуца.

Акутно оштећење желуца изазвано је једнократном применом 80% етанола оралном гаважом код мишева са недостатком гена за ST2 и мишева чистог соја BALB/c. Након индукције оштећења спроведена је макроскопска и патохистолошка процена интензитета ткивног оштећења. Анализиран је утицај делеције ST2 на модулацију имунског одговора и путева ћелијске смрти у оштећеном ткиву желуца, док је рекомбинантни мишји IL-33 апликован у циљним групама ради функционалне потврде.

Делеција ST2 ублажава акутно оштећење желуца код мишева инхибицијом NF- κ B и NLRP3 сигналних путева у ткиву желуца, што је праћено смањеном инфилтрацијом ћелија урођене и стечене имуности, као и сниженом продукцијом проинфламацијских цитокина. Такође, делеција ST2 ограничава апоптозу епителних ћелија, док примена рекомбинантног IL-33 погоршава оштећење слузнице желуца, потврђујући патогену улогу IL-33/ST2 осовине.

Добијени резултати указују да недостатак ST2 гена ублажава акутно оштећење желуца и циљање IL-33/ST2 осовине представља потенцијално обећавајућу стратегију за лечење пептичне улкусне болести желуца.

Кључне речи: IL-33/ST2 осовина, акутно оштећење желуца, NF- κ B, NLRP3 инфламазом, ћелијска смрт.

ABSTRACT

Peptic ulcer disease represents a significant global health problem due to its high prevalence and serious clinical complications. A better understanding of the inflammatory pathways involved in gastric mucosal injury may open new opportunities for targeted therapeutic interventions. Experimental manipulation of the IL-33/ST2 axis has been shown to influence the course of inflammation and epithelial damage in the gastrointestinal tract.

The aim of this study was to investigate the effect of ST2 deletion on different inflammatory pathways and mechanisms of cell death in an experimental model of acute gastric injury.

Acute gastric injury was induced by a single oral gavage of 80% ethanol in wild-type and ST2-deficient BALB/c mice. Following injury induction, macroscopic and histopathological assessments of tissue damage severity were performed. The impact of ST2 deletion on immune response modulation and cell death pathways in damaged gastric tissue was analyzed, while recombinant murine IL-33 was administered to selected groups for functional validation.

ST2 deletion attenuated acute gastric injury in mice by inhibiting NF- κ B and NLRP3 signaling in gastric tissue, which was accompanied by reduced infiltration of innate and adaptive immune cells and decreased production of pro-inflammatory cytokines. In addition, ST2 deletion limited epithelial cell apoptosis, whereas administration of recombinant IL-33 exacerbated gastric mucosal damage, confirming the pathogenic role of the IL-33/ST2 axis.

These findings indicate that ST2 deficiency alleviates acute gastric injury and that targeting the IL-33/ST2 axis represents a promising strategy for the treatment of peptic ulcer disease.

Keywords: IL-33/ST2 axis, acute gastric injury, NF- κ B, NLRP3 inflammasome, cell death.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1 ПЕПТИЧНА УЛКУСНА БОЛЕСТ	1
1.1.1. Дефиниција и диференцијална терминологија	1
1.1.2. Историјат пептичне улкусне болести	2
1.1.3. Епидемиологија пептичне улкусне болести.....	3
1.1.4. Етиологија и фактори ризика.....	5
1.1.4.1. Инфекција <i>H. pylori</i>	5
1.1.4.2. Употреба NSAIDs	5
1.1.4.3. Конзумација алкохола.....	6
1.1.4.4. Идиопатски улкуси.....	6
1.1.4.5. Ретки узрочници.....	6
1.1.4.6. Фактори ризика.....	7
1.1.5. Патогенеза пептичне улкусне болести.....	9
1.1.5.1. Улога желудачне киселине.....	9
1.1.5.2. Поређењај механизма одбране слузнице желуца	11
1.1.5.3. Имуни систем слузнице желуца и инфламација.....	12
1.1.6. Клиничка слика	13
1.1.7. Компликације	14
1.1.7.1. Гастроинтестинално крварење	14
1.1.7.2. Перфорација.....	14
1.1.7.3. Опструкција излазног дела желуца	15
1.1.8. Дијагноза.....	15
1.1.8.1. Клиничка процена	16
1.1.8.2. Езофагогастроуденоскопија	16
1.1.8.3. Дијагностика компликованих улкуса	17
1.1.9. Лечење.....	18
1.1.9.1. Супресија лучења киселине и зарастање улкуса	18
1.1.9.2. Ерадикација <i>H. pylori</i>	19
1.1.9.3. Цитопротективни лекови.....	19
1.1.9.4. Контрола инфламације у пептичном улкусу	20
1.1.9.5. Лечење компликација пептичне улкусне болести	20
1.2. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ АКУТНОГ ОШТЕЋЕЊА СЛУЗНИЦЕ ЖЕЛУЦА	21

1.2.1. Модел акутног оштећења слузнице желуца изазван етанолом	21
1.2.2. Модел акутног оштећења слузнице желуца изазван употребом NSAIDs	23
1.2.3. Модел акутног оштећења слузнице желуца изазван стресом у води	23
1.2.4. Модел акутног оштећења слузнице желуца изазван исхемијом са реперфузијом.....	23
1.2.5. Ређе коришћени модели (хистамин, резерпин, метилен плаво).....	24
1.3. IL-33/ST2 ОСОВИНА.....	24
1.3.1. Историјски развој и еволуција IL-33/ST2 осовине	24
1.3.2. Биолошка структура, геномска организација и биоактивне форме IL-33	25
1.3.3. ST2 рецептор и регулација активности IL-33	26
1.3.4. Улога IL-33/ST2 осовине у обољењима гастроинтестиналног тракта.....	29
1.3.4.1. <i>H. pylori</i> инфекција.....	29
1.3.4.2. Аутоимунски гастритис	30
1.3.4.3. Карцином желуца	31
1.3.4.4. Инфламацијске болести црева	32
1.3.4.5. Колоректални карцином	33
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	35
2.1. ЦИЉЕВИ	35
2.2. ХИПОТЕЗЕ.....	35
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	36
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ.....	36
3.2. ИНДУКЦИЈА МОДЕЛА ОШТЕЋЕЊА ЖЕЛУЦА	36
3.3. ОДРЕЂИВАЊЕ МАКРОСКОПСКОГ СКОРА.....	37
3.4. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА	38
3.4.1. Припрема ткива желуца и бојење хематоксилином и еозином.....	38
3.4.2. Одређивање хистолошког скорa.....	38
3.5. ПРИМЕНА РЕКОМБИНАНТНОГ IL-33	39
3.6. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ И ИЗОЛАТУ ТКИВА ЖЕЛУЦА.....	40
3.7. АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈА ИМУНСКИХ ЋЕЛИЈА МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ	41
3.7.1. Изолација имунских ћелија из ткива желуца	41
3.7.2. Обележавање површинских ћелијских маркера	41
3.7.3. Обележавање интрацелуларних маркера и цитокина.....	42
3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА	43
3.9. ПОЛИМЕРИЗОВАНА ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА.....	43

3.9.1. Изолација укупне RNA из ткива желуца	43
3.9.2. Реверзна транскрипција и реакција ланчаног умножавања у реалном времену (енгл. <i>real-time polymerase chain reaction</i> , RT-PCR)	44
3.10. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	45
4. РЕЗУЛТАТИ.....	46
4.1. ДЕЛЕЦИЈА ST2 УБЛАЖАВА АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ СЛУЗНИЦЕ ЖЕЛУЦА .	46
4.2. ДЕФИЦИЈЕНЦИЈА ST2 ГЕНА СМАЊУЈЕ ЛОКАЛНУ И СИСТЕМСКУ ПРОДУКЦИЈУ ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЦИТОКИНА	48
4.3. ПОВИШЕНА ЕКСПРЕСИЈА IL-33 У АКУТНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА ПОДСТИЧЕ Tc1 ИМУНСКИ ОДГОВОР.....	51
4.4. ДЕЛЕЦИЈА ST2 СМАЊУЈЕ ФУНКЦИОНАЛНУ АКТИВНОСТ ILC2 ЋЕЛИЈА И ИМУНСКЕ ОДГОВОРЕ ПОСРЕДОВАНЕ ЕОЗИНОФИЛИМА У АКУТНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА.....	55
4.5. ДЕЛЕЦИЈА ST2 РЕГУЛИШЕ АКТИВНОСТ НЕУТРОФИЛА И МАКРОФАГА ИНХИБИЦИЈОМ ЕКСПРЕСИЈЕ NF- κ B И NLRP3 У АКУТНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА	57
4.6. ДЕЛЕЦИЈА ST2 ОГРАНИЧАВА АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ ЖЕЛУЦА ИНХИБИЦИЈОМ РАЗЛИЧИТИХ ВИДОВА ЋЕЛИЈСКЕ СМРТИ.....	59
4.7. ПРЕТРЕТМАН СА rIL-33 ПОГОРШАВА АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ ЖЕЛУЦА ...	61
5. ДИСКУСИЈА.....	63
5.1. ДЕЛЕЦИЈА ST2 СМАЊУЈЕ АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ ТКИВА ЖЕЛУЦА ИЗАЗВАНО ЕТАНОЛОМ.....	63
5.2. ДЕЛЕЦИЈА ST2 СУПРИМИРА ИНФЛАМАЦИЈУ И АКТИВАЦИЈУ ЕФЕКТОРСКИХ ЋЕЛИЈА УРОЂЕНЕ ИМУНОСТИ У АКУТНОМ СТЕРИЛНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА.....	63
5.3. ДЕЛЕЦИЈА ST2 КАО МЕХАНИЗАМ ГАШЕЊА „ВАТРЕ“ ИНФЛАМАЗОМА У АКУТНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА	65
5.4. УТИЦАЈ ДЕЛЕЦИЈЕ ST2 НА ILCs2 И ЕОЗИНОФИЛЕ	66
5.5. IL-33/ST2 ОСОВИНА АКТИВИРА Tc1 ЛИМФОЦИТЕ ПОСРЕДСТВОМ IL-12 ИЗ ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА.....	67
5.6. УЛОГА ДЕЛЕЦИЈЕ ST2 НА РАЗЛИЧИТЕ МЕХАНИЗМЕ ЋЕЛИЈСКЕ СМРТИ	68
6. ЗАКЉУЧАК	72
7. СКРАЋЕНИЦЕ	73
8. ЛИТЕРАТУРА	75

1. УВОД

У уводном делу дисертације детаљно су разматрани етиологија, фактори ризика, патофизиолошки механизми, дијагностички приступи и терапијске стратегије пептичне улкусне болести код људи. Посебна пажња посвећена је анализи експерименталних модела акутног оштећења желуца, са нагласком на модел акутног оштећења слузнице желуца изазван етанолом, који је коришћен у оквиру овог истраживања као релевантан и добро валидирани модел за проучавање патогенетских механизма оштећења.

Поред тога, у уводном делу систематски су приказани биолошки ефекти IL-33/ST2 сигналне осовине, са посебним освртом на њену улогу у регулацији урођеног и стеченог имунског одговора у гастроинтестиналном тракту. Оваквим приступом постављен је јасан теоријски и концептуални оквир за истраживање механизма путем којих IL-33/ST2 сигнализација доприноси настанку и прогресији акутног оштећења слузнице желуца.

1.1 ПЕПТИЧНА УЛКУСНА БОЛЕСТ

Пептична улкусна болест представља значајан клинички и јавно-здравствени проблем због своје високе учесталости, хроничног тока са периодима егзацербација и потенцијалних компликација које могу значајно нарушити квалитет живота оболелих. Разумевање основних појмова, етиологије, фактора ризика и механизма настанка ове болести неопходно је за правилну дијагностику и терапијски приступ.

1.1.1. Дефиниција и диференцијална терминологија

Пептична улкусна болест, чији је назив изведен из грчке речи „*peptikos*“, што значи „варити“, дефинише се као дефект слузнице желуца или дванаестопалачног црева који се протеже кроз *muscularis mucosae* у субмукозу, а настаје као последица неравнотеже између одбрамбених и агресивних фактора слузнице желуца. Најчешћи етиолошки фактори су инфекција *Helicobacter pylori*, употреба нестероидних антиинфламацијских лекова (енгл. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs), конзумација алкохола, а ређе идиопатски узроци код којих се јасна етиологија не може идентификовати. Пептична улкусна болест се разликује од површних ерозија, које не продиру у *muscularis mucosae* (1-3).

Гастритис означава запаљење слузнице желуца, које може бити акутно или хронично. Хронични гастритис најчешће је повезан са *H. pylori* инфекцијом и карактерише га хроничан инфламацијски инфилтрат у слузници желуца (4, 5). Акутни гастритис обухвата спектар акутних оштећења слузнице, укључујући ерозије и површинска крварења, које су најчешће последица тешких системских стања, употребе лекова (посебно NSAIDs), алкохола или каустичних супстанци. За разлику од пептичних улкуса, ова оштећења обично су самоограничавајућа и не продиру у субмукозу (2, 3). Као посебан ентитет издваја се појам реактивне (хемијске) гастропатије, која представља оштећење слузнице желуца изазвано хемијским агенсима, при чему су присутне морфолошке промене без значајне инфламације (6).

Атрофични гастритис представља хистопатолошку дијагнозу која се одликује губитком одговарајућих жлезданих структура слузнице желуца, са или без замене интестиналним епителом (интестинална метаплазија). Најчешћи узроци су хронична *H. pylori* инфекција и аутоимунски гастритис. Овај ентитет представља и преканцерозну лезију и кључни је корак у каскади гастричне карциногенезе (4, 5, 7).

Функционална диспепсија се дефинише као бол или нелагодност у горњем делу абдомена без познатог структурног узрока на ендоскопији. Обухвата различите диспептичне симптоме, као што су бол у епигастичуму, осећај постпрандијалне пуноће и

рана ситост, при чему се сматра да у њеном настанку улогу имају поремећаји мотилитета желуца и висцерална преосетљивост (8).

1.1.2. Историјат пептичне улкусне болести

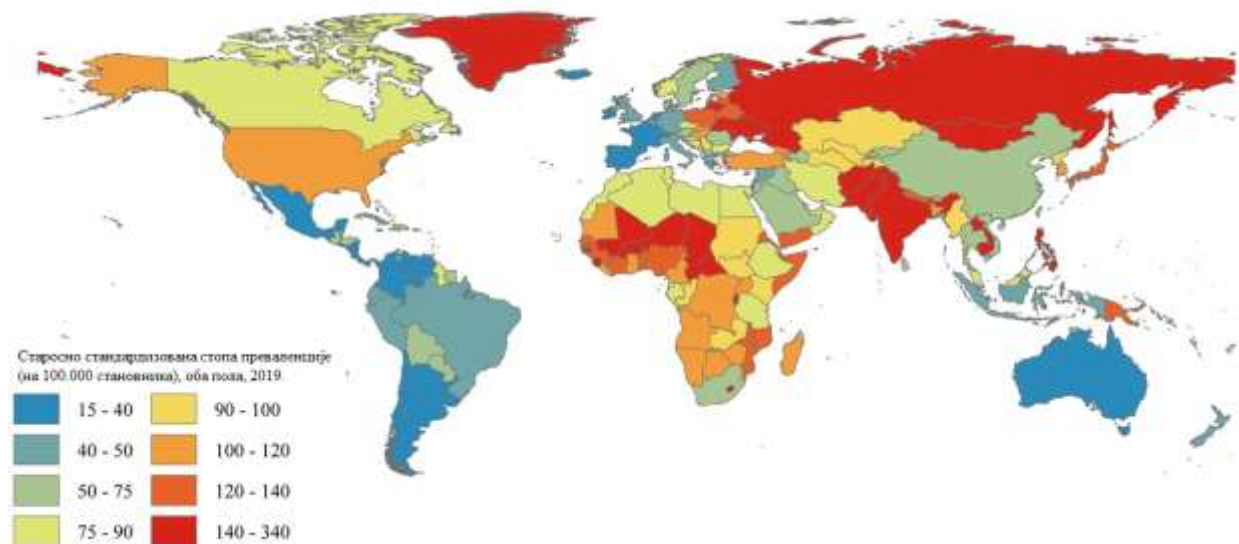
Пептична улкусна болест има значајну улогу у историји медицине, како као чест узрок морбидитета, тако и као узрок великих помака у гастроентерологији. Један од најранијих описа улкусне болести потиче из 4. века пре нове ере и уклесан је на стубу Асклепијевог храма у Епидауру, где је описана рана хируршка интервенција на улкусу желуца. Поред тога, први недвосмислен доказ пептичног улкуса потиче из аутопсије мумије из династије Хан (167. година п.н.е.), код које је утврђен перфорисани препилорични улкус са последичним акутним перитонитисом, што јасно показује да ова болест није искључиво савремени феномен (9). Историјски посматрано, пептична улкусна болест је била ретка пре 19. века, али је њена преваленца значајно порасла између 1850. и 1900. године, достижући врхунац у кохортама рађеним крајем 19. века. Овај пораст поклопио се са унапређењем санитарних услова и хигијене, што је изменило епидемиологију инфекције *H. pylori*, примарног етиолошког агенса пептичне улкусне болести. Одложено стицање *H. pylori* инфекције у детињству, услед побољшаних услова живота, довело је до развоја тежих облика гастритиса и повећаног ризика од стварања улкуса у одраслом добу, нарочито улкуса дванаестопалачног црева. Накнадни пад преваленце пептичне улкусне болести током претходног века паралелан је са смањењем стопе *H. pylori* инфекције, што одражава стална побољшања мера јавног здравља и животног стандарда (2, 9, 10). Крај 19. и почетак 20. века обележили су епидемијски карактер пептичне улкусне болести, са израженим ефектима који зависе од године рођења: највећи ризик за улкус желуца забележен је код особа рођених око 1885. године, док се највећи ризик за улкус дванаестопалачног црева јавља код кохорти рођених 10-30 година касније. Ова епидемија не може се у потпуности објаснити искључиво *H. pylori* инфекцијом. Сматра се да су фактори попут пушења и могуће појаве вирулентнијих сојева *H. pylori* такође допринели, али ниједан појединачни фактор не објашњава уочене трендове (11). Медицинска литература такође бележи да је неулкусна диспепсија препозната као засебан ентитет још у 18. веку, док је значајнији пораст хоспитализација због улкуса желуца и дванаестопалачног црева забележен тек крајем 19. и почетком 20. века (12).

Разумевање патофизиологије пептичне улкусне болести развијало се вековима. Рани радови били су усредсређени на лучење желудачне киселине, при чему је дуго доминирала максима „без киселине - нема улкуса“, која је обликовала терапијске приступе током већег дела 20. века. Хируршке интервенције, као што су гастректомија и ваготомија, биле су основни вид лечења пре развоја ефикасних фармаколошких средстава. Откриће *H. pylori* током 1980-их година донело је револуцију у овом пољу, померивши парадигму са пуке супресије киселине ка циљаној ерадикацији основне инфекције, што је Маршалу и Ворену донело Нобелову награду за медицину (9, 13). Развој терапије за ерадикацију *H. pylori*, инхибитора протонске пумпе и антагониста хистаминских рецептора у другој половини 20. века довео је до драматичног смањења инциденције пептичне улкусне болести, њених компликација и хоспитализација повезаних са овом болешћу, посебно у земљама са високим приходима. Ипак, пептична улкусна болест и даље представља значајан узрок морбидитета у земљама са ниским и средњим приходима, где је преваленца *H. pylori* инфекције и даље висока (2).

1.1.3. Епидемиологија пептичне улкусне болести

Пептична улкусна болест и даље представља значајан глобални здравствени изазов, иако се њена епидемиологија последњих деценија суштински изменила. Савремена расподела болести у свету одражава комплексну интеракцију променљивих фактора ризика, доступности здравствене заштите и ширих социодемографских кретања. Другим речима, терет болести данас је више последица глобалних демографских и економских процеса него биолошких промена самог патолошког ентитета.

На глобалном нивоу, апсолутан број оболелих од пептичне улкусне болести је порастао, пре свега због раста светске популације и продужења животног века: са приближно 6.4 милиона случајева 1990. године на преко 8 милиона 2019. године. Ипак, упркос овом порасту у апсолутним бројевима, старосно стандардизованих стопа преваленце бележе значајан пад, са 143,4 на 99,4 оболелих на 100000 становника у истом периоду. Овај тренд одражава напредак у превенцији, раној дијагностици и лечењу, а нарочито у земљама са високим примањима (2, 14, 15). Сличне промене уочавају се и у погледу морталитета и броја година живота прилагођених инвалидитету (енгл. *disability-adjusted life years, DALYs*), који су током последње три деценије смањени за приближно 60% (14, 15). Важно је нагласити да се овај пад старосно стандардизованих стопа региструје у свим старосним групама, укључујући и старију популацију, у којој апсолутни број случајева расте, али преваленца опада. Највише стопе и даље се бележе у јужној Азији, регионима са високим приходима у Северној Америци и централној подсахарској Африци (Слика 1) (16).



Слика 1. Глобална дистрибуција пептичне улкусне болести (преузето и кориговано према: Xie X et al. *BMC Gastroenterol* 2022; 22(1):58).

Изражене регионалне разлике остају једна од најважнијих одлика савремене епидемиологије пептичне улкусне болести. Јужна Азија и западна подсахарска Африка редовно региструју највише старосно стандардизоване стопе, при чему јужна Азија достиже 156,6 на 100000 становника у 2019. години (14, 15). На нивоу појединачних држава, Кирибати има највиши национални ниво преваленце, већи од 330 на 100000 (14). Супротно томе, региони са високим приходима, као што су западна Европа и Северна Америка, бележе драстичан пад и преваленце и морталитета, што се директно повезује

са бољим санитарним условима, широком применом инхибитора протонске пумпе (енгл. *proton pump inhibitors*, PPIs) и ефикасним стратегијама ерадикације *H. pylori* (2, 14, 15).

Социоекономски статус представља један од кључних детерминанти епидемиологије пептичне улкусне болести. Земље са ниским и нижим средњим вредностима социодемографског индекса имају највећи терет болести, са повећаном преваленцом, морталитетом и DALYs (2, 15). У овим регионима, ограничена доступност здравствене заштите, висока распрострањеност *H. pylori* инфекције и повећана употреба NSAIDs доприносе перзистентно високој инциденцији и учесталим компликацијама (2, 14, 15). Преваленца *H. pylori*, главног етиолошког фактора пептичне улкусне болести, пратећа је овим трендовима: достиже 79% у Африци, 63% у Латинској Америци и на Карибима, 55% у Азији, док је у Сједињеним Америчким Државама процењена на 9-20% (2, 17). Иако само око 10% инфицираних развије улкус, инфекција остаје доминантан покретач болести у срединама са ограниченим ресурсима (17). Полне и старосне разлике такође су изражене. У већини региона мушкарци имају више стопе преваленце, инциденце и морталитета у односу на жене (14, 18, 19). У земљама са ниским примањима, однос оболелих мушкараца и жена може достићи и до 13:1, уз доминацију улкуса дванаестопалачног црева, док високоразвијене земље последњих деценија бележе изједначавање полне расподеле и постепени помак ка већој учесталости улкуса желуца (14, 20). Медијана узраста при постављању дијагнозе такође се повећала глобално, што сагледава шире демографске промене и модификацију профила фактора ризика (16, 20). Компликације као што су крварење и перфорација и даље представљају значајан узрок морбидитета и морталитета, са годишњим инциденцама крварења између 19,5 и 57,0 на 100.000 становника, и перфорације од 3,8 до 14,0 на 100.000 (2). Ове компликације најчешће се јављају у регионима са ограниченим приступом здравственој заштити и високим оптерећењем факторима ризика.

Када је реч о Србији, према подацима Светске здравствене организације (енгл. *World Health Organization*, WHO) за 2023. годину, у нашој земљи су регистрована 3052 смртна исхода услед болести дигестивног система, од којих се 359 приписује пептичној улкусној болести. Ови подаци указују да, иако је глобални терет болести у опадању, пептична улкусна болест и даље представља значајан јавноздравствени проблем и у националном контексту (21). Ретроспективна студија која је обухватила период 1987-2006. године, а у оквиру које је анализирано 58.515 ендоскопских прегледа изведених у Клиничком центру Србије, пружила је додатни увид у националне епидемиолошке тенденције. Резултати су показали значајан пад учесталости улкуса дванаестопалачног црева у периоду 1997-2006. године, што се превасходно везује са увођењем рутинске дијагностике и ефикасних протокола за ерадикацију *H. pylori* инфекције. Иако су мушкарци у оба испитивана периода чешће оболевали, у каснијем периоду забележена је релативно већа учесталост улкусне болести код жена, што упућује на постепену трансформацију епидемиолошког профила, у складу са ширим глобалним кретањима (22).

У целини посматрано, савремена глобална епидемиологија пептичне улкусне болести обележена је падом старосно стандардизованих стопа, уз паралелни пораст апсолутног броја оболелих, што је последица демографских промена. Истовремено и даље постоје значајне регионалне, социоекономске, полне и старосне разлике, при чему највећи терет болести носе земље са ниским и нижим средњим вредностима социодемографског индекса.

1.1.4. Етиологија и фактори ризика

Два основна етиолошка фактора у развоју пептичне улкусне болести јесу инфекција бактеријом *H. pylori*, употреба NSAIDs и конзумација алкохола, уз значајан, мада мањи, допринос различитих егзогених и ендогених чинилаца (Табела 1).

1.1.4.1. Инфекција *H. pylori*

H. pylori је спирална, покретна, грам-негативна бактерија која има флагеле и која је адаптирана за живот у слузници желуца. Она се штити од киселе средине тако што лучи амонијак и бикарбонате посредством активности ензима уреазе, чиме неутралише околни рН, смањује вискозност слузи и омогућава лакше кретање кроз мукозни слој (23, 24). Инфекција узрокује хронични гастритис, нарушава интегритет међућелијских спојница и покреће локални инфламацијски одговор.

Тип гастритиса који настаје услед инфекције *H. pylori* утиче на локализацију улкуса:

- Антрални гастритис, удружен је са повећаном секрецијом желудачне киселине, што повећава ризик од развоја улкуса дванаестопалачног црева.
- Пангастритис, који обухвата целокупну површину слузнице желуца, при чему настаје смањена секреција желудачне киселине и погодни услове за формирање улкуса желуца (2, 25).

Поред утицаја на секрецију желудачне киселине, *H. pylori* ремети регулаторне механизме хомеостазе слузнице желуца и дванаестопалачног црева, ослабљује одбрамбене механизме слузнице и повећава подложност улцерацијама (2, 17).

Инфекција овом бактеријом сматра се најважнијим реверзбилним фактором ризика за развој пептичне улкусне болести. Њена глобална распрострањеност значајно варира, условљена је социоекономским приликама, санитарним условима и начином живота. Највећа учесталост бележи се код особа које су у детињству живеле у пренасељеним домаћинствима или су имале ограничен приступ хигијенски исправној води. Процењује се да приближно 10% инфицираних особа развије пептични улкус, док је ризик код неинфицираних свега око 1%, што јасно указује на кључну улогу ове бактерије у патогенези болести (2, 17, 26).

1.1.4.2. Употреба NSAIDs

Употреба NSAIDs, укључујући ацетилсалицилну киселину, представља један од најважнијих фактора ризика за пептичну улкусну болест. Ови лекови инхибирају ензим циклооксигеназу-1 (енгл. *cyclooxygenase-1*, COX-1) и тиме смањују синтезу простагландина, који су кључни за одржавање заштитне функције слузнице желуца и дванаестопалачног црева. Недостатак простагландина резултује смањењем секреције слузи и бикарбоната, слабљењем репарације епитела и узрокује смањени проток крви, што укупно повећава подложност за настанак улцерација (27). Поред овог механизма, NSAIDs имају и директно цитотоксично дејство на епителне ћелије. Они нарушавају фосфолипидни слој ћелијске мембране и нарушавају оксидативну фосфорилацију у митохондријама, узрокујући на тај начин поремећај ћелијске енергије, повећање пропустљивости ћелија и оштећење слузнице (2, 28). Комбинација ових механизма чини слузницу желуца и дванаестопалачног црева изузетно осетљивом на желудачну киселину и пепсин, чиме се стварају услови за развој улкуса.

Епидемиолошке студије показују да употреба повећава ризик од пептичне улкусне болести приближно четири пута. Осим повећања инциденције, NSAIDs значајно увећавају ризик од компликација као што су гастроинтестинално крварење, перфорација и опструкција пилоруса, које носе високу стопу морбидитета и морталитета. Улкуси

изазвани коришћењем NSAIDs често показују слабији одговор на стандардне терапијске протоколе и могу бити резистентнији на лечење у поређењу са улкусима друге етиологије (29, 30). Додатну забринутост изазивају резултати недавно спроведене студије у Италији, која је показала да је више од 20% испитаника недовољно информисано о потенцијалним нежељеним ефектима терапије NSAIDs, укључујући и ризик од развоја пептичног улкуса (31).

1.1.4.3. Конзумација алкохола

Прекомерна конзумација алкохола представља значајан фактор ризика за настанак пептичне улкусне болести и развоја компликација, нарочито крварења и перфорације (32, 33). Студије показују да унос више од 42 алкохолна пића недељно повећава ризик од улкусног крварења за око четири пута у односу на особе које уносе мање од једног пића недељно (34). Алкохол делује улцерогено кроз више механизма: директно оштећује слuzницу желуца, нарушава одбрамбену баријеру слuzнице и појачава деловање желудачне киселине, чиме се стварају погодни услови за развој улкуса (32, 33). Поред самог етил-алкохола и други састојци алкохолних пића имају ефекат на секрецију желудачне киселине као и слабљење одбрамбених могућности слuzнице желуца (32, 35). Овај комбиновани ефекат додатно погоршава оштећење слuzнице желуца и повећава вероватноћу настанка и компликација пептичне улкусне болести.

1.1.4.4. Идиопатски улкуси

Мањи део пептичних улкуса јавља се у одсуству *H. pylori* инфекције или употребе NSAIDs и означава се као идиопатска улкусна болест. Сматра се да ови улкуси настају услед других, још увек недовољно дефинисаних поремећаја у механизмима одбране слuzнице или регулацији лучења желудачне киселине (2, 36). Подаци студије спроведене у Кореји показали су да је 22,1% испитаника имало идиопатску пептичну улкусну болест (37), а слична учесталост овог ентитета добијена је и у истраживањима реализованим у Француској и Пакистану (38, 39). Улкуси који нису повезани са *H. pylori* инфекцијом нити са употребом NSAIDs чешће се јављају код старијих пацијената који имају бројне коморбидитете, отпорнији су на терапију PPIs, те носе већи ризик од крварења, рецидива и укупног морталитета у поређењу са класичном пептичном улкусном болешћу (40).

1.1.4.5. Ретки узрочници

Иако већину случајева пептичне улкусне болести узрокују *H. pylori* инфекција и употреба NSAIDs, постоји низ ређих, али клинички значајних етиолошких фактора. Међу инфективним узрочницима издвајају се поједини вируси, као што су херпес симплекс вирус (енгл. *herpes simplex virus*, HSV) и цитомегаловирус (енгл. *cytomegalovirus*, CMV), као и бактерија *H. heilmannii*. У ретким случајевима, улкусна оштећења могу настати услед специфичних инфекција, као што су туберкулоза, сифилис или мукормикоза (40). Од лекова који могу изазвати или погоршати улкус, нарочито у комбинацији са NSAIDs, издвајају се бисфосфонати, доксициклин, клопидогрел, кортикостероиди, спиронолактон, микофенолат мофетил, калијум-хлорид, као и различити хемиотерапијски режими, укључујући имунотерапијске агенсе (41-47). Поремећаји праћени хиперсекрецијом желудачне киселине, као што су гастрином у оквиру *Zollinger-Ellison* синдрома и системска мастоцитоза, такође могу довести до формирања улкуса (48, 49). Хируршке интервенције, нарочито гастроинтестиналне реконструкције као што је постгастрични бајпас, могу бити праћене појавом пептичних улкуса (50). Поред тога, улкуси могу настати и као последица зрачења (51), као и у оквиру инфилтративних болести, укључујући саркоидозу, амилоидозу и Кронову болест (40). Посебну клиничку категорију представљају улкуси који се јављају код пацијената са тешким хроничним

обољењима или акутним дисфункцијама више органа. Ови улкуси су чести у јединицама интензивне неге и у стањима као што су цироза јетре, бубрежна инсуфицијенција и хронична опструктивна болест плућа (52-55).

Табела 1. Етиолошки узрочници пептичне улкусне болести.

<i>H. pylori</i> NSAIDs Алкохол Идиопатски улкуси Ретки узрочници	
<ul style="list-style-type: none"> • Инфекције <ul style="list-style-type: none"> - HSV - CMV - <i>H. heilmannii</i> - Туберкулоза - Сифилис - Мукормикоза • Лекови <ul style="list-style-type: none"> - Бисфосфонати - Доксициклин - Клопидогрел - Кортикостероиди - Спиринолактон - Микофенолат мофетил - Калијум-хлорид - Хемиотерапија - Имунотерапија • Хируршке интервенције <ul style="list-style-type: none"> - Постгастрични бајпас 	<ul style="list-style-type: none"> • Хиперсекреторна стања <ul style="list-style-type: none"> - <i>Zollinger-Ellison</i> синдром - Системска мастоцитоза • Зрачење <ul style="list-style-type: none"> - Радиотерапија • Инфилтративне болести <ul style="list-style-type: none"> - Кронова болест - Амилоидоза - Саркоидоза • Јединица интензивне неге • Улкуси повезани са хроничним обољењима <ul style="list-style-type: none"> - Цироза јетре - Хронична бубрежна слабост - Хронична опструктивна болест плућа

1.1.4.6. Фактори ризика

Развој пептичне улкусне болести у значајној мери зависи од различитих фактора што је потврђено бројним клиничким и епидемиолошким студијама. Међу најважнијим факторима ризика издвајају се следећи: пушење цигарета, конзумација алкохола, стрес, социоекономски фактори, генетика, употреба психоактивних супстанци и кортикостероида, гладовање, недостатак сна и физичке активности као и многи други мање важни фактори ризика (2, 17).

Пушење цигарета представља један од најдоследније потврђених фактора ризика за настанак пептичне улкусне болести, развој компликација и морталитет (56). Преваљенца улкусне болести код садашњих и бивших пушача је приближно двоструко већа у поређењу са особама које никада нису пушиле (57) док је пушење више од 15 цигарета дневно повезано са више него троструко повећањем ризика за настанак перфорације улкуса у односу на непушаче (34). На молекулском нивоу, пушење инхибира секрецију бикарбоната и подстиче повећано лучење желудачне киселине, што ремети одбрамбене механизме слузнице и ствара погодне услове за улцерогенезу (58).

Хронични психолошки стрес повезан је са повећаном учесталошћу пептичне улкусне болести. Ови фактори делују путем неуроендокриних механизма који повећавају секрецију киселине и нарушавају регенерацију слузнице (17, 32). У проспективној студији спроведеној у данској популацији утврђено је да психолошки стрес повећава учесталост појаве пептичног улкуса неvezано за употребу NSAIDs или постојање *H. pylori* инфекције. Делом се овај ефекат може објаснити понашањем ризичним по здравље које је узроковано стресом (59). Учесталост пептичних улкуса расте током природних катастрофа и друштвених криза. Након разорног земљотреса у Јапану 2011. године порасла је учесталост улкуса који нису повезани са *H. Pylori* инфекцијом нити са NSAIDs, што указује да сам психолошки стрес може изазвати пептични улкус (60). Осим стреса, различити облици психолошког оптерећења, укључујући дуготрајну депресију и потребу за стручном психолошком подршком су повезани са већом преваленцом пептичне улкусне болести (61).

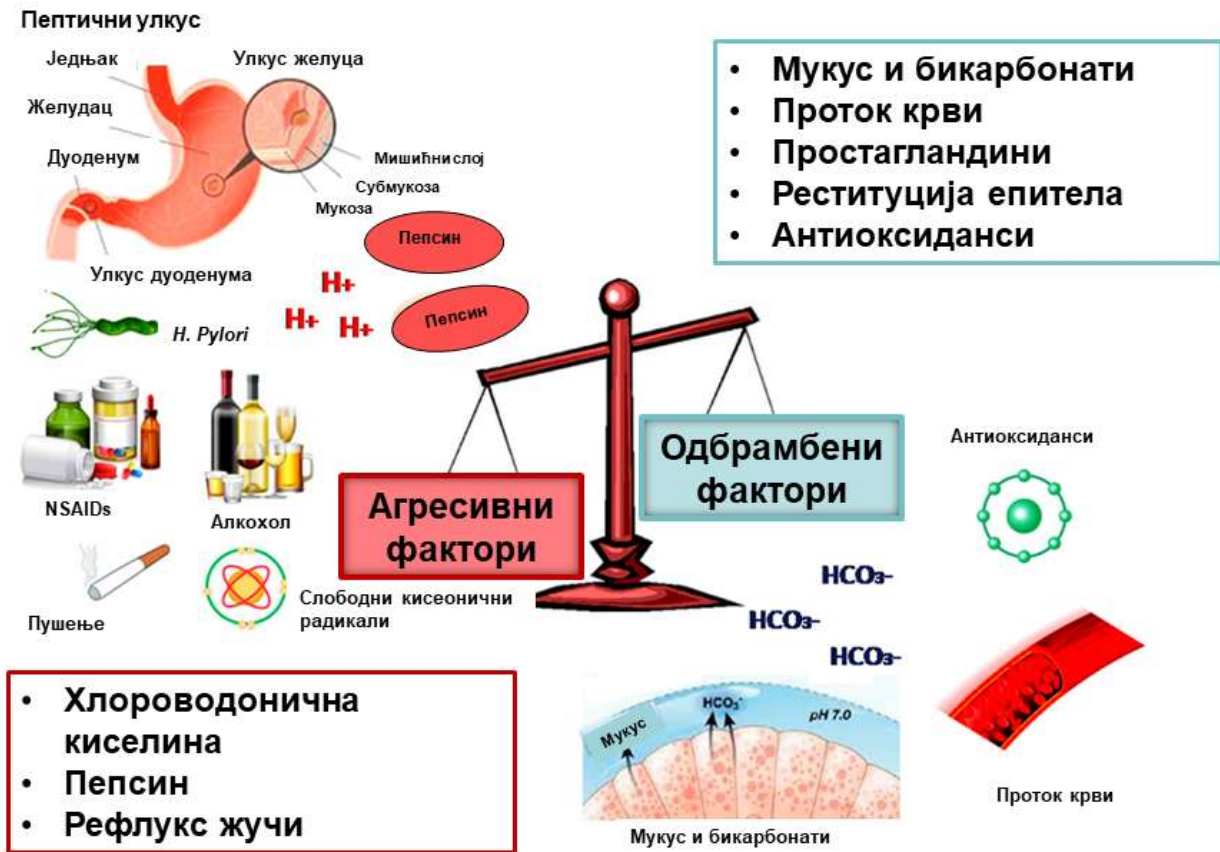
Социоекономски фактори играју значајну улогу у одређивању ризика за настанак пептичног улкуса: више стопе пептичног улкуса уочавају се у срединама са нижим социодемографским индексом, где су истовремено присутни већа учесталост *H. pylori* инфекције и ограничен приступ здравственој заштити (18). Особе које живе у таквим условима чешће имају нездраве животне навике, као што су прекомерно конзумирање алкохола и пушење, бављење физички захтевним пословима и живот у срединама са слабијим хигијенским стандардима. Поред тога, свакодневно их оптерећују страх од губитка посла, неадекватна исхрана и честа употреба лекова против болова. Живот у бројним, пренасељеним домаћинствима додатно повећава психолошки стрес, што све заједно доприноси већем ризику од развоја пептичног улкуса (62).

Генетски фактори саме *H. pylori* повећавају ризик од настанка пептичног улкуса, посебно код сојева који носе вирулентне варијанте гене као што су *cagA* (енгл. *cytotoxin-associated gene A*), *vacA* (енгл. *vacuolating cytotoxin A gene*), *babA* (енгл. *blood group antigen-binding adhesin gene*), *oipA* (енгл. *outer inflammatory protein A gene*) и *dupA* (енгл. *duodenal ulcer-promoting gene A*). Генетски полиморфизми домаћина, укључујући варијанте гена за фактор некрозе тумора алфа (енгл. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), интерлеукин-6 (енгл. *interleukin 6*, IL-6), IL-1 β , IL-8, IL-10, PSCA (енгл. *prostate stem cell antigen*) и CYP2C19 (енгл. *cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19*), утичу на јачину инфламацијског одговора и индивидуалну подложност настанку пептичног улкуса (63). Осим наведеног, нулта (0) крвна група и поједини фенотипови крвне групе *Lewis* повезани су са повећаним ризиком за развој пептичног улкуса (64, 65).

Коришћење дрога као што су кокаин, крек и метамфетамин може довести до изражене вазоконстрикције, исхемије слузнице и директног оштећења ткива, што повећава ризик од настанка улкуса и перфорације (57, 20). Истовремена примена кортикостероида са NSAIDs додатно повећава ризик од улкуса, што је посебно значајно код хоспитализованих пацијената и оних са коморбидитетима (17, 57). Повишен унос соли појачава лучење желудачне киселине, док продужени периоди поста могу изазвати појачано лучење киселине у празном желуцу, чиме се стварају услови за улцерогенезу (20). Недовољан сан и седентарни начин живота повезани су са ослабљеним процесима зарастања слузнице желуца и дванаестопалачног црева и већом осетљивошћу на развој улкуса (56). Поред тога, присуство опструктивне апнеје у сну препознато је као независан фактор ризика за појаву крварења из улкуса (66).

1.1.5. Патогенеза пептичне улкусне болести

Пептична улкусна болест настаје као последица нарушене равнотеже између агресивних фактора, пре свега хлороводоничне киселине и пепсина и одбрамбених механизма слузнице желуца и дванаестопалачног црева (Слика 2). Улкус се развија тек онда када агресивни фактори превазиђу капацитет заштитних система, што узрокује оштећење и некрозу епитела (2, 17). Схватање ове динамичке равнотеже представља основу за разумевање патогенезе, клиничких феноטיפова и савремених терапијских стратегија.



Слика 2. Патогенеза пептичне улкусне болести (преузето и кориговано према: *Serafim C et al. Molecules 2020; 25(22):5431*).

1.1.5.1. Улога желудачне киселине

Секреција желудачне киселине представља прецизно регулисан физиолошки процес који се одвија у паријеталним ћелијама смештеним у слузници фундуса и корпуса желуца (67, 68). Основни ефекторски механизам чини водоник/калијум аденозин трифосфатаза (енгл. *hydrogen/potassium adenosine triphosphatase*, H⁺/K⁺-АТФ-аза) или позната и као протонска пумпа, ензим који размеђује интрацелуларне јоне водоника са луменским јонима калијума, што покреће излучивање хлороводоничне киселине у лумен желуца (67, 69). Овај процес је неопходан за варење протеина, апсорпцију микроелемената попут гвожђа, калцијума и витамина В12, као и за одбрану организма од патогена (68, 70, 71). Регулација лучења киселине заснива се на деловању три главне стимулаторне сигналне осе: неуралне компоненте, хормонске компоненте и паракрине компоненте. Неурална компонента остварује утицај тако што се путем стимулације

вагусног нерва ослобађа ацетилхолин, који делује директно на паријеталне ћелије активирајући мускаринске М3 рецепторе, али и индиректно подстицањем ћелија сличних ентерохромафину (енгл. *enterochromaffin-like cells*, ECLs) на ослобађање хистамина (67, 68, 70, 71). Хормонска компонента делује преко гастрина којег луче антралне G ћелије као одговор на присуство хране, везује се за рецепторе за холецистокинин тип 2 (енгл. *cholecystokinin receptor type 2*, ССК2) на ECLs ћелијама и стимулише ослобађање хистамина. Поред тога, директно активира и паријеталне ћелије (68, 70-72). Паракрина компонента делује преко хистамина којег ослобађају ECLs ћелије делује на хистаминске H2 рецепторе паријеталних ћелија, активирајући аденилат-циклазу и повећавајући концентрацију цикличног аденозин монофосфата (енгл. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP), чиме се подстиче уграђивање и активност протонске пумпе у апикалној мембрани (68, 70-73). Регулација инхибиције секреције хлороводоничне киселине доминантно је посредована соматостатином, који луче D ћелије у антруму, корпусу и фундусу. Соматостатин инхибира лучење гастрина, смањује ослобађање хистамина и директно делује на паријеталне ћелије, чиме врши снажну негативну повратну спрегу (68, 71, 72). Додатни инхибитори укључују глугагону-сличан пептид-1 (енгл. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1) и холецистокинин (68, 71). Након стимулуса као што је унос хране, долази до фузије интрацелуларних тубуловезикула који садрже H⁺/K⁺-АТФ-азу са апикалном мембраном паријеталних ћелија. Овим се повећава број активних протонских пумпи на површини ћелије и тиме појачава секреција киселине (67, 69). Координисано деловање неуралних, хормонских и паракриних сигнала обезбеђује да секреција киселине буде усклађена са физиолошким потребама организма, док заштитни механизми као што су соматостатин и секреција бикарбоната спречавају оштећење слuzнице (67, 70, 74).

Деценијама клиничка запажања, подржана експерименталним доказима, обликују добро познату максиму „без киселине - нема улкуса“, која истиче централну улогу хлороводоничне киселине у улцерогенези. Иако је у савременој гастроентерологији неспорно да развој пептичне улкусне болести подразумева сложено садејство бројних фактора, од нарушене баријере слuzнице и инфламацијских механизма до системских утицаја, желудачна киселина остаје примарни и неопходни услов за настанак и прогресију улкусне лезије. Управо због тога савремена фармакотерапија и даље почива на инхибицији секреције желудачне киселине: инхибитори протонске пумпе и други антисекреторни лекови доказано поспешују зарастање, стабилизацију улкуса и дугорочно смањују вероватноћу рецидива (4, 75, 76).

Један од најзначајнијих етиолошких фактора који ремети хомеостазу секреције желудачне киселине јесте *H. pylori*. Ова спирална, покретљива бактерија насељава површинске слојеве слuzнице желуца и преживљава у киселој средини захваљујући уреази, која разградњом уреје ствара амонијак и бикарбонат. Ови алкални производи неутралишу локалну киселост, смањују вискозност слuzи и омогућавају бактерији лакшу пенетрацију и задржавање у епителу (77, 78). Поремећаји секреције киселине у инфекцији *H. pylori* зависе од дистрибуције гастритиса. Антрално доминантни гастритис смањује секрецију соматостатина и компензаторну хипергастринемију, што потом појачава секрецију хлороводоничне киселине и самим тим повећава ризик за настанак улкуса дванаестопалачног црева. Супротно томе, пангастритис који захвата проксимални део желуца праћен је прогресивном атрофијом паријеталних ћелија и смањеном продукцијом киселине, што се најчешће повезује са формирањем улкуса желуца (79, 80). Поред ових директних утицаја, *H. pylori* нарушава координацију гастрина и соматостатина, кључних неурохормоналних регулатора секреције, чиме се додатно слабе механизми одбране слuzнице и повећава шанса за настанак улцерација (81).

Конзумација алкохола поседује изражен улцерогени потенцијал, делом и преко ефеката на регулацију секреције желудачне киселине. Стимулацијом гастрина и повећаног ослобађања хистамина у слузници желуца алкохол повећава секрецију хлороводоничне киселине (82, 83). NSAIDs, иако не стимулишу директно секрецију киселине, значајно ремете физиолошку равнотежу између агресивних и одбрамбених фактора. Инхибицијом COX-1 они умањују продукцију простагландина и самим тим доводе до пада заштитних механизма слузнице а самим тим и повећања осетљивости слузнице на улцерогено дејство киселине (2, 17). Иако *H. pylori*, алкохол и NSAIDs делују различитим механизмима, у крајњем исходу нарушавају физиолошку регулацију секреције киселине и компромитују заштиту слузнице, чиме битно доприносе настанку и прогресији пептичне улкусне болести.

1.1.5.2. Поређењај механизма одбране слузнице желуца

Слузница желуца располаже сложеним системом одбране који омогућава желуцу и дванаестопалачном цреву да поднесу континуирано излагање високо концентрисаној хлороводоничној киселини, пепсину, жучним соли и другим луменским иритансима. Овај заштитни систем организован је у три функционална нивоа: преепителни, епителни и субепителни, при чему сваки од њих специфично доприноси очувању интегритета слузнице. Преепителна баријера преваходно се састоји од густог слоја гела сачињеног од слузи који луче површинске мукозне ћелије. Овај филм од слузи делује као физичка и хемијска заштита од киселине и пепсина. Богат је муцинима и испуњен бикарбонатима које секретују епителне ћелије, чиме се успоставља стабилан рН градијент који одржава готово неутралну микросредину на површини епитела, упркос изразито киселом лумену желуца (2, 84-87). Слој слузи садржи и фосфолипиде који одбијају растворљиве токсине и ограничавају дифузију H^+ јона ка епителу (87). Епителна баријера грађена је од површинских епителних ћелија повезаних тесним међућелијским спојевима (енгл. *tight junctions*), који спречавају повратну дифузију киселине и пепсина у дубље слојеве слузнице. Ове ћелије секретују слуз, бикарбонате и низ цитопротективних пептида, међу којима су посебно значајни пептиди из фамилије *trefoil* фактора, који подстичу брзу епителну реституцију и репарацију након повреде (85, 88, 89). Простагландини имају кључну улогу у стимулацији секреције слузи и бикарбоната, одржавају адекватне перфузије слузнице и подстицању пролиферације и обнове епителних ћелија (2, 85, 90). Додатни медијатори, као што су азот-оксид и водоник-сулфид, такође доприносе регулацији крвотока и цитопротекцији (89, 90). Субепителну одбрану чини густо разграната микроваскуларна мрежа која снабдева слузокожу кисеоником и нутријентима, одводи H^+ јоне који проклизају у ткиво и преноси факторе раста и простагландине важне за регенерацију и репарацију (84, 85). Сензорна инервација, укључујући неуропептиде попут CGRP (енгл. *calcitonin-gene related peptide*) и соматостатина, додатно модулише одбрамбене и репаративне процесе (89). Нарушавање било ког од ових одбрамбених слојева повећава се пропустљивост, нарушава реституција и као крајњи исход, јављају се улцерације или крварење (2, 84, 85, 90). Способност слузнице да брзо обнови површинска оштећења путем реституције и епителне пролиферације представља суштински елемент њене одбране (85, 88).

H. pylori компромитује заштитне механизме слузнице на више нивоа. Бактеријски ензими и производи метаболизма снижавају вискозност и стабилност слузног гела, реметећи његову способност да задржи неутралан рН на површини епитела. Поред тога, *H. pylori* нарушава интегритет епителних чврстих спојница, што узрокује повећану парацелуларну пропустљивост и омогућава дубљу пенетрацију киселине и пепсина (2, 17, 91).

NSAIDs делују превасходно инхибицијом ензима COX-1, доводећи до значајног смањења синтезе простагландина, кључних медијатора заштите слузнице желуца. Губитком простагландина смањује се секреција слузи и бикарбоната, нарушава се микроциркулација слузнице и успорава регенерација епитела, што знатно повећава склоност ка улцерацији (2, 92, 93). Осим ових индиректних механизма, NSAIDs испољавају и директно цитотоксично дејство нарушавањем оксидативне фосфорилације у митохондријама чиме нарушавају енергетски метаболизам ћелија и дестабилизују фосфолипидне мембране, што све заједно резултира пропадањем епителних ћелија и појавом локалних ерозија (94).

Алкохол делује директним деструктивним механизмима. Растворљивошћу компонената слузног слоја у алкохолу он редукује његову густину и заштитни капацитет, док дестабилизацијом фосфолипидне мембране повећава пропустљивост епитела и нарушава ћелијску хомеостазу. Као последица, епител постаје изложен интензивном хидролитичком и протеолитичком дејству киселине и пепсина, што омогућава брз развој ерозија и некротичних лезија (95, 96).

1.1.5.3. Иmunски систем слузнице желуца и инфламација

Иmunски систем слузнице желуца обухвата специјализоване имунске механизме чија је улога да штите слузницу желуца од патогених микроорганизама, а да истовремено одрже толеранцију према безопасним антигенима, као што су компоненте хране и коменсална микробиота. Овај имунски систем се знатно разликује од системске имуности и састоји се од елемената урођене и стечене одбране, укључујући епителне ћелије, резидентне (ткивне) и регрутоване ћелије имунског система (неутрофили, макрофаги, дендритске ћелије, Т и В лимфоцити), као и продукцију цитокина и имуноглобулина (енгл. *immunoglobulin*, Ig), посебно секреторног IgA (97-100). Урођени имунски одговор у желуцу заснива се на физичкој баријери епителног слоја, лучењу слузи и антимикробних пептида, као и на брзим, неспецифичним одговорима урођених имунских ћелија на продор микроорганизама. Стечена имуност карактерише се регрутовањем и активацијом лимфоцита, при чему В лимфоцити производе IgA, који се транспортује кроз епител и неутралише патогене, спречавајући њихово пријањање и инвазију (101, 102). Желудац истовремено садржи организоване лимфоидне структуре и разасуте имунске ћелије које координишу имунски одговор и одржавају локалну хомеостазу (99, 103). Кључна улога имунског система слузнице желуца је да омогући равнотежу између ефикасне заштите од штетних микроорганизама, као што је *H. pylori*, и избегавања прекомерне инфламације или аутоимунског одговора. Нарушавање овог осетљивог баланса може за исход имати различите болести слузнице желуца, укључујући гастритис, пептичну улкусну болест и карцином желуца (97, 98). Иmunски систем слузнице остварује ову двоструку функцију путем строго регулисаних ћелијских и молекулских механизма који омогућавају разликовање између патогених и непатогених стимулуса (99, 100).

Инфламација представља кључни патофизиолошки механизам у развоју пептичне улкусне болести, имајући дуалну улогу: делује као иницијатор оштећења слузнице желуца и као регулатор процеса репарације. Најчешћи етиолошки фактори попут инфекције *H. pylori*, конзумације алкохола и употреба NSAIDs, индукују различите, али делимично преклапајуће облике инфламацијског одговора, који нарушавају интегритет одбрамбених механизма слузнице и убрзавају настанак улкуса (104-106). Нарушавање интегритета слузнице желуца узрокује ослобађање молекулских образаца патогена (енгл. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) и молекулских образаца оштећења (енгл. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs), који брзо активирају урођену имуност (107, 108). Ови сигнали покрећу интензиван инфламацијски процес у слузници желуца,

који се одликује нагомилавањем неутрофила, макрофага и различитих субпопулација лимфоцита. Присуство ових ћелија прати обилна продукција проинфламацијских цитокина, као што су TNF- α , IL-1 β и IL-6, као и хемокина који додатно привлаче ћелије имунског система у подручје оштећења (104, 107-109). Активирањем NF- κ B (енгл. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) сигналног пута повећава се експресија широког спектра цитокина и адхезивних молекула стварајући на тај начин инфламацијску петљу која одржава и продубљује оштећење ткива (110, 111). Последице прекомерно стварање реактивних врста кисеоника, додатно нарушава структуру и функцију епителних ћелија (105, 106). Уз то, инфламација такође активира више програма ћелијске смрти укључујући апоптозу, некрозу, аутофагију и фероптозу, што у коначници узрокује структурну дезинтеграцију слузнице и формирање улкуса (106, 112, 113). Поред класичних инфламацијских путева, све већа пажња посвећује се улози инфлазома у патогенези улкусне болести. Повећана експресија компоненти NLRP3 (енгл. *NLR family pyrin domain containing 3*) инфлазома као и појачано ослобађање његових ефекторских цитокина IL-1 β и IL-18 уз активацију пироптозе, доводи се у везу са настанком пептичног улкуса (111, 114).

1.1.6. Клиничка слика

Пептична улкусна болест представља хетероген клинички ентитет који обухвата широк спектар клиничких манифестација, од потпуно асимптоматских случајева до тешких и потенцијално животно угрожавајућих компликација (Слика 3). Већина оболелих нема изражене тегобе. Процењује се да се чак до две трећине улкуса открије случајно, најчешће приликом ендоскопског прегледа који се спроводи из сасвим другог разлога (115). Асимптоматски улкуси могу бити клинички подмукли, јер се пацијенти често јављају тек када настану компликације као што је гастроинтестинално крварење (116). Посебно је важно истаћи да старија животна доб, активно пушење и гојазност повећавају ризик од развоја асимптоматских улкуса, па се пацијенти са наведеним факторима ризика чешће први пут јављају лекару тек након појаве компликација (117).

Када су симптоми присутни, доминантна тегоба је бол у епигастријуму, који се јавља код око 81% симптоматских пацијената (118). Овај бол се најчешће описује као оштар, пецајући или жуљајући, а често је удружен са диспептичним тегобама као што су осећај надимања, нелагодност у горњем делу абдомена, рана ситост и повремена појава горушице или регургитације желудачне киселине. Ноћни бол, који буди пацијента из сна, забележен је у око 41% случајева и објашњава се циркадијалним варијацијама у лучењу желудачне киселине (2, 17, 119). Код пацијената са улкусом желуца бол у епигастријуму се најчешће јавља непосредно након оброка, што се везује за висцералну сензитизацију и нарушену гастродуоденалну моторику (116). Насупрот томе, код улкуса дванаестопалачног црева бол се типично јавља пар сати након оброка, уз честу појаву ноћног бола (2, 17).



Слика 3. Клинички спектар и компликације пептичне улкусне болести.

1.1.7. Компликације

Компликације пептичне улкусне болести представљају најзначајнији извор морбидитета и морталитета повезаног са овим обољењем. Најчешће се јављају три тешке клиничке манифестације: гастроинтестинално крварење, перфорација и опструкција излазног дела желуца (пилоричног канала) (Слика 4).

1.1.7.1. Гастроинтестинално крварење

Крварење представља најчешћу компликацију пептичког улкуса и чини приближно 73% свих хоспитализација повезаних са компликованом улкусном болешћу (17). Ова компликација носи значајан ризик од морбидитета и смртности, посебно код старијих пацијената и особа са коморбидитетима. Клиничка презентација крварећег улкуса варира, али најчешћи симптоми укључују: мелену (црно, катранасту столицу), хематемезу (повраћање крви или „талога кафе“), анемију и малаксалост, хемодинамску нестабилност у тешким случајевима (тахикардија, хипотензија, шок) (2, 17, 120). Рецидив крварења представља озбиљан клинички изазов. Највећи ризик од поновног крварења имају пацијенти код којих није спроведена ерадикација *H. pylori*. Доказано је да успешна елиминација *H. pylori* драматично смањује стопу поновног улцерисања и рецидива крварења, чиме се значајно побољшава дугорочни клинички исход (121).

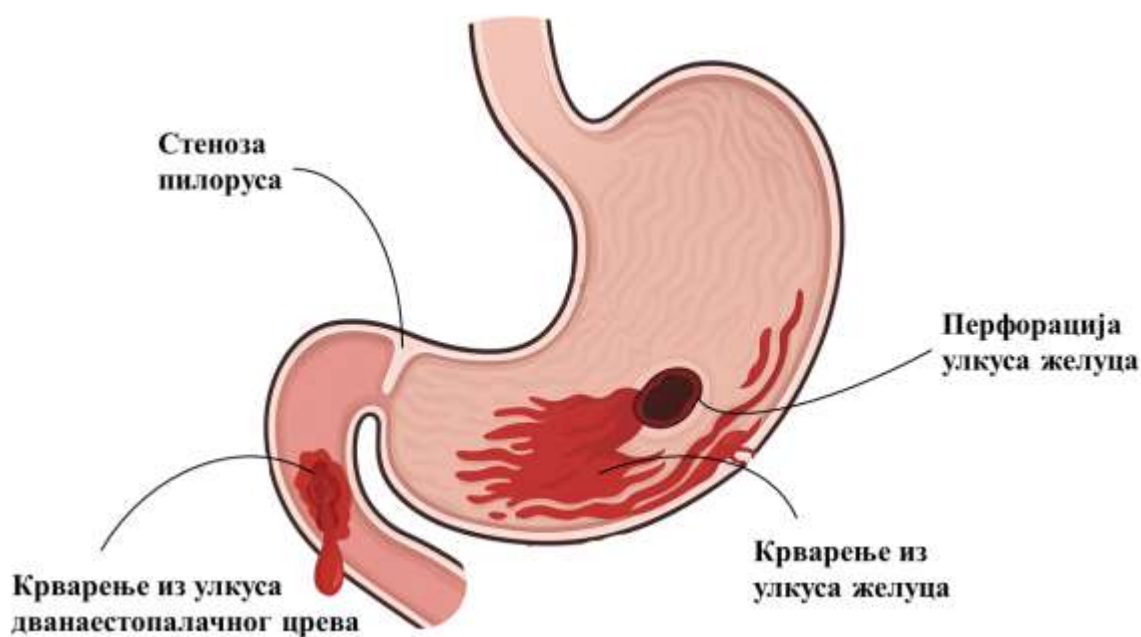
1.1.7.2. Перфорација

Перфорација се дијагностикује код око 9% пацијената са компликованом улкусном болешћу и представља најчешћи разлог за ургентно хируршко лечење (17). Иако је перфорација ређа од крварења (однос приближно 1:6 у корист крварења), она носи изразито висок ризик смртог исхода. Процењује се да 37-40% смртних исхода повезаних са улкусном болешћу потиче управо од перфорираних улкуса. Учесталост смртности је приближно пет пута већа него код крварећих улкуса (17, 20, 120). Клиничка слика перфорације је драматична и карактерише је: нагли, изузетно интензиван бол у

стомаку („бол као убод ножем“), брзи развој перитонитиса са ригидитетом трбушног зида, системска токсичност и могући септички шок (120). Узрок перфорације је најчешће акутно продирање улкуса кроз све слојеве зида желуца и дванаестопалачног црева, што за крајњи резултат има изливање садржаја у перитонеум и брзи настанак хемијског, а потом и бактеријског перитонитиса (20, 120).

1.1.7.3. Опструкција излазног дела желуца

Опструкција излазног дела желуца као последица стенозе пилоруса, која настаје услед хроничног ожиљка, фиброзе или едема изазваних дуготрајним улцерозним процесом, данас је постала релативно ретка захваљујући ефикасном фармаколошком лечењу (122). Учесталост ове компликације процењује се на око 3% случајева пептичне улкусне болести са компликацијама (17). Типични симптоми укључују: рану ситост, мучнину и учестало повраћање, губитак телесне масе, поремећаје електролита. У тежим случајевима, пацијенти могу развити тешку нутритивну дефицијенцију и дехидратацију, што захтева хоспитални третман (2, 123, 124).



Слика 4. Илустративни приказ компликација пептичне улкусне болести.

1.1.8. Дијагноза

Дијагноза пептичне улкусне болести заснива се пре свега на клиничкој слици и ендоскопском прегледу горњег дигестивног тракта, који представља златни стандард за потврду дијагнозе. Езофагогастродуоденоскопија омогућава директну визуализацију улкуса, процену његове локализације и величине, као и узимање биопсија ради искључивања малигнитета и доказивања *H. pylori* инфекције. Допунске дијагностичке методе користе се у циљу одређивања етиологије, процене компликација и планирања адекватног терапијског приступа.

1.1.8.1. Клиничка процена

Дијагностички приступ пептичној улкусној болести заснива се на интеграцији клиничке процене, стратификацији ризика и рационалној примени ендоскопских и неинвазивних дијагностичких метода. Избор стратегије условљен је животном доби пацијента, спектром симптома, присуством фактора ризика и клиничком сумњом на компликације. Дијагностички процес започиње детаљном анамнезом и циљаним физикалним прегледом који имају за циљ процену типичних симптома, као што су: епизодичан, непулсирајући епигастрични бол који се не шири, појава бола у ноћним сатима и бол који се ублажава или погоршава након уноса хране, зависно од локализације улкуса (119). Потребно је трагати за алармантним симптомима, међу које спадају појава мелене или хематемезе, анемија, отежано гутање, необјашњив губитак телесне масе, перзистентно повраћање, као и постојање палпабилне абдоминалне масе. Ови симптоми указују на могућност компликоване болести или потенцијалне малигнитете и захтевају хитну и инвазивну дијагностику (119, 125). Ипак, клиничке карактеристике немају довољну сензитивност ни специфичност да би поуздано разграничиле пептични улкус од функционалне диспепсије или других обољења горњег гастроинтестиналног тракта. Стога се дијагноза пептичне улкусне болести не може поставити искључиво на основу клиничке слике (119). За особе млађе од 60 година, које немају алармантне симптоме, актуелне смернице препоручују неинвазивну стратегију „тестирај и лечи“ усмерену на откривање инфекције *H. pylori*. За доказивање активне инфекције користе се тестови високе дијагностичке тачности: уреа-издисајни тест и присуство антигена у столицама. Ове методе имају високу сензитивност и специфичност за активну инфекцију, док се серолошки тестови више не препоручују јер не разликују активну од пређашње инфекције, те нису корисни ни у процени успешности ерадикације (17, 124, 126). Уколико се утврди присуство *H. pylori*, започиње се ерадикациона терапија (17).

1.1.8.2. Езофагогастродуоденоскопија

Ендоскопија горњег гастроинтестиналног тракта (езофагогастродуоденоскопија) представља златни стандард у постављању дијагнозе, јер омогућава: директну визуелизацију улкуса (Слика 5), узимање биопсија за доказивање *H. pylori*, процену сумње на карцином, нарочито код улкуса желуца (2, 26, 119). Ендоскопија показује изузетно високу дијагностичку вредност, са осетљивошћу од око 92% и специфичношћу од 100%, што је чини значајно прецизнијом у односу на радиолошки преглед са двоструким контрастом (баријум), чија је осетљивост знатно нижа (око 54%), а специфичност приближна, око 91% (17). Ендоскопија је неопходна у следећим ситуацијама: пацијенти старији од 60 година са диспепсијом, пацијенти било које доби са алармантним симптомима, перзистентни симптоми упркос спроведеној неинвазивној терапији (2, 17, 119). Током процедуре препоручује се узимање више биопсија из слезнице желуца (уз избегавање дна улкуса) ради поузданог откривања *H. pylori* као и биопсија ивица сваког желудачног улкуса ради искључења малигнитета. Након терапије, код свих пацијената са улкусом желуца препоручује се контролна ендоскопија, јер се у око 2% случајева у улкусу може налазити карцином (2, 17).

Код педијатријске популације, ултразвук гастроинтестиналног тракта са контрастним средством (енгл. *contrast-enhanced ultrasound*, CEUS) показује висок проценат подударња са налазом на езофагогастродуоденоскопији (око 95%), што га чини обећавајућом, неинвазивном методом за иницијалну процену, иако езофагогастродуоденоскопија остаје златни стандард (127). Ултразвук желуца са оралним контрастним средством (енгл. *oral contrast ultrasonography*, OCUS) такође је показао велики проценат тачности у откривању и праћењу бенигну улкуса, без лажно

позитивних налаза у поређењу са гастроскопијом, што указује на његову потенцијалну корист код пацијената код којих ендоскопија није могућа (128).



Слика 5. Улкус желуца уочен на езофагогастроуденоскопији.

1.1.8.3. Дијагностика компликованих улкуса

Код компликованих клиничких презентација, нарочито када постоји сумња на перфорацију улкуса, компјутеризована томографија (енгл. *computed tomography*, СТ) абдомена представља метод избора. СТ има изузетно високу сензитивност, која у појединим студијама достиже и до 98%, чиме премашује све друге доступне радиолошке модалитете. Ова метода омогућава поуздано откривање слободног ваздуха у перитонеалној дупљи, прецизно одређивање локализације и величине перфорације, као и искључивање других узрока акутног абдомена. Типични СТ налази који указују на перфорацију улкуса обухватају присуство екстралуменског гаса, фокални дефект у зиду желуца или дванаестопалачног црева, задебљање зида и масну инфилтрацију (енгл. *fat stranding*) у пределу желуца и дванаестопалачног црева (20, 120, 129).

Иако стандардна рендгенографија (усправни снимак грудног коша или абдомена) може открити пнеумоперитонеум, њена сензитивност је значајно нижа, у просеку око 75%. Поред тога, рендгенски снимак не може поуздано одредити етиологију или тачну локализацију перфорације, што ограничава његову дијагностичку вредност у хитним стањима (20, 120).

Ултразвучни преглед абдомена има ограничену улогу у дијагностици пептичне улкусне болести код одраслих. Рутински ултразвук абдомена је мање осетљив, у великој мери зависи од искуства оператера и тешко визуализује слузницу желуца и дванаестопалачног црева због интерференције ваздуха. Иако ултразвук у појединим случајевима може регистровати слободан ваздух у перитонеалној дупљи, нарочито у хитним ситуацијама као такозвани ултразвук поред кревета болесника (енгл. *point of care ultrasound*, POCUS), он се још увек не сматра поузданим инструментом за примарну дијагнозу перфоративних улцерација (120).

Лабораторijske анализе (параметри запаљења, електролити, хемоглобин) и додатне дијагностичке методе користе се за процену хемодинамске стабилности и компликација, нарочито у акутним, животно угрожавајућим стањима (33).

1.1.9. Лечење

Лечење пептичне улкусне болести обухвата више терапијских компоненти и прилагођава се етиологији обољења, присуству компликација и индивидуалним факторима ризика. Основни терапијски циљеви су: постизање зарастања улкуса, елиминација инфекције *H. pylori* (ако је присутна), спречавање рецидива болести и адекватно збрињавање компликација (2, 17, 119).

1.1.9.1. Супресија лучења киселине и зарастање улкуса

PPIs међу којима се најчешће примењују омепразол, есомепразол, пантопрозол, лансопрозол и рабепразол представљају основу фармаколошког лечења пептичне улкусне болести. Ови лекови делују снажном и дуготрајном супресијом лучења желудачне киселине путем блокаде H^+/K^+ -АТФ-азе у паријеталним ћелијама, чиме се стварају оптимални услови за зарастање улкуса (130). Оваква инхибиција киселине смањује штетно дејство хлороводоничне киселине и пепсина на слузницу желуца, подстичући реепителизацију и обнављање интегритета слузнице (2, 17). Захваљујући својој високој ефикасности, PPIs су готово у потпуности потиснули антагонисте H_2 рецептора и аналоге простагландина, јер обезбеђују значајно веће стопе ендоскопски потврђеног зарастања улкуса и бржу резолуцију симптома. Клиничке студије доследно показују супериорност PPIs у лечењу улкуса желуца и дванаестопалачног црева у поређењу са H_2 антагонисте. PPIs имају и кључну улогу у ерадикационим режимима *H. pylori*, јер повећање рН желудачног садржаја значајно побољшава деловање антимикробних лекова и укупну стопу успешне ерадикације (2, 17, 119). Код пацијената који захтевају дуготрајну терапију NSAIDs, PPIs су ефикасни и у примарној и у секундарној превенцији улкуса индукованих применом NSAIDs и њихових компликација (2, 119, 131). PPIs имају посебан значај у акутном збрињавању крварећих улкуса, где примена високих интравенских или оралних доза након ендоскопске интервенције значајно смањује ризик од рецидива крварења и побољшава укупни клинички исход (85). Иако се PPIs сматрају безбедним лековима, препоручује се примена најниже ефикасне дозе у што краћем неопходном трајању, будући да се дуготрајна употреба повезује са благим порастом ризика од одређених нежељених ефеката као што су цревне инфекције, преломи костију и поремећаји функције бубрега. Ипак, укупни апсолутни ризик остаје низак, а клиничке користи у лечењу улкуса и превенцији компликација значајно надмашују потенцијалне негативне ефекте када се лекови користе у адекватним индикацијама (85, 132, 133).

H_2 -антагонисти (ранитидин, фамотидин) делују инхибиторно на хистаминске H_2 рецепторе паријеталних ћелија, чиме смањују базалну и стимулисану секрецију хлороводоничне киселине. Иако су некада били основа терапије пептичног улкуса, њихова ефикасност је ограничена у односу на PPIs, а толеранција која се развија током терапије додатно умањује њихов дугорочни ефекат (134).

Вонопрозан представља иновативни инхибитор киселине који делује брже и снажније од класичних PPIs. Његова фармакодинамичка стабилност и продужено дејство омогућавају конзистентну и потпуну супресију киселине (135). Због изразито високе ефикасности, посебно у ерадикацији *H. pylori* резистентне на кларитромицин, онопрозан се све више позиционира као препарат прве линије у савременој гастроентеролошкој пракси (136).

1.1.9.2. Ерадикација *H. pylori*

Ерадикација *H. pylori* представља кључни корак у лечењу пептичне улкусне болести, јер не само да убрзава зарастање улкусних лезија већ и значајно смањује ризик од њиховог поновног јављања. Избор прве линије терапије условљен је локалним обрасцима антибиотске резистенције, што наглашава важност прилагођавања терапијских протокола регионалним епидемиолошким подацима. Терапијске опције прве линије су четворострука терапија базирана на бизмуту, која укључује PPIs, бизмут, тетрациклин и метронидазол, као и конкомитантна четворострука терапија која није базирана на бизмуту, која се састоји од PPIs, амоксицилина, кларитромицина и метронидазола. Обе терапијске опције спроводе се у трајању од 10 до 14 дана, уз показане стопе успешне ерадикације од приближно 85-91% (2, 85, 119). Трострука терапија базирана на кларитромицину (PPIs, амоксицилин, кларитромицин) више није универзално препоручена као раније. Њена примена ограничена је само на области са ниском учесталошћу резистенције на кларитромицин, јер повећана резистенција драматично умањује њену ефикасност (2, 85). Уколико терапија прве линије не постигне ерадикацију, примењују се спасилачке терапије. Најчешћа опција је трострука терапија заснована на левофлорсацину. За упорне, рефракторне инфекције могу се размотрити двострука терапија заснована на високим дозама (PPIs уз амоксицилин) или терапија заснована на рифабутину (119). Потврда успешне ерадикације је неопходан део протокола лечења. Најпоузданије методе су уреа-издисајни тест и одређивање антигена *H. pylori* у столици. Тестирање треба обавити најраније четири недеље након завршетка терапије и најмање две недеље након престанка узимања PPIs, како би се избегли лажно негативни резултати (17, 119).

1.1.9.3. Цитопротективни лекови

Цитопротективни лекови представљају групу лекова која штите слузницу желуца и дванаестопалачног црева од оштећења путем јачања ендогених механизма одбране, а не супресијом секреције желудачне киселине. Концепт цитопротекције први је дефинисан у истраживањима простагландина, који су показали способност да спрече хемијски изазвана оштећења слузнице без утицаја на секрецију киселине (137, 138). Поред простагландина и њихових аналога (нпр. мизопростол), у цитопротективне агенсе убрајају се сукралфат, као и неки антациди са додатним протективним својствима (137, 139).

На молекулском нивоу, цитопротективни лекови делују стимулацијом секреције слузи и бикарбоната, побољшањем локалног крвотока у слузници, убрзавањем реституције епитела и неутрализацијом слободних радикала. Аналози простагландина повећавају продукцију слузи и бикарбоната и унапређују перфузију слузнице, док сукралфат формира заштитни филм на површини улцерисаног ткива и везује факторе раста, подстичући процес зарастања (137, 139). Поједини антациди, попут хидроталцита, испољавају цитопротективан ефекат везивањем и инактивацијом пепсина, жучних киселина и токсина *H. pylori*, као и индукцијом синтезе простагландина (139).

У клиничкој пракси, цитопротективни агенси најчешће се примењују у лечењу пептичких улкуса код пацијената који морају дугорочно користити NSAIDs и имају висок ризик од компликација, или у случајевима када је терапија инхибиторима лучења киселине контраиндикована или неподношљива. Мизопростол је доказано ефикасан у превенцији улкуса индукованих применом NSAIDs, али његову широку примену ограничавају гастроинтестинални нежељени ефекти, попут дијареје и абдоминалног бола (2, 140). Сукралфат се понекад користи у лечењу улкуса дванаестопалачног црева, нарочито код пацијената који не могу користити PPIs или H₂ антагонисте, мада се његова

ефикасност генерално сматра мањом у односу на PPIs. Ова група лекова може бити корисна и у секундарној профилакси код пацијената са историјом компликација пептичне улкусне болести који морају наставити терапију улцерогеним лековима (2).

1.1.9.4. Контрола инфламације у пептичном улкусу

Последњи напредак у лечењу пептичне улкусне болести усмерен је ка развоју нових антиинфламацијских терапијских стратегија и интензивнијем истраживању фитотерапије, посебно биљних једињења са гастропротективним својствима. Иако PPIs и даље представљају основу стандардног лечења, њихову примену ограничавају нежељени ефекти, ризик од рецидива и потенцијалне интеракције са другим лековима, што подстиче интересовање за алтернативне терапијске приступе (141, 142).

У оквиру савремених антиинфламацијских стратегија за лечење пептичне улкусне болести посебан фокус се све више усмерава на природне флавоноиде. Рутин, флавоноид присутан у бројним биљкама, у експерименталним моделима показује антиинфламацијска и гастропротективна својства, превасходно супресијом инфламације и ензима COX-2 (142). Флавоноиди као група једињења испољавају цитопротективне, антиоксидативне и антиинфламацијске ефекте, јачају одбрамбене механизме слузнице и смањују улцерогене факторе у претклиничким студијама (143). Посебан потенцијал показују цијанидин и цијанидин-3-глукозид, антоцијани присутни у разним врстама воћа, који у предклиничким истраживањима смањују инфламацију желудачне слузнице и липидну пероксидацију (144). Монотерпени, још једна група биљних једињења, доказали су антиулцерозну активност у *in vitro* и *in vivo* моделима, укључујући деловање против улцерогених фактора као што су NSAIDs и *H. pylori* (145).

Иако су претклинички резултати охрабрујући, њихова примена у клиничкој пракси остаје ограничена због недовољног броја квалитетних рандомизованих контролисаних студија. Медицинска литература истиче потребу за ригорозним клиничким испитивањима која би потврдила ефикасност и безбедност фитотерапијских агенаса у поређењу са стандардним терапијама (146, 147). Поред тога, контрола и стандардизација биљних препарата кључни су предуслови за њихову интеграцију у лечењу пептичне улкусне болести заснованом на доказима.

1.1.9.5. Лечење компликација пептичне улкусне болести

Приступ лечењу компликације пептичне улкусне болести одређује се у зависности од типа компликације, клиничке стабилности пацијента и етиологије основне болести. Акутно неварикозно крварење из горњег партија гастроинтестиналног тракта услед улкуса захтева хитну процену стања и реанимацију са надокнадом течности кристалоидима ради стабилизације циркулације, а трансфузија се спроводи у случају значајније анемије (2, 17). Ендоскопско лечење крварећег улкуса подразумева примену метода као што су ињекциона терапија (адреналин/склерозанси), термокоагулација, механичка хемостаза клипсовима или комбиноване технике, уз могућност примене хемостатских прахова у рефрактерним случајевима (148). Уколико ендоскопска хемостаза не успе или се крварење понавља, спроводи се хируршко лечење у виду прошивања крварећег улкуса, ваготомије са дренажним поступком или парцијалне гастректомије код опсежнијих лезија (149).

Код перфорације, почетно збрињавање подразумева хитну ресусцитацију, примену антибиотика широког спектра, обуставу пероралног уноса и пласирање назогастричне сонде. Хируршки третман је најчешћи избор а репаративни лапароскопски приступ је препоручен у случајевима мањих перфорација (2, 150). Конзервативно лечење се може разматрати код младих, стабилних пацијената без знакова дифузног перитонитиса, уз услов да су симптоми благи и под контролом. У случају великих или

компликованих перфорација може бити неопходна парцијална гастректомија или опсежнија хируршка интервенција, док се ендоскопска затварања дефекта и радиолошка дренажа примењују само у специфично одабраним случајевима (33, 151, 152).

Опструкција излазног тракта желуца улкусом најпре се третира пласирањем назогастричне сонде ради смањења ризика од аспирације и боље видљивости током ендоскопије. Ендоскопска дилатација балоном представља ефикасну и прву линију терапије, док се постављање привремених металних стентова или гастроентеростомија вођена ендоскопским ултразвуком користе у рефрактерним случајевима или када пацијент није кандидат за хирургију, мада честе миграције стентова ограничавају њихову примену. Хируршка гастроентеростомија или пилоропластика резервисане су за случајеве у којима ендоскопски третман није успешан (2). У лечењу свих компликација од пресудне је важности отклањање узрока болести, ерадикација *H. pylori* и обустава конзумације алкохола и NSAIDs терапије, чиме се значајно смањује ризик од поновног јављања улкуса и побољшава укупан терапијски исход (17, 33).

1.2. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ АКУТНОГ ОШТЕЋЕЊА СЛУЗНИЦЕ ЖЕЛУЦА

У истраживању пептичне улкусне болести неопходно је располагати поузданим и валидним експерименталним моделима који омогућавају прецизну процену патогенетских механизма и антиулкусног дејства лекова, биолошки активних једињења, природних супстанци и фитотерапеутика. Ови модели не представљају само техничко средство за индукцију оштећења слузнице, већ и кључни методолошки оквир за разумевање сложених патофизиолошких процеса који стоје у основи улцерогенезе. Кроз систематско испитивање промена у епителној баријери, микроциркулацији, оксидативном статусу и имунском одговору, експериментални модели пружају увид у механизме који погодују развоју оштећења, као и у начине на које различити агенси могу деловати цитопротективно, антиинфламацијски, антиоксидативно или антисекреторно. Сложеност пептичне улкусне болести огледа се у чињеници да ниједан модел не може у потпуности репродуковати све аспекте људске патологије. Због тога је развијен читав спектар модела акутног оштећења слузнице желуца, при чему сваки од њих обухвата одређене компоненте патогенезе, било да се ради о поремећају одбрамбене баријере, хиперсекрецији киселине, редукованом протоку крви, непосредном цитотоксичном оштећењу, инфламацији или оксидативном стресу. Управо ова разноврсност омогућава дубље и диференцијално разумевање улцерогенезе, али истовремено захтева пажљив методолошки избор (153).

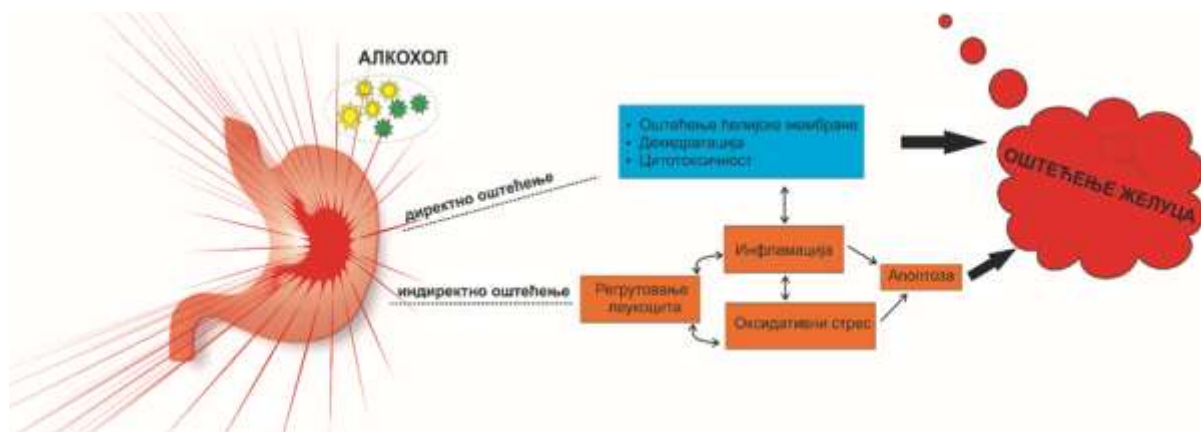
Међу најчешће коришћеним моделима налазе се они изазвани етанолом, стресом и употребом NSAIDs. Ови модели по својој природи имају бројне предности, од високе репродуктивности, кратког времена потребног за развој лезија, до могућности специфичног тестирања одређених патофизиолошких осовина, као што су секреција киселине, интегритет слузи, инфламација и оксидативни процеси. Сходно томе, избор најадекватнијег анималног модела у великој мери зависи од примарних циљева истраживања, јасно дефинисаних хипотеза и експерименталних услова у којима се студија изводи (153, 154).

1.2.1. Модел акутног оштећења слузнице желуца изазван етанолом

Модел етанолом изазваног оштећења слузнице желуца представља један од најчешће коришћених експерименталних приступа у изучавању пептичне улкусне болести. Овај модел веродостојно репродукује патогенетске процесе који се одвијају у акутној фази настанка улкуса, као и током њихове егзацербације, обухватајући велики број компоненти укључених у оштећење слузнице, од директне цитотоксичности и васкуларних поремећаја до инфламације и изразитог оксидативног стреса (Слика 6) (155-

158). Управо због широког спектра механизма које активира и високе репродукцибилности, овај модел се нашироко користи у истраживањима патогенезе пептичног улкуса, као и у процени ефикасности различитих терапеутских агенаса (154). Патогенеза етанолом изазваних улцерација је комплексна и подразумева више истовремених, међусобно повезаних механизма. Етанол директно нарушава интегритет епитела слузнице желуца смањујући количину и вискозност заштитне слузи, компромитујући микроциркулацију и појачавајући секрецију хлороводоничне киселине, делом путем хистаминергичних механизма (153, 154). Растворљивошћу мукозног слоја и дестабилизацијом мембранских фосфолипида етанол оставља епител изложеним протеолитичком и хидролитичком дејству киселине и пепсина, уз значајно повећање пропустљивости и губитак ћелијске хомеостазе. Поред директног оштећења епитела, етанол ремети васкуларну хомеостазу подстичући ослобађање вазоактивних медијатора што изазива поремећаје у протоку крви, исхемију, едем, хиперимију и крварење (154). Метаболички путеви етанола додатно погоршавају оштећење. Под дејством алкохол-деhidрогеназе, етанол се метаболише у ацеталдехид, који се даљом оксидацијом преко ксантин-оксидазе претвара у реактивне кисеоничне врсте. Ови слободни радикали подстичу липидну пероксидацију, нарушавају функцију ендотела капилара и дестабилизују мембране епителних ћелија (154-156). Прекомерна продукција слободних радикала, удружена са падом активности антиоксидативних ензима, изазива повећан оксидативни стрес, један од централних механизма оштећења у овом моделу (155, 156). Значајан додатни патогенетски аспект представља инфламацијски одговор. Ослобађање DAMPs молекула активира урођени имунолошки систем путем NF- κ B сигналног пута, индукујући продукцију проинфламацијских цитокина (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, IFN- γ) и хемокина који привлаче неутрофиле (157, 158). Након активације, неутрофили представљају снажан извор слободних радикала и протеолитичких ензима који убрзавају деградацију липидних и протеинских компоненти епитела, индукујући различите облике ћелијске смрти попут некрозе, апоптозе и аутофагије, продубљујући тиме оштећење (156-158).

За изазивање улцерација, животињама се након периода гладовања у трајању од 24 часа апликује етанол концентрације 70-100% апликује оралном гаважом у дози 4-10 mL/kg телесне масе. Животиње се затим жртвују 1-3 сата након индукције модела (155-158).



Слика 6. Схематски приказ механизма акутног оштећења слузнице желуца изазваног етанолом.

1.2.2. Модел акутног оштећења слuzнице желуца изазван употребом NSAIDs

NSAIDs као што су индометацин, аспирин и ибупрофен рутински се користе за индукцију улкуса желуца код пацова и мишева, јер поуздано изазивају оштећење слuzнице и представљају један од најчешће примењиваних експерименталних модела за испитивање антиулкусне активности (154). NSAIDs блокирају ензим COX-1 и COX-2, смањују продукцију простагландина и тиме ремете механизам одбране слuzнице што је чини осетљивом на дејство желудачне киселине (159). Додатно, NSAIDs узрокује оксидативни стрес и инфламацију, што убрзава формирање улкуса (154). Аспирин, индометацин и бруфен најчешће се користе као улцерогени агенси у индукцији улкуса (160-162). Улцероген се обично даје оралним путем („*per os*“) или поткожно у одговарајућем растварачу након гладовања животиња у трајању 24-36 сати. Оралне дозе најчешће коришћених NSAIDs обухватају аспирин у опсегу од 125-150 mg/kg, индометацин у дози од 25-100 mg/kg, док се за индукцију улкуса ибупрофен најчешће примењује у дози од око 200-400 mg/kg телесне масе. Жртвовање животиња се изводи обично 4-8 часова након индукције оштећења слuzнице желуца (153, 160-162).

1.2.3. Модел акутног оштећења слuzнице желуца изазван стресом у води

Стрес може изазвати улцерације код људи, па је развијен анимални модел који комбинује имобилизацију и урањање у воду (обичну или хладну) ради опонашања ових услова. Ова комбинација делује синергистички и изазива акутне стрес-лезије код животиња, чији морфолошки и хистопатолошки изглед подсећа на пептичне улкусе код људи. Због тога се модел широко користи за испитивање потенцијалних антиулцерогених супстанци (153). Стресом изазвани улкуси најчешће се јављају као један или више дефеката слuzнице, а њихова патофизиологија је мултифакторијелна: укључује повећану секрецију киселине, смањену продукцију слuzи, рефлукс панкреасних ензима и редукован проток крви у слuzницу (153, 163, 164). Повећана вагална активност додатно доприноси овим променама (165). Индукција улкуса подразумева претходно гладовање животиња (24-36 сати), затим смештање у појединачне кавезе са ограниченим кретањем и урањање у воду до нивоа ксифоидног наставка: 17 часова у води 15–20°C (енгл. *water-immersed model*), 2-4 часа у хладној води (енгл. *cold-water model*), или 2-4 часа у расхлађеном простору на 2-3°C (енгл. *cold-restraint model*) (153).

1.2.4. Модел акутног оштећења слuzнице желуца изазван исхемијом са реперфузијом

Слuzница гастроинтестиналног тракта представља једно од метаболички најактивнијих ткива у организму и као таква је изразито осетљива на поремећаје у снабдевању крвљу. Иако иницијална исхемија смањује доток кисеоника и нутријената, најзначајније оштећење настаје током фазе реперфузије, када нагли повратак крвотока омогућава интензивно стварање реактивних кисеоничних врста. Ови слободни радикали нарушавају интегритет епителних ћелија, изазивају липидну пероксидацију, деградацију протеина и дисфункцију ендотела, што резултује развојем ерозија и улцерација у слuzници желуца. Због тога се модел исхемијско-реперфузионог оштећења сматра једним од најбољих модела за проучавање улоге оксидативног стреса у патогенези пептичне улкусне болести (153, 166). У експерименталном поступку животиње се након гладовања у трајању од 24 часа анестезирају да би се омогућило извођење хируршке интервенције без стреса и бола. Лапаротомијом се приступа гастроинтестиналном тракту, а проксимални и дистални крај желуца привремено се затварају специјалним клипсима, чиме се стабилизује орган и спречава пасажа садржаја. Целијачна артерија се подвезује васкуларном стезаљком на месту приближно 0,5 cm дистално од њеног

одвајања од абдоминалне аорте. Ова оклузија траје 30 минута и симулира акутну исхемију слезнице желуца. Након периода исхемије, стезалка се уклања, чиме се омогућава реперфузија у трајању од 20 минута, током које се јавља масивно стварање слободних радикала и настанак карактеристичних лезија. По завршетку експерименталне процедуре животиње се жртвују (153).

1.2.5. Ређе коришћени модели (хистамин, резерпин, метилен плаво)

Улкус желуца може бити изазван различитим патофизиолошким механизмима, а један од значајних је појачано ослобађање хистамина, што представља основу за модел улкуса индукованог хистамином. Хистамин не само да интензивно стимулише секрецију желудачне киселине, већ истовремено ремети интегритет слезнице, нарушава микроциркулацију, појачава мотилитет и смањује продукцију заштитне слузи. Његово дејство укључује снажну активацију паријеталних ћелија и изражену вазодилатацију, чиме настаје повећана васкуларна пермеабилност, која и чини слезницу осетљивијом на оштећење (153, 167). Ови ефекти чине хистамински модел посебно погодним за процену делотворности антисекреторних лекова и H₂-блокатора. У практичној примени модела, након периода гладовања у трајању од око 18 часова, животињама се поткожно апликује хистамин у дози од 40-100 mg/kg. Две сата након апликације животиње се жртвују ради процене улцерација (153).

Резерпин се такође користи за индукцију улкуса тако што подстиче дегранулацију мастоцита у желуцу и ослобађању хистамина, што је вероватно посредовано холинергичким системом (168). Животињама се након периода гладовања од 24-36 часова интраперитонеално апликује резерпин у једној дози (0,5-10 mg/kg). Животиње се жртвују 24 часа након индукције модела (153, 169).

Метилен плаво делује као раздвајач АТФ-аза, извор супероксидних радикала и инхибитор синтазе азот-оксида, чиме ремети микроциркулацију и изазива оксидативни стрес доводећи до настанка лезија слезнице желуца. Такође овај агенс активира холинергички систем. Због наведеног модел је користан у процени антиулкусних агенаса са антихолинергичким ефектима и антисекреторним ефектима. Животињама се након периода гладовања од 24 часа апликује метилен плаво у дози 100 mg/kg оралном гаважом. Животиње се жртвују након 4 часа од индукције модела (153, 170).

1.3. IL-33/ST2 ОСОВИНА

IL-33 и његов рецептор ST2 (енгл. *suppression of tumorigenicity 2*) представљају важну сигналну осовину која учествује у регулацији инфламацијских и имунских одговора, нарочито на нивоу епителних баријера. IL-33 припада породици цитокина IL-1 и делује као алармин који се ослобађа након оштећења ткива, док ST2, који је експримиран на бројним ћелијама имунског система, посредује његове биолошке ефекте. Активација IL-33/ST2 осовине повезана је са модулацијом урођене и стечене имуности, а њена улога је препозната у различитим инфламацијским, инфективним, аутоимунским и онколошким обољењима.

1.3.1. Историјски развој и еволуција IL-33/ST2 осовине

Молекул данас познат као IL-33 први пут је описан почетком 2000-их година, када су његов ендогени протеин и информациона RNA (енгл. *mesenger ribonucleic acid, mRNA*) поуздано идентификовани у људским ткивима (171). У тренутку открића означен је као нуклеарни фактор венула са високим ендотелом (енгл. *nuclear factor from high endothelial venules, NF-HEV*), које имају кључну улогу у миграцији лимфоцита у секундарне лимфне органе и представљају важну анатомску и функционалну карику имунског надзора (171, 172). Ране студије показале су да је NF-HEV/IL-33 mRNA високо

експримирана у више лимфоидних ткива, укључујући крајнике, Пајерове плоче и лимфне чворове, а ген који је кодира касније је мапиран на кратком краку хромозома 9 (9p24.1), уз идентификацију одговарајућег мишјег ортолога (171). Кључни помак у разумевању улоге овог молекула уследио је када су *Schmitz* и сарадници (173) показали да С-терминални домен NF-HEV протеина поседује тродимензионалну структуру типичну за цитокине породице IL-1 и да испољава јасно дефинисану цитокинску активност. Показано је да овај домен активира рецептор ST2, претходно описан као “*orphan*” рецептор, односно рецептор без познатог лиганда и на тај начин покреће имунске одговоре тип 2. На основу ових структурних и функционалних резултата, аутори су предложили да NF-HEV буде прекласификован као нови члан IL-1 породице и да понесе назив IL-33. Након тога, додатна истраживања су недвосмислено потврдила да су IL-33 и NF-HEV заправо исти протеин, као и да IL-33 у *in vivo* условима функционише као нуклеарни фактор чврсто повезан са хроматином (174).

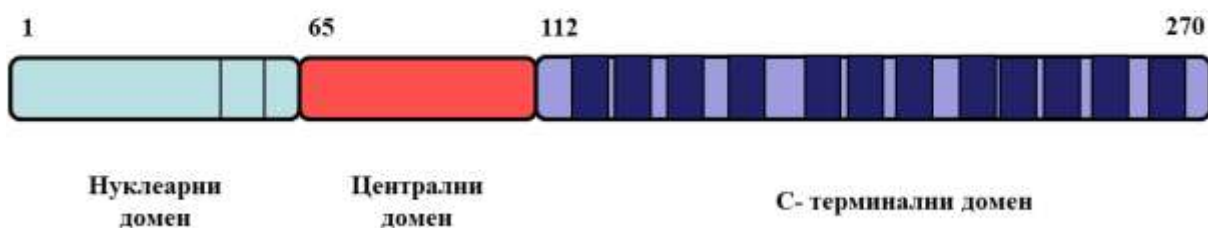
Ова рана открића поставила су основу савременог концепта IL-33 као молекула са потенцијално двоструком функцијом: с једне стране нуклеарног регулатора, а с друге стране потентног екстрацелуларног цитокина. Тај двојни идентитет IL-33 позиционира га у сам центар интересовања савремене имунологије, будући да учествује у регулацији имунског одговора, развоју и одржавању инфламације, као и патогенези бројних болести посредованих дисфункцијом имунског система.

1.3.2. Биолошка структура, геномска организација и биоактивне форме IL-33

IL-33 се конститутивно експримира у здравом ткива мишева и људи, при чему је доминантно локализован у једру епителних и ендотелних ћелија, кератиноцита, мезенхимских стромалних ћелија и ћелијама сличним фибробластима у лимфним чворовима, дакле у оним структурама које представљају кључне баријере и прву линију заштите организма (175-177). Одликује се грађом из три региона или домена која обухвата N-терминални нуклеарни домен, централни или „сензорни“ домен и С-терминални цитокински домен (Слика 7) (178, 179).

N-терминални део молекула (аминокиселине 1-65) садржи секвенцу за нуклеарну локализацију и мотив за везивање за хроматин, што омогућава његово стабилно задржавање у једру при физиолошким условима (179). Централни домен (аминокиселине 66-111) делује као „сензор“ оштећења и подлаже прецизној протеолитичкој обради од стране инфламацијских протеаза, као што су неутрофилна еластаза и катепсин G, чиме настају зреле и биолошки активније форме IL-33 са значајно појачаном активношћу (179, 180). С-терминални домен (аминокиселине 112-270), који има структуру β-плоче карактеристичну за IL-1 породицу цитокина, посредује у препознавању и везивању за рецептор ST2 и покретању низа сигналних путева (181-183).

Хумани IL-33 протеин



Слика 7: Примарна структура хуманог IL-33 протеина.

Хумани *IL33* ген смештен је на хромозому 9p24.1 и садржи осам егзона распоређених на више од 42 kb геномске DNA (енгл. *deoxyribonucleic acid*). Мишији *Il33* ген има идентичну организацију егзона, али се налази на хромозому 19qC1 (184). Полиморфизми повезани са повећаном склоношћу ка астми концентрисани су углавном у промоторској регији и интрону 1, што указује на њихов потенцијални утицај на регулацију транскрипције *IL-33* (185, 186). Код глодара су идентификована два алтернативна промотора која продукују *IL33a* и *IL33b* транскрипте са различитим 5' некодирајућим регионима, али који кодирају идентичан протеин (187, 188). Јака еволуциона очуваност N-терминалног домена *IL-33*, укључујући мотив за везивање за хистоне, указује да је нуклеарно задржавање један од централних механизма регулације његове биолошке активности (189, 190). Иако су рана истраживања указивала да *IL-33* у једру може деловати као транскрипциони супресор (191), нема убедљивих доказа да ендогени *IL-33* директно контролише експресију гена. Данас се сматра да су нуклеарна локализација и везивање за хроматин преваходно успостављени ради ограничавања екстрацелуларне цитокинске активности *IL-33*, а не ради регулације транскрипције. Овај механизам нуклеарног задржавања има кључну физиолошку улогу јер спречава неконтролисано ослобађање изразито проинфламацијског *IL-33* и на тај начин одржава ткивну хомеостазу (189, 190).

Ослобађање *IL-33* из ћелија у тесној је вези са степеном и врстом ткивног оштећења. Пошто овај цитокин не поседује сигнални пептид, он не користи класични секреторни механизам који укључује ендоплазматски ретикулум и Голџијев апарат. Уместо тога, *IL-33* се понаша као алармин, молекул чије се избацавање у екстрацелуларни простор дешава нагло, најчешће након некрозе, механичке повреде или израженог ћелијског стреса (175, 192). У таквим ситуацијама, *IL-33* се детектује ван ћелије у кратком временском оквиру, од неколико минута до неколико сати, што је праћено нестанком његове нуклеарне сигнализације у епителним ћелијама (175, 193). Овај временски образац указује да ослобађање *IL-33* представља рани биолошки одговор на нарушени ћелијски интегритет, чак и онда када морфолошки показатељи некрозе још нису присутни. На тај начин *IL-33* делује као иницијални „сензор оштећења“, који активира локалне инфламацијске и регенеративне процесе (175, 193, 194). Са аспекта структуре и функционалне зрелости, *IL-33* је присутан у више биоактивних варијанти које омогућавају различите сигналне исходе. Иако се претходно сматрало да протеолитичка обрада представља предуслов за његову активацију, данас је јасно да прекурсорска, пуна дужина молекула *IL-33* (енгл. *full length IL-33*, *IL-33FL*) поседује сопствену биолошку активност и може директно иницирати ST2-зависне сигналне каскаде, укључујући активацију NF-κB и продукцију различитих цитокина (175, 195). Конститутивно висока експресија *IL-33* у здравим ткивима, очувана биолошка активност прекурсорске, пуне дужине молекула *IL-33* и брзо ослобађање након механичког оштећења или некрозе јасно потврђују улогу овог молекула као алармина. Истовремено, у инфламацијским условима, серин протеазе које потичу од неутрофила и мастоцита, као што су еластаза, катепсин G, протеиназа 3, триптаза, химаза и гранзим B, прецизно разлажу централни домен молекула. На тај начин настају краће, зреле изоформе (*IL-33*⁹⁵⁻²⁷⁰, *IL-33*⁹⁹⁻²⁷⁰, *IL-33*¹⁰⁵⁻²⁷⁰, *IL-33*¹⁰⁹⁻²⁷⁰), које показују знатно већи афинитет и снажнију биолошку активност у односу на прекурсорску форму (175, 180, 193, 196). Ови резултати указују да протеолитичка конверзија представља кључан регулаторни корак у финој модулацији интензитета и динамике имунског одговора посредованог путем *IL-33*.

1.3.3. ST2 рецептор и регулација активности *IL-33*

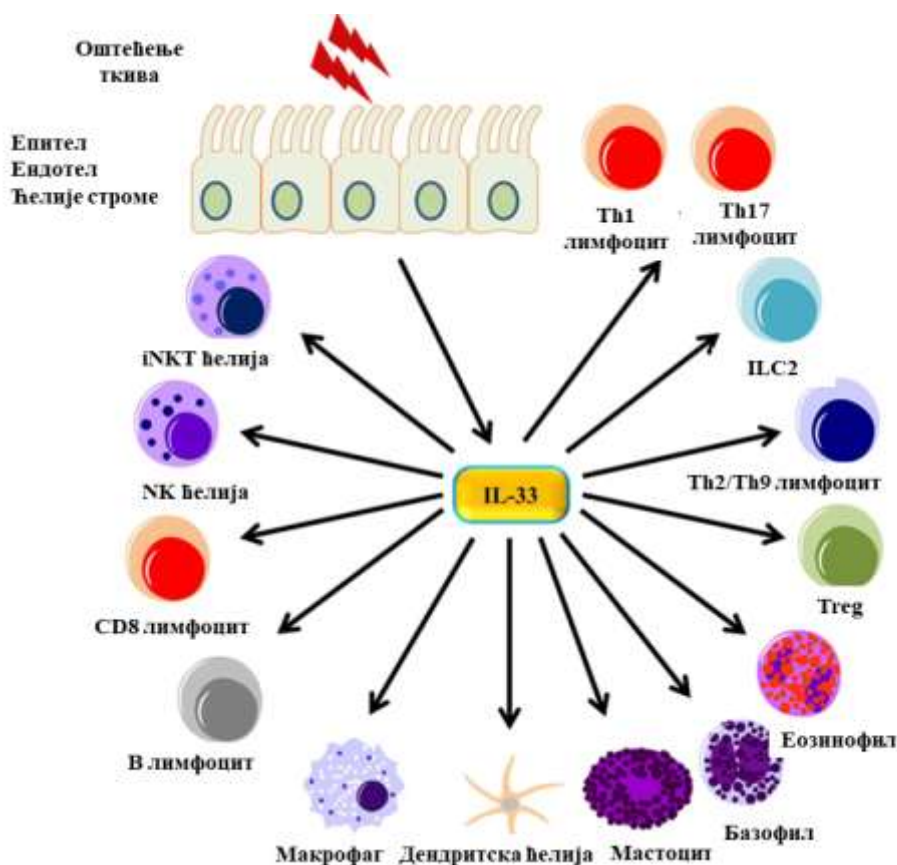
IL-33 представља плејотропни цитокин чије биолошко дејство зависи од интеракције са специфичним рецепторским комплексом који чине молекул ST2 и

помоћни протеин рецептора за IL-1 (енгл. *IL-1 receptor accessory protein*, IL-1RAcP). Ген *IL1RL1* (енгл. *interleukin 1 receptor-like 1*) који кодира ST2 протеин локализован је на хромозому 2q12 и заузима приближно 40 kb у оквиру ширег генског кластера IL-1 (197, 198). Први опис ST2 потиче из 1989. године, када је идентификован транскрипт дужине 2,7 kb који кодира секретовани протеин молекулске масе око 37 kD, касније препознат као растворљива форма рецептора ST2 (енгл. *soluble ST2*, sST2) (199). Неколико година касније, 1993. године, описан је и дужи транскрипт који кодира мембранску изоформу рецептора ST2 (енгл. *ST2 ligand*, ST2L) (200).

Ген *IL1RL1* подлеже алтернативном спајању, што резултује настанком четири изоформе ST2 рецептора: мембранске ST2L, растворљиве sST2, као и варијанти ST2V (енгл. *ST2 variant*) и ST2LV (енгл. *ST2 ligand variant*). Мембранска и растворљива форма настају деловањем два различита промотора, што омогућава диференцијалну регулацију њихове експресије. Растворљива sST2 форма лишена је трансмембранског и цитоплазматског домена и поседује јединствен С-терминални наставак, док ST2L по својој организацији одговара рецепторима типа 1 за IL-1, са три Ig домена у екстрацелуларном делу, трансмембранским сегментом и цитоплазматским TIR (енгл. *Toll/IL-1 receptor domain*) доменом. Изоформе ST2V и ST2LV настају као последица алтернативног спајања, при чему ST2V губи трећи Ig домен и добија специфичан хидрофобни С-терминални регион, док ST2LV настаје уклањањем трансмембранског домена ST2L. Биолошки значај ових варијанти још увек није у потпуности разјашњен (201).

Структурна испитивања комплекса IL-33-ST2 показала су да је висока специфичност везивања условљена електростатичком комплементарношћу и строго дефинисаним конформационим интеракцијама. Након везивања IL-33 за ST2 долази до регрутовања IL-1RAcP и формирања трокомпонентног сигналног комплекса, што омогућава просторну апроксимацију TIR домена. Овај догађај омогућава ангажовање адапторског протеина MyD88 (енгл. *myeloid differentiation primary response 88*), са накнадном активацијом IRAK (енгл. *interleukin-1 receptor-associated kinase*) и TRAF6 (енгл. *TNF receptor-associated factor 6*), што покреће MAPK (енгл. *mitogen-activated protein kinase*) и NF-κB сигналних путева. Активирање ових каскада резултује индукцијом специфичних транскрипционих програма и продукцијом бројних медијатора инфламације (193, 194, 201). ST2 рецептор је експримиран на различитим ћелијама имунског система (Слика 8) и до данас се сматра јединственим функционалним рецептором за IL-33 (175, 194, 202). Након ослобађања у екстрацелуларни простор, IL-33 делује као снажан активатор имунског одговора тип 2, активирајући урођене лимфоидне ћелије тип 2 (енгл. *group 2 innate lymphoid cells*, ILCs2), помагачке Т (енгл. *T helper*, Th) 2 лимфоците, мастоците, еозинофиле и базофиле, што индукује повећану продукцију цитокина IL-4, IL-5 и IL-13, кључних за одбрану од паразитарних инфекција, развој алергије и процесе регенерације ткива (203-207). Паралелно с овим, IL-33 учествује у имунорегулацији и очувању ткивне хомеостазе подстичући експанзију и функционалну стабилност регулаторних Т лимфоцита (енгл. *regulatory T lymphocytes*, Tregs), као и поларизацију макрофага ка алтернативно активаном, M2 фенотипу, чиме се постиже резолуција инфламације (175, 203, 206, 208). Као алармин који се претежно експримира у епителним и ендотелним ћелијама баријера, IL-33 се брзо ослобађа након оштећења ткива и делује као рани сигнал опасности који активира локалне имунске ћелије и покреће механизме заштите и поправке (175, 194). Иако је класично повезан са имунским одговором тип 2, IL-33 у одређеним контекстима модулише и имунске одговоре тип 1 и 17, као и цитотоксичне путеве, утичући на Th1 лимфоците, CD8⁺ Т ћелије и природноубилачке ћелије (енгл. *natural killer cells*, NK), чиме доприноси антивирусној и антитуморској одбрани (205, 208, 209). Захваљујући способности да делује на широк

спектар имунских ћелија, укључујући дендритске ћелије, В лимфоците, неутрофиле и iNKT (енгл. *invariant natural killer T cells*), IL-33 представља кључну везу између урођене и стечене имуности и обликује инфламацијске одговоре у зависности од патолошког контекста (175, 206, 208).



Слика 8. Приказ ћелија имунског система које експримирају ST2 рецептор (преузето и кориговано према: *Griesenauer B et al. Front Immunol 2017; 8:475*).

Биолошка активност IL-33 подлеже вишеслојној регулацији, што је у складу са његовим изразито снажним проинфламацијским дејством. Поред механизма задржавања у једру, значајну улогу у контроли његове функције има и протеолитичка обрада. Током апоптозе, активација каспаза, пре свега каспазе-3 и каспазе-7, покреће специфично цепање IL-33 унутар домена сличног цитокинима, чиме се молекула функционално инактивира и омогућава уклањање оштећених ћелија без индукције инфламације (175, 210). Насупрот томе, у инфламацијском миљеу, различите протеазе могу или да појачају активност IL-33 трансформацијом прекурсорског молекула у високо активне зреле форме, или да допринесу његовој разградњи, чиме се ограничава трајање сигнализације (175, 193, 194). Уз то, након ослобађања у екстрацелуларни простор, IL-33 је подложен брзој оксидацији критичних цистеинских остатака, што доводи до формирања дисулфидних веза, конформационе промене и губитка способности везивања за рецептор ST2. Овај процес за резултат има нагло гашење биолошке активности IL-33 у кратком временском интервалу (211). Коначно, значајан регулаторни механизам представља и sST2, који настаје алтернативним спајањем и делује као функционални рецептор „мамац“, везујући IL-33 у циркулацији и ткивним течностима. Повишене концентрације

sST2, описане у различитим инфламацијским стањима, могу значајно да смање биорасположивост и ефекторску активност IL-33, *in vivo* (175, 197).

1.3.4. Улога IL-33/ST2 осовине у обољењима гастроинтестиналног тракта

IL-33/ST2 сигнална осовина игра значајну улогу у обољењима гастроинтестиналног тракта, где учествује у одговору слузнице на оштећење и процесима ткивне хомеостазе. IL-33 се експримира у епителним ћелијама гастроинтестиналне мукозе и делује као алармин који се ослобађа услед ткивног оштећења. Ефекти активације IL-33/ST2 осовине у гастроинтестиналном тракту су двојачке природе и у великој мери зависе од биолошког контекста, експерименталног модела као и саме фазе болести, при чему могу имати протективну улогу у регенерацији слузнице, али и допринети одржавању или појачавању инфламације.

1.3.4.1. *H. pylori* инфекција

IL-33 има вишеструку улогу у патогенези *H. pylori* инфекције. Током *H. pylori* инфекције експресија IL-33 у слузници желуца је значајно повећана и показује јасну позитивну корелацију са количином бактеријског оптерећења и тежином гастритиса. Дејством на епителне ћелије желуца, *H. pylori* индукује експресију IL-33 активацијом ERK (енгл. *extracellular signal-regulated kinase*) сигналног пута, при чему је овај процес у значајној мери зависан од функционалности фактора вируленције CagA (212). Такође, индукција секреције IL-33 као одговор на *H. pylori* инфекцију условљена је деловањем NOD1 (енгл. *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1*) сигналног пута, који утиче на настанак и формирање различитих изоформи овог цитокина (213).

На функционалном нивоу, IL-33 делује као проинфламацијски медијатор у инфламацијском миљеу који настаје током инфекције *H. pylori*. IL-33 активира мастоците и подстиче лучење TNF- α , који даље супримира пролиферацију епителних ћелија желуца, поспешује инфламацију и омогућава лакшу и дуготрајнију колонизацију *H. pylori*. На тај начин формира се патогенетска мрежа у којој учествују *H. pylori*, епителне ћелије домаћина, IL-33, мастоцити и TNF- α , а која активно доприноси развоју и хроничитету гастритиса (212). IL-33 такође утиче на имунски одговор током *H. pylori* инфекције усмеравајући га ка Th2 фенотипу. Наиме, током хроничне фазе *H. pylori* инфекције долази до повећане експресије и продукције IL-33 у слузници желуца, док мишеви са недостатком NOD1 гена показују смањене нивое IL-33 и Th2 цитокина у слузници желуца, уз истовремено повећану продукцију Th1 цитокина, пре свега IFN- γ . Овај образац имунског одговора указује да продукција IL-33 зависна од NOD1 може деловати као механизам који ограничава прекомерни Th1 имунски одговор и усмерава га ка Th2 имунског одговору и тиме доприноси хроничитету инфекције и потенцијално настанку малигнитета. У прилог овоме говори чињеница да дуготрајна примена рекомбинантног IL-33 (енгл. *recombinant IL-33*, rIL-33) резултује израженом инфилтрацијом алтернативно активираних макрофага (M2 фенотипа) и појачаном продукцијом Th2 цитокина (IL-4, IL-5 и IL-13), уз активацију STAT3 (енгл. *signal transducer and activator of transcription 3*) сигналног пута у ткиву желуца мишева. Ове промене праћене су атрофијом антралне слузнице и појавом метапластичних жаришта у корпусу желуца (213). Насупрот томе, Buzzelli и сарадници (214) су показали повећану експресију IL-33 током акутне фазе *H. pylori* инфекције и индукцију Th2 имунског одговора, док је у хроничној фази *H. pylori* инфекције дошло до редукције експресије IL-33 и индукције Th1/Th17 имунског одговора. Губитак IL-33 може представљати пресудан момент у хроничној *H. pylori* инфекцији, јер нарушава равнотежу имунског одговора и на тај начин ствара услове који погодују даљој прогресији патолошког процеса ка карциногенези. Наведени резултати указују да IL-33, зависно од контекста и трајања

деловања, може имати двојаку улогу. Са једне стране учествује у регулацији имунског одговора супресијом Th1/Th17 имунског одговора и спречавањем даље прогресије ка карциногенези, док са друге стране, у одређеним условима, може допринети настанку преканцерозних промена управо индукцијом имунског Th2 одговора. Контрадикторни резултати у овим студијама су делимично појашњени коришћењем различитих сојева *H. pylori* у индукцији модела *H. pylori* инфекције код мишева (213, 214).

Подаци добијени из истраживања на хуманој популацији показују да је експресија IL-33 mRNA значајно повишена у биоптатима ткива желуца пацијената са *H. pylori* инфекцијом у односу на здраве контроле, при чему је уочена директна повезаност између присуства фактора вируленције *babA2* и пораста експресије IL-33 mRNA. Истовремено, експресија IL-33 била је значајно нижа код пацијената са хроничним гастритисом у поређењу са пацијентима са активним гастритисом, што указује да IL-33 може имати важну улогу у регулацији инфламације, транзицији из акутног у хронични гастритис и модификацији тежине инфламацијских процеса у ткиву желуца (215).

Такође, генетски фактори додатно модификују улогу IL-33 у овој болести. Код симптоматских пацијената са *H. pylori* улкусном болешћу забележене су мање концентрације циркулишућег IL-33 у односу на асимптоматске пацијенте са *H. pylori* инфекцијом као и у односу на здраве контроле (без *H. pylori* инфекције), што указује да смањење продукције IL-33 може повећати ризик од настанка улкусне болести. Полиморфизам гена за IL-33 (rs1929992), посебно GG генотип и носиоци G алела, повезани су са већим ризиком развоја пептичног улкуса, а концентрације IL-33 условљене су како генетском позадином домаћина, тако и CagA статусом бактерије. Ови резултати указују на то да снижена експресија IL-33 може смањити отпорност слuzнице, повећати њену осетљивост на оштећење и тиме допринети улцерогенези (216).

1.3.4.2. Аутоимунски гастритис

У патогенези аутоимунског гастритиса, IL-33 је препознат као кључан фактор ка развоју метаплазије желуца, нарочито метаплазије која експримира спазмолитички полипептид (енгл. *spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia*, SPEM). У условима хроничног аутоимунског гастритиса детектује се пораст експресије IL-33 у слuzници желуца, где овај цитокин делује као критична веза која спаја перзистентну инфламацију са метапластичном трансформацијом епитела. На механистичком нивоу, IL-33 усмерава имунски одговор ка Th2 фенотипу, подстичући акумулацију еозинофила и активацију M2 макрофага у корпусу желуца. Ови макрофаги, који такође експримирају IL-33, од суштинског су значаја за напредовање SPEM-а тако што се њиховом деплецијом или блокадом IL-33/ST2 осовине јавља значајно смањење метапластичких фокуса (217-219). IL-33 делује као усходни регулатор секреције цитокина, стимулишући продукцију IL-13, чије је присуство неопходно за индукцију метаплазије након губитка паријеталних ћелија. Дефицијенција гена за IL-33 или његовог рецептора ST2 у потпуности спречава развој метаплазије, док егзогена примена IL-33 или IL-13 изазива метапластичне промене у *knockout* моделима, што недвосмислено потврђује да је ова сигнална осовина неопходна за развој SPEM-а (218). Процес у великој мери зависи од еозинофила, будући да њихова деплеција смањује број M2 макрофага који продукују IL-33 и самим тим ублажава метапластичну трансформацију (217). Поред акумулације и поларизације имунских ћелија, IL-33 доприноси и одржавању хроничне инфламације, стварајући миље који погодује ремоделовању епитела и појави метапластичних промена. Th2 доминантно окружење, које IL-33 оркестрира, све чешће се посматра као фактор који покреће транзицију од хроничног гастритиса ка метаплазији и, у крајњој линији, ка карциному желуца (219).

1.3.4.3. Карцином желуца

У карциному желуца, IL-33 има сложену улогу у развоју, прогресији и потенцијалним терапијским приступима. У туморском ткиву желуца се детектује повећано присуство и експресија IL-33, а веће концентрације овог цитокина повезују се са неповољном прогнозом и већим степеном агресивности тумора (220-223). На молекулском нивоу, IL-33 се ослобађа из оштећених или инфламацијом измењених епителних ћелија желуца, након чега делује преко ST2 рецептора који се експримира на различитим ћелијама имунског система као и ћелијама строме у туморској микросредини (220, 222-224). Ова интеракција омогућава IL-33 да модификује одговоре имунског система и строме у правцу који подржава експанзију тумора, ангиогенезу и ремоделовање ткива, што IL-33 додељује централно место у биологији карциногенезе желуца и потенцијалном терапијском циљу.

IL-33 подстиче прогресију карцинома желуца кроз више патолошких механизма. Један од кључних механизма је промоција унакрсне комуникације између туморских ћелија и фибробласта повезаних са тумором (енгл. *cancer-associated fibroblasts*, CAFs), чиме се подстиче метастатски потенцијал и инвазивност неопластичног ткива. Фибробласти активирани у туморској микросредини производе IL-33, који стимулише миграцију и инвазију ћелија карцинома желуца индукцијом епително-мезенхимске транзиције (енгл. *epithelial-mesenchymal transition*, ЕМТ). Овај процес је двосмеран: туморске ћелије луче TNF- α који подстиче CAFs да додатно продукују IL-33, чиме се ствара самоодржив круг који олакшава прогресију и ширење малигнитета. Блокада IL-33 или његовог рецептора ST2 у туморским ћелијама или CAFs значајно смањује перитонеалну дисеминацију и укупни метастатски потенцијал, што наглашава значај IL-33/ST2 сигналне осовине као потенцијалне терапијске мете у карциногенези желуца (220).

IL-33 даље доприноси прогресији тумора кроз имуномодулаторне механизме, делујући као алармин који активира мастоците и подстиче регрутовање макрофага повезаних са тумором, посебно M2 фенотипа, познатих по томе што фаворизују раст тумора, стварање нових крвних судова и избегавање анти-туморског имунског надзора. Ове ћелијске популације, под утицајем IL-33, стварају имуносупресивно туморско окружење које омогућава неопластичним ћелијама бржи раст и ширење. У прилог томе, показано је да генетска или фармаколошка деплеција мастоцита, M2 макрофага или сама блокада IL-33/ST2 сигналног пута значајно редукују туморску масу и сузбијају раст тумора у претклиничким моделима, што додатно указује на терапијски потенцијал циљања ове осовине (222, 224). Осим утицаја на имунски одговор, IL-33 директно делује на туморске ћелије, подстичући њихову пролиферацију, миграцију и пролаз кроз ћелијски циклус, док истовремено инхибира апоптозу, чиме поспешује њихов опстанак. Ове про-туморске активности посредоване су MAPK сигнализацијом и праћене повећањем експресије регулатора ћелијског циклуса као што су циклин D1 и киназе зависне од циклина (енгл. *cyclin-dependent kinase*, CDKs) 4 и 6. Утишавање експресије гена за ST2 рецептор путем мале интерферирајуће рибонуклеинске киселине (енгл. *small interfering RNA*, siRNA) у туморским ћелијама поништава ефекте IL-33, што снажно поткрепљује тврдњу да је IL-33/ST2 осовина неопходна за подршку пролиферативног и миграционог фенотипа ћелија карцинома желуца (223).

Повећани нивои IL-33, као и акумулација имуносупресивних ћелија које експримирају ST2 рецептор, укључујући мастоците, мијелоидне супресорске ћелије (енгл. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) и Tregs, повезани су са лошијом прогнозом и резистенцијом на терапију инхибиторима PD-1 (енгл. *programmed cell death protein 1*) код пацијената са узнапредовалим карциномом желуца. Ови резултати указују на то да би IL-33/ST2 осовина могла послужити као биомаркер предикције терапијског

одговора, али и као потенцијална терапијска мета у циљу превазилажења резистенције на имунотерапију (221). Иако већина истраживања подржава про-туморогени ефекат IL-33, важно је истаћи да деловање овог цитокина може бити двојако. Поједина истраживања указују на антипролиферативне и проапоптотичне ефекте IL-33 у одређеним туморским линијама, супротно његовој способности да стимулише пролиферацију у нормалном епителу желуца. Ипак, у доминантном броју истраживања преовлађује став да IL-33 фаворизује прогресију карцинома желуца (220-225). На терапијском плану, IL-33/ST2 осовина се све интензивније истражује као потенцијални циљ у лечењу ове болести. Резултати претклиничких истраживања показују да инхибиција IL-33 или ST2 може редуковати туморски раст, ограничити метастазирање и побољшати одговор на имунотерапију, што ову осовину позиционира као перспективну у развоју иновативних терапијских стратегија (220-226). Међутим, клиничка примена ових терапијских приступа тек треба да буде у потпуности дефинисана. Текућа истраживања усмерена су на идентификацију подгрупа пацијената који би највише имали користи од IL-33/ST2 циљаних третмана, што би у будућности могло довести до персонализованог терапијског приступа у лечењу карцинома желуца (221, 226).

1.3.4.4. Инфламацијске болести црева

Растући број истраживања у последњој деценији указује на важну улогу IL-33 у имунопатогенези инфламацијских болести црева, са вишеструким и двојаким ефектима у регулацији интестиналне инфламације и ремоделовању ткива. Он се конститутивно експримира у епителним, ендотелним и ћелијама сличним фибробластима црева, а након оштећења или некрозе ћелија ослобађа се у микросредину где делује као „алармин“, сигнализирајући имунском систему присуство ткивног оштећења (227, 228). Рецептор за IL-33, ST2, налази се експримиран на имунским ћелијама црева као што су Th2 лимфоцити, Tregs, ILCs2, макрофаги и B лимфоцитима (227-229). У улцерозном колитису уочено је значајно повећање експресије IL-33 у инфламираној слузници црева, при чему нивои IL-33 показују јасну позитивну корелацију са активношћу болести, док је код Кронове болести експресија IL-33 повећана у слузници црева али у значајно мањој мери (230, 231). Поред тога, серумске концентрације IL-33 и sST2 су повишене код пацијената са инфламацијским болестима црева (230), иако поједине студије бележе супротан образац који карактерише снижена концентрација IL-33 уз повишене концентрације sST2 код пацијената са инфламацијским болестима црева (232). Функционално посматрано, IL-33/ST2 осовина у инфламацијским болестима црева испољава двојаку и контрадикторну улогу зависну од стадијума болести и самог контекста истраживања. У раној фази анималног модела улцерозног колитиса изазваног декстран натријум сулфатом (енгл. *dextran sodium sulfate*, DSS) IL-33/ST2 осовина подстиче локалну инфламацију активацијом урођене имуности (233), док је блокада ове осовине узроковала смањење тежине болести како у акутном DSS колитису тако и у анималном моделу Кронове болести односно колитису изазваном тринитробензен сулфонском киселином (енгл. *trinitrobenzene sulfonic acid*, TNBS) (234). Насупрот томе, студија *Phuong* и сарадника (235) показује протективну улогу IL-33/ST2 осовине у акутном DSS колитису преко активације Tregs и ILCs2. Штавише, примена егзогеног IL-33 резултује активацијом ILCs2 и и побољшањем клиничких манифестација инфламације у DSS колитису путем фактора раста амфирегулина (235, 236). Резултате ове студије потврдили су *Seo* и сарадници (232), који су показали да егзогена примена rIL-33 има протективан ефекат у акутном DSS колитису као и TNBS колитису преко стимулације процеса диференцијације пехарстих ћелија и активације M2 макрофага. Такође, IL-33 има улогу у репарацији и реституцији слузнице црева путем активације епителне микро RNA-320 (енгл. *microRNA*, *miRNA*) током фазе резолуције акутног DSS колитиса (237).

У хроничним анималним моделима колитиса IL-33/ST2 осовина такође испољава супротне ефекте зависне од самог модела болести. У моделу спонтаног хроничног илеитиса код SAMP (енгл. *senescence-accelerated mouse prone*) соја мишева, који се често користи као експериментални аналог Кронове болести, IL-33 има агресивну улогу, подстичући активацију еозинофила и Th2 имунски одговор (238). Сличан исход уочен је и у студији *De Salvo* и сарадника (239), где IL-33 путем NOD2 (енгл. *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) сигнализације и активације ILCs2, погоршава илеитис код SAMP соја мишева. Насупрот томе, у моделу хроничног DSS колитиса IL-33 показује протективан ефекат захваљујући активацији Tregs и регулаторних Б лимфоцита, уз истовремено супресију Th17 одговора (240).

IL-33 додатно утиче на састав цревне микробиоте тако што промовише продукцију IgA, при чему дефицит IL-33 узрокује дисбиозу, која се карактерише експанзијом муколитичких и проинфламацијских бактеријских врста које одржавају инфламацију кроз механизме зависне од IL-1 α (241). Његова улога у развоју интестиналне фиброзе има значајну клиничку тежину, будући да су фибростенотичне компликације честе код пацијената са Кроновом болешћу (228, 242).

1.3.4.5. Колоректални карцином

У колоректалном карциному, IL-33 се експримира како у туморским епителним ћелијама, тако и у компонентама строме, а његово дејство обухвата директан утицај на туморске ћелије, као и индиректну модулацију имунских и ћелијских популација строме (243-247). Про-туморско деловање IL-33 остварује се путем више механизма. Показано је да IL-33 подстиче одржавање матичних својстава туморских ћелија и повећава њихову отпорност на апоптозу, делом кроз активацију JNK (енгл. *c-Jun N-terminal kinase*) сигналног пута и појачану експресију кључних гена повезаних са матичношћу ћелија, што доприноси агресивнијем расту тумора и неповољнијој прогнози код метастатског колоректалног карцинома (243). Истовремено, IL-33 подстиче регрутовање и активацију макрофага, који преко продукције простагландина додатно подржавају туморски раст и очување матичних ћелија тумора. Поред тога, IL-33 делује на CAFs и субепителне миофибробласте, стимулишући прекомерну продукцију екстрацелуларног матрикса и развој дезмоплазије, чиме се ствара микросредина погодна за инвазију и метастазирање (244, 246). Активација IL-33/ST2 осовине подстиче и појачану експресију про-метастатских молекула, укључујући IL-6, CXCR4 (енгл. *C-X-C chemokine receptor type 4*), MMP (енгл. *matrix metalloproteinase*) 2 и 9, што олакшава миграцију туморских ћелија и њихово ширење (247).

Поред директних ефеката на тумор, IL-33 значајно обликује имунски пејзаж колоректалног карцинома. Он подстиче акумулацију и функционалну активацију Tregs, који сузбијају ефекторске CD8⁺ Т ћелијске одговоре и доприносе развоју имуносупресивног миљеа, погодног за напредовање тумора. Истовремено, IL-33 инхибира диференцијацију Th17 лимфоцита и смањује продукцију IL-17, додатно реметећи равнотежу имунских ћелијских субпопулација у туморском окружењу (248).

Супротно овим про-туморогеним ефектима, у одређеним условима IL-33 може испољити и анти-туморско дејство. У присуству очуваног и снажног Т-ћелијског имунског одговора, IL-33 повећава осетљивост туморских ћелија колоректалног карцинома на хемотерапију 5-флуороурацилом, путем координације анти-туморских CD4⁺ и CD8⁺ Т ћелијских одговора и индукције апоптотских механизма у туморским ћелијама. Оштећене туморске ћелије при томе ослобађају IL-33 и хемокине за Т лимфоците, чиме се успоставља позитивна повратна спрега која појачава антитуморску имуност посредовану Т лимфоцитима и побољшава одговор на терапију. Ови резултати

указују на потенцијалну улогу IL-33 као предиктивног биомаркера осетљивости на 5-флуороурацил и могућег адјуванса у имуноterapiји колоректалног карцинома (249).

Поред тога, IL-33 доприноси ремоделовању туморске строме, ангиогенези и формирању про-туморогене микросредине, чиме додатно подстиче развој и прогресију колоректалног карцинома (244, 245). Његова повишена експресија повезана је са унапредовалим патолошким карактеристикама болести, укључујући изражену дезмоплазију, туморско „пупљење“ и лимфну метастазу, посебно код левострано локализованих карцинома колона (246).

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1. ЦИЉЕВИ

Циљ истраживања је да се испита утицај сигналног пута IL-33/ST2 на имуномеханизме укључене у патогенезу акутног токсичног оштећења желуца миша.

У складу са циљем постављени су следећи задаци:

1. Одредити утицај генске делеције ST2 на интензитет деструкције желуца и то на два начина: одређивањем макроскопског скорa тако што ће се мерити површина лезија и проценом квантитативног хистолошког скорa ткивних промена.
2. Утврдити ефекат генске дефицијенције рецептора ST2 на модулацију имунског одговора анализом:
 - заступљености мононуклеарних и полиморфонуклеарних леукоцита у ткиву акутно оштећеног желуца
 - фенотипских и функционалних карактеристика инфилтришућих ћелија урођене и стечене имуности
 - заступљености и функционалног фенотипа имуносупресивних ћелија у акутно оштећеном ткиву желуца
 - цитокинског миљеа у ткиву желуца и серуму.
3. Испитати потенцијалну везу делеције гена за ST2 са пироптозом, апоптозом и инфламацијом и утврдити молекулске механизме
4. Испитати ефекат стимулације сигналног пута IL-33/ST2 након системске апликације IL-33 на интензитет ткивне деструкције одређивањем макроскопског и хистолошког скорa.

2.2. ХИПОТЕЗЕ

Радне хипотезе истраживања:

1. Делеција гена за рецептор IL-33 (молекула ST2) смањује интензитет акутног токсичног оштећења желуца изазваног једнократним уносом алкохола.
2. Блокада и/или стимулација сигналног пута IL-33/ST2 модулира имунске механизме одговорне за акутно оштећење слузнице желуца.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

Истраживање је спроведено на сингеним мишевима старости између 6 и 8 недеља, оба пола, чистог соја (енгл. *wild type*, WT) BALB/c, као и на мишевима BALB/c соја код којих је ген за ST2 циљано уклоњен (енгл. *ST2 knockout*, ST2^{-/-}). Мишеви су држани у стандардизованим лабораторијским условима у оквиру Виваријума Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, при контролисаној температури и влажности, са 12-часовним циклусом светлости и мрака. Током целог трајања експеримента животиње су имале слободан приступ пелетираној храни и води. Сви експериментални протоколи спроведени су у складу са важећим етичким смерницама за рад са лабораторијским животињама које је одобрила Етичка комисија за експерименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број и датум: 01-6172/3; 09.06.2023.). У сваком појединачном експерименту коришћене су животиње истог пола, приближне старости (разлика није прелазила шест дана) и уједначене телесне масе (разлика мања од једног грама), чиме је осигурана стабилност и упоредивост експерименталних услова.

У зависности од пола и тежине мишеви су равномерно распоређени у следеће експерименталне и контролне групе:

- 1) BALB/c WT мишеви који су оралном гаважом примили 80% алкохол у једној дози
- 2) BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су оралном гаважом примили једну дозу 80% алкохола
- 3) BALB/c WT мишеви којима је пре уноса једне дозе 80% алкохола оралном гаважом интраперитонеално убризган IL-33
- 4) BALB/c WT мишеви који су оралном гаважом примили једну дозу PBS (енгл. *phosphate buffered saline*)
- 5) BALB/c ST2^{-/-} мишеви који су оралном гаважом примили једну дозу PBS
- 6) BALB/c WT мишеви којима је интраперитонеално убризгана једна доза PBS

3.2. ИНДУКЦИЈА МОДЕЛА ОШТЕЋЕЊА ЖЕЛУЦА

Мишеви су насумично распоређени у експерименталне и контролне групе. Експерименталне групе чинили су ST2^{-/-} и WT мишеви којима је апликован 80% етанол у запремини од 200μL (приближно 10 mL/kg телесне масе) оралном гаважом, ради изазивања акутног оштећења желуца (Слика 9). Доза и концентрација етанола одабране су на основу ранијих студија (157, 250). Контролне групе (ST2^{-/-} и WT) добиле су једнаку запремину PBS-а, такође оралном гаважом, како би се обезбедила компарабилност између третираних и нетретираних животиња. Три сата након апликације етанола или PBS-а, све животиње су жртвоване цервикалном дислокацијом, у складу са важећим етичким стандардима за минимизацију бола и патње. Желуци су одмах након жртвовања ексцизирани, уздужно отворени дуж велике кривине и пажљиво испрани физиолошким раствором ради уклањања садржаја. Након тога, изоловани желуци су коришћени за различите методолошке поступке. Пре индукције оштећења желуца, све животиње су подвргнуте 24-часовном периоду гладовања, уз сталан приступ води (*ad libitum*).



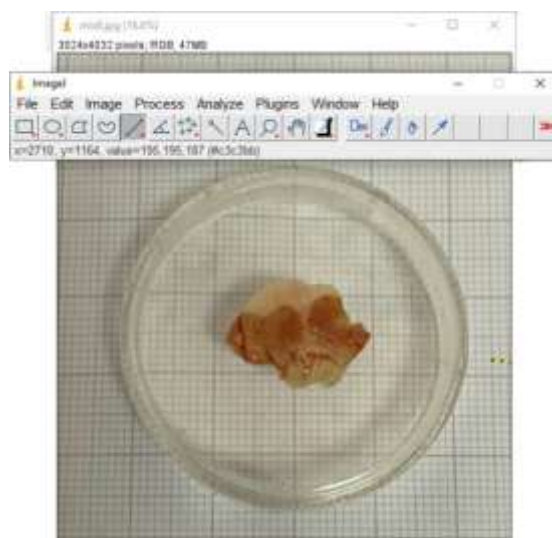
Слика 9. Апликовање етанола путем оралне гаваже.

3.3. ОДРЕЂИВАЊЕ МАКРОСКОПСКОГ СКОРА

За макроскопску анализу, након ресекције, желудац је инцизиран дуж велике кривине и испран PBS-ом. Ради одређивања површине лезија, унутрашња површина желуца је фотографисана и анализирана помоћу софтверског програма *ImageJ* (*National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*) (Слика 10). Индекс лезија желуца (%) израчунат је за сваки желудац појединачно, према следећој формули (251):

$$\text{Индекс лезија желуца (\%)} = \frac{\text{површина улцерација (mm}^2\text{)}}{\text{површина мукозе желуца (mm}^2\text{)}} * 100$$

Укупна површина улцерација (mm²) израчуната је као збир површина оштећене слузнице свих желуцаца у оквиру сваке експерименталне групе.



Слика 10. Одређивање површине лезија слузнице желуца коришћењем *ImageJ* програма.

3.4. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА

3.4.1. Припрема ткива желуца и бојење хематоксилином и еозином

Након жртвовања експерименталних животиња, желудац је изолован, лонгитудинално отворен, испран физиолошким раствором, а потом равномерно раширен по подлози тако да површина слузнице буде у потпуности изложена. Из тако припремљеног ткива уздужним пресецима издвојени су репрезентативни сегменти за даљу хистолошку обраду. Добијени узорци су фиксирани у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина у трајању од 24 часа, на собној температури, како би се очувала морфолошка структура ткива желуца. По завршетку фиксације, спроведена је постепена дехидратација узорака у серијама алкохола растућих концентрација (70%, 96% и 100%), након чега су пречишћени у ксилолу и укалупљени у парапластни медијум. Из овако припремљених блокова прављени су серијски попречни пресеци дебљине 5 μm , коришћењем микротоме *Leica RM 2135 (Austria)*.

Након депарафинизације у ксилолу и постепене рехидратације ткивних пресека у серијама алкохола опадајуће концентрације, узорци су бојени хематоксилином по *Mayer-*у, чиме је омогућено јасно истицање једарних структура. Након тога, пресеци су накнадно просветљени у 2% раствору еозина ради контрастног бојења цитоплазматских компоненти. По завршеном бојењу, узорци су поново дехидратисани, просветљени у ксилолу и постављени на предметне плочице уз употребу *DPX (Sigma Aldrich)* медијума за монтирање. Припремљени препарати остављени су да се суше у трајању од 24 часа на собној температури, након чега су анализирани под светлосним микроскопом.

3.4.2. Одређивање хистолошког скорa

Хистопатолошка анализа обрађених пресека је анализирана коришћењем светлосне микроскопије са циљем квантификације степена оштећења слузнице желуца. Процењивани параметри обухватили су губитак епителних ћелија, едем мукозе, хеморагијска оштећења и инфилтрацију инфламацијских ћелија, при чему је сваки параметар оцењиван на скали од 0 до 3. За сваки пресек израчунат је збирни хистолошки скор, са максималним могућим скором од 12 (Табела 2), у складу са модификацијом раније описаних критеријума процене (252).

Хистолошка евалуација и скорирање је одређено двоструко слепом методом коју су извела два независна истраживача, како би се елиминисао субјективни утицај и обезбедила што већа објективност и репродуктивност добијених резултата. За процену степена слагања између истраживача, као индикатор сагласности коришћен је Коенов капа коефицијент (*Cohen's kappa*). Вредност коефицијента је показао високу сагласност између испитивача (*Cohen's kappa* = 0.872 \pm 0.041).

Табела 2. Параметри за одређивање хистолошког скорa.

ПАРАМЕТАР	ОЦЕНА	ОПИС
ОШТЕЋЕЊЕ ЕПИТЕЛА	0	Нормалан епител, континуиран слој без дегенеративних промена или десквамације.
	1	Благо оштећење; фокална десквамација или појединачна подручја дегенерације, захватају до 25% површине.
	2	Умерено оштећење; делимичан губитак епитела или ерозије које заузимају 25-50% слузнице.
	3	Тешко оштећење; потпуни губитак епитела, дубоке ерозије или улцерације које захватају више од 50% површине.
ЕДЕМ	0	Без едема, ткиво нормалног изгледа.
	1	Благ едем; проширење субмукозног слоја до 25% површине.
	2	Умерен едем; интерстицијални простори израженији, заузимају 25–50% ткива.
	3	Изражен едем; наглашено ширење субмукозног и/или мукозног слоја, присутно у више од 50% ткива.
ХЕМОРАГИЈА	0	Без хеморагијских жаришта.
	1	Присуство жаришта хеморагије до 25% испитиваног подручја.
	2	Хеморагија која заузима 25–50% укупне површине.
	3	Изражена хеморагија која захвата више од 50% ткива.
ИНФИЛТРАЦИЈА ИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЋЕЛИЈА	0	Нормална појава појединачних инфламацијских ћелија.
	1	Благ инфилтрат; једно до два мала жаришта неутрофила и/или умерено повећање броја мононуклеарних ћелија.
	2	Умерен инфилтрат; три до четири жаришта неутрофила и/или јасније груписање мононуклеарних ћелија које делимично раздвајају жлезде.
	3	Изражен инфилтрат; више жаришта густих инфламацијских ћелија које доводе до поремећаја ткивне архитектуре и одвајања жлезданих структура.

3.5. ПРИМЕНА РЕКОМБИНАНТНОГ IL-33

Ради испитивања улоге IL-33/ST2 сигналног пута у погоршању акутног оштећења слузнице желуца, WT мишевима соја BALB/c интраперитонеално је апликована једнократна доза rIL-33 у количини од 1µg по животињи (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) (Слика 11). Егзогени IL-33 је апликован два сата пре третмана 80% етанолом, у складу са претходно описаним експерименталним протоколима (253, 254). Овим приступом је омогућена процена утицаја егзогеног IL-33 на тежину оштећења слузнице желуца изазваног етанолом.

Контролна група сачињена је од WT BALB/c мишева који су примили идентичну дозу rIL-33 интраперитонеално, али нису били изложени етанолу, чиме је омогућено

искључивање могућих директних ефеката IL-33 независних од етанолом изазваног оштећења.



Слика 11. Интраперитонеална апликација rIL-33.

3.6. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ И ИЗОЛАТУ ТКИВА ЖЕЛУЦА

Узорци крви прикупљани су из абдоминалне аорте мишева, након чега су центрифугирани ради издвајања серума, који је затим чуван на -80°C до тренутка анализе. За припрему хомогената желуца, делови ткива желуца су хомогенизовани у 5 mL хладног PBS-а (pH 7.4) користећи механички хомогенизатор. Добијени хомогенати су центрифугирани при 10.000 обртаја у минути у трајању од 20 минута на 4°C . Након завршеног центрифугирања, супернатанти су сакупљени и чувани на -80°C до тренутка анализе.

Системска и локална концентрација цитокина TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IFN- γ и IL-10 одређена је применом комерцијалних ELISA (енгл. *enzyme linked immunosorbent assay*) китова специфичних за мишије цитокине (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*). Према упутству произвођача, стандарди су растворени у PBS-у (pH 7.2) тако да почетне концентрације износе 2000 pg/mL за TNF- α , IL-10, IL-17 и IFN- γ , односно 1000 pg/mL за IL-1 β и IL-6. Ради израде стандардне криве и добијања једначине за израчунавање концентрација испитиваних цитокина, из штокова стандарда припремљена су серијска двострука разблажења у осам тачака, користећи *Reagent Diluent* (PBS са 1% BSA). У сваки бунарчић микротитар плоче са 96 бунарчића равнoг дна (*SARSTEDT*) додато је по 100 μL радне концентрације везујућег антитела (енгл. *capture antibody*). Плоче су затим запечаћене адхезивном фолијом (енгл. *ELISA plate sealers*) и инкубирани преко ноћи на собној температури. Након инкубације, бунарчићи су испрани пуфером за испирање (енгл. *wash buffer*) помоћу аутоматске машине за прање плоча. Затим је у све јамице додат блокирајући пуфер (енгл. *block buffer*; 1% BSA у PBS-у) у запремини од 300 μL ради спречавања неспецифичног везивања, након чега су плоче остављене један сат на собној температури и потом поново испране. Разблажени узорци (1:10 у дејонизованој води) и стандарди нанети су у бунарчиће (по 100 μL) и инкубирани два сата на собној температури. Након прања, у сваки бунарчић је додато 100 μL радне концентрације детекционог антитела (енгл. *detection antibody*), а плоче су поново инкубирани два сата. По завршетку овог корака, плоче су испране и у бунарчиће је додато по 100 μL раствора *Streptavidin-HRP* (енгл. *horseradish peroxidase*). Инкубација је трајала 20 минута на собној

температури у мраку, након чега су плоче испране. Затим је у бунарчиће додато по 100 μL супстратног раствора (енгл. *substrate solution: color reagent A + color reagent B, 1:1*). После 20 минута инкубације, реакција је прекинута додавањем 50 μL раствора за стопирање (енгл. *stop solution; 2N H₂SO₄*), чиме је завршена припрема узорака за спектрофотометријско читавање.

Оптичка густина узорака прочитана је на таласној дужини од 450 nm помоћу *Microplate Reader*-а (*Zenyth 3100 multi-mode detector, Anthos, Austria*). Све измерене вредности су кориговане одузимањем апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу стандарда конструисана је стандардна крива, а концентрације појединачних узорака израчунате су интерполацијом. Сви узорци су анализирани у трипликату ради повећања поузданости резултата.

3.7. АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈА ИМУНСКИХ ЋЕЛИЈА МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ

3.7.1. Изолација имунских ћелија из ткива желуца

Изолација имунских ћелија из ламине проприје желуца експерименталних животиња изведена је према модификацији постојећег протокола (255). Након ексцизије, ткива желуца су уздужно отворена и темељно испрана у RPMI (енгл. *Roswell park memorial institute*) 1640 медијуму обогаћеном L-глутамином и 5% феталним говеђим серумом (енгл. *fetal bovine serum, FBS*), како би се уклонио преостали садржај лумена. Узорци су затим подвргнути ензимској обради помоћу EDTA (енгл. *ethylenediaminetetraacetic Acid*)/DTT (енгл. *dithiothreitol*) и колагеназе IV. У првој фази ензимске обраде, ткива су инкубирана у 10 mL HBSS (енгл. *Hanks' balanced salt solution*) раствора без калцијума и магнезијума, који је садржао 1 mM EDTA, 1 mM DTT и 2% FBS, у трајању од 30 минута, ради дисоцијације епителних ћелија и уклањања слузи. Потом су узорци уситњени на мање фрагменте и изложени другој фази дигестије у ензимској мешавини која је садржала 0.5 mg/mL колагеназе IV и 200 $\mu\text{g/mL}$ DNase I, растворених у пуферу за испирање. Дигестија је спроведена у 5 mL ензимског раствора, у термостату на 37°C уз континуирано мешање брзином од 250 обртаја у минуту, у трајању од 30 минута. По завршетку поступка, добијене ћелијске суспензије су профильтриране кроз најлонски филтер порозности од 40 μm , два пута испране пуфером за испирање и ресуспендоване у 5 mL RPMI медијума са додатком 5% FBS, чиме је добијена фракција имунских ћелија спремна за даље анализе.

3.7.2. Обележавање површинских ћелијских маркера

Ради детаљне карактеризације фенотипских и функционалних обележја различитих субпопулација имунских ћелија изолованих из ламина проприје желудачне слузокоже, спроведена је анализа методом проточне цитометрије. У поступку су коришћена анти-мишја моноклонска антитела специфична за површинске и интрацелуларне маркере имуних ћелија. За сваку анализу је припремљено по 1×10^6 ћелија, ресуспендованих у 50 μL пуфера за бојење (енгл. *staining buffer; BD*). Ћелије су инкубиране са флуорохромом коњугованим анти-мишјим моноклонским антителима усмереним против следећих молекула: CD45, CD8, KLRG1 (енгл. *killer cell lectin-like receptor G1*), CTLA-4 (енгл. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4*), CD11c, CD86, Lin, SiglecF, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CD80, Ly6G и F4/80. Ова антитела су била обележена различитим флуорохромима- FITC (енгл. *fluorescein isothiocyanate*), PE (енгл. *phycoerythrin*), PerCP (енгл. *peridinin-chlorophyll-protein complex*) или APC (енгл. *allophycocyanin*), у складу са упутствима произвођача (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). Ради контроле специфичности везивања, ћелије су паралелно инкубиране са

одговарајућим изотипским контролама. Сва антитела и контроле примењена су у концентрацијама које су обезбеђивале коначно разблажење 1:100 у суспензији ћелија ($V \approx 80 \mu\text{L}$). Инкубација је спроведена у мраку, на $+4^\circ\text{C}$ током 30 минута, након чега су ћелије испране додавањем 2 mL хладног пуфера за бојење, затим центрифугиране 5 минута на 250 g, а добијени талог ресуспендован у 250 μL свежег пуфера за бојење.

Проточна цитометрија је изведена на *FACSCalibur Flow Cytometer*-у (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*), док је анализа података спроведена у програму *FlowJo* (*Tree Star Inc., Ashland, OR, USA*). Ради дефинисања популација од интереса, граничник (енгл. *gate*) је постављен на FSC/SSC дијаграму (енгл. *forward scatter/side scatter*) тако да обухвати само вијабилне имунске ћелије. За сваку анализу регистровано је најмање 10.000 догађаја (енгл. *events*).

3.7.3. Обележавање интрацелуларних маркера и цитокина

Интрацелуларно обележавање цитокина спроведено је у складу са *BD Cytofix/Cytoperm*TM протоколом (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*), уз употребу флуорохромски коњугованих анти-мишјих моноклонских антитела специфичних за IFN- γ , CD107a, IL-12, GATA3 (енгл. *GATA binding protein 3*), IL-13, IL-4, IL-10, NLRP3, TNF- α и IL-1 β . Коришћена су антитела означена различитим флуорохромима- FITC, PE, PerCP и APC, у складу са упутствима произвођача (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*).

Ћелије су стимулисане комбинацијом форбол 12-миристанат 13-ацетата (енгл. *phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA; *Sigma-Aldrich, USA*) и јономицина (енгл. *ionomycin*; *Sigma-Aldrich, USA*), снажних активатора протеин киназе C (енгл. *protein kinase C*) који индукују инфлукс калцијумових јона (Ca^{2+}) у ћелију, чиме се покреће експресија цитокина у физиолошки активираним имунским ћелијама (256). Оптимално време инкубације било је 4-6 часова, док је продужено излагање показало цитотоксични ефекат. Током *in vitro* стимулације примењени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgiStop*TM (садржи моненсин) и *BD GolgiPlug*TM (садржи брефелдин А), који спречавају транспорт протеина унутар ендоплазматског ретикулума и Голџијевог комплекса, што омогућава акумулацију цитокина унутар ћелија и повећава ефикасност њихове детекције. Због потенцијалне токсичности ових инхибитора, време инкубације није прелазило 12 часова. Након завршене стимулације, ћелије су центрифугиране 5 минута на 1400 обртаја у минуту, ресуспендоване у пуфер за бојење и прво обележене површинским маркерима према унапред описаном поступку. По завршетку бојења, ћелије су испране са 2 mL хладног пуфера за бојење, 5 минута на 1400 обртаја у минуту, затим фиксиране и пермеабелизоване у 250 μL раствора за фиксацију и пермеабелизацију (енгл. *fixation/permeabilization solution*, *BD Biosciences*) током 20 минута на $+4^\circ\text{C}$. Узорци су вортексовани пре и после додавања раствора ради равномерне пермеабелизације. Потом су ћелије испране са 1 mL пуфера за пермеабелизацију (енгл. *Perm/Wash*TM *Buffer-a*, *BD Biosciences*), центрифугиране и инкубирани 30 минута на $+4^\circ\text{C}$ са примарно коњугованим антителима специфичним за интрацелуларне цитокине и маркере.

Ћелијски талог је ресуспендован у 50 μL пуфера за пермеабелизацију (енгл. *Perm/Wash*TM *Buffer*, *BD Biosciences*), након чега су додата примарно коњугована моноклонска анти-мишја антитела специфична за различите цитокине и интрацелуларне маркере означена различитим флуорохромима у складу са препорукама произвођача. Након завршене инкубације (30 минута на $+4^\circ\text{C}$ у мраку), ћелије су испране додавањем 2 mL пуфера за бојење и центрифугиране 5 минута на 250 \times g. Супернатант је пажљиво уклоњен, а ћелијски талог поново ресуспендован у 250 μL свежег пуфера за бојење. Граничник је дефинисан на FSC/SSC дијаграму тако да обухвати популацију вијабилних (живих) ћелија. Припремљени узорци су одмах анализирани на проточном цитометру

FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), а подаци су обрађени коришћењем *FlowJo* софтвера (*Tree Star Inc., Ashland, OR, USA*).

3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА

Експресија TNF- α и каспазе-3 у ткиву желуца испитивана је применом имунохистохемијске технике, уз употребу примарних зечјих анти-мишјих антитела TNF- α (ab66579, *Abcam Inc., Cambridge, MA, USA*) и каспазе-3 (ab184787, *Abcam Inc., Cambridge, MA, USA*). Ткиво желуца фиксирано је у 4% неутралном пуферисаном формалдехиду током 24 часа, након чега је укалупљено у парафин. На микротому су сечени пресеци дебљине 5 μm и постављани на високо адхерентне *SuperFrost®* плочице, које су сушене један сат на температури од 56°C. Депарафинизација је спроведена серијским провођењем кроз алкоhole опадајућих концентрација. Ради отварања антигена, ткивни исечци су подвргнути термичкој обради у микроталасној пећници (560 W) у цитратном пуферу, два пута по 5 минута и једном 8 минута. Након тога, плочице су испране текућом водом (5 минута) и потопљене у 3% раствор водоник-пероксида (H₂O₂) ради блокирања ендogene пероксидазне активности. После поновног испирања у фосфатном пуферу, плочице су осушене, а ткивни делови оивичени специјалном хидрофобном оловком.

У влажној комори на сваку секцију је нането по 100 μL примарног антитела, које је инкубирано 30-60 минута на собној температури. Након троструког испирања у PBS-у, нането је секундарно HRP-конјуговано анти-зечје антитело (*HRP/DAB detection kit, ab64261, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA*), које је инкубирано у складу са упутством произвођача. За визуализацију имунохистохемијске реакције коришћен је АЕС (енгл. *3-amino-9-ethyl carbazole*) супстрат, који је остављен да делује 5-10 минута. Након испирања, узорци су обојени *Mayer*-овим хематоксилином и покривени покровним стаклом коришћењем медијума на бази воде. Ћелије са позитивном експресијом TNF- α или каспазе-3 идентификоване су интензивном црвено-браон бојом.

Обојени ткивни пресеци су фотографисани дигиталном камером монтираном на светлосни микроскоп *Olympus BX51 (Olympus, Japan)*, након чега су слике дигитализоване и анализиране. Квантитативна процена извршена је у програму *ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)*, и то на десет репрезентативних поља по пресеку. Хистолошка анализа и бодовање извршено је двоструко слепом методом од стране два независна истраживача, без података о групама узорака. За свако поље ручно је означена зона епитела слезнице желуца, а затим је одређен проценат ћелија са позитивним имунохистохемијским бојењем унутар дефинисане области. Коначни резултати приказани су као средња вредност процента позитивно обојених ћелија унутар те зоне по видном пољу.

3.9. ПОЛИМЕРИЗОВАНА ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА

3.9.1. Изолација укупне RNA из ткива желуца

Ради изолације RNA из ткива желуца, узорци су најпре уситњени и лизирани помоћу RNA изолатора (енгл. *TRIzol reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Уситњено ткиво је преливено са 250 μL изолатора, а добијене смеше су пребачене у епрувете запремине 1,5 mL. После петоминутне инкубације на собној температури, додато је 50 μL хлороформа, уз интензивно мешање. Након десетоминутне инкубације на +4°C, узорци су центрифугирани 15 минута при 12.000 g на истој температури. После центрифугирања формиране су три јасно раздвојене фракције: горња (водена) која садржи RNA, доња (органска) са протеинима и липидима, и средња фаза са DNA. Водена фракција је пажљиво сакупљена, помешана са изопропанолом у једнаком волумену и

инкубирана 5 минута на собној температури. Следило је центрифугирање током 15 минута при 12.000 g на +4°C, након чега је супернатант одливен, а RNA талог два пута испран у 1 mL 70% етанола, центрифугирањем 12 минута на 7.500 g. Након сушења до потпуног испаравања етанола, RNA је растворена у 20 µL дестиловане воде.

Табела 3. Секвенце прајмера коришћених за RT-PCR анализу.

Ген	Forward прајмер (5'–3')	Reverse прајмер (5'–3')	Температура топљења (°C)		Очекивана величина базних парова
			Forward	Reverse	
IL-33	TCCTTGCTTGGC AGTATCCA	TGCTCAATGTGT CAACAGACG	68	69	52
Beclin-1	ATACTGTTCTGG GGGTTTGCG	GTCTCTCCTTTT CCACCTCTTC	63	59	111
HMGB1	GGCGAGCATCCT GGCTTATC	GGCTGCTGTCA TCTGCTG	59	63	86
NLRP3	TGCTCTTCACTG STATCAAGCCCT	ACAAGCCTTTGC TCCAGACCSTAT	65	65	85
Каспаза-1	AGATGGCACATT TCCAGGAC	GATCCTCCAGCA GCAACTTC	68	70	221
Bcl-2	GTGGTGGAGGA ACTCTTCAG	GTCCACAAAGG CATCCCAG	70	70	205
Bax	ACACCTGAGCTG ACCTTG	AGCCCATGATGG TTCTGATC	67	68	292
Каспаза-3	AAATCAAGGG ACGGGTCAT	ATTGACACAATA CACGGGATCTGT	66	70	180
NF-κB	GCCGTGGAGTAC GACAA	CGGTTTCCCAT TAGTATGT	66	64	298
β-Actin	AGCTGCGTTTTA CACCCCTT	AAGCCATGCCAA TGTTGTCT	56	56	81

3.9.2. Реверзна транскрипција и реакција ланчаног умножавања у реалном времену (енгл. *real-time polymerase chain reaction, RT-PCR*)

За синтезу комплементарне DNA (енгл. *complementary DNA, cDNA*) коришћено је укупно 1µg изоловане RNA, примењујући *high-capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Реакције RT-PCR изведене су употребом *power SYBR master mix-a* (Applied Biosystems) и специфичних прајмера за гене *IL-33*, *NLRP3*, *каспаза-1*, *Bcl-2* (енгл. *B-cell lymphoma-2*), *Bax*, *каспаза-3*, *NF-κB*, *Beclin-1*, *HMGB* (енгл. *high mobility group box 1*) и референтни ген *β-actin*.

PCR реакција је започета иницијалном активацијом у трајању од 10 минута на 50°C, након чега је спроведена почетна денатурација cDNA током 10 минута на 95°C ради раздвајања дволанчане структуре. У наставку је реализовано 40 узастопних циклуса, при чему је сваки циклус обухватао фазу денатурације на 95°C у трајању од 15 секунди, фазу везивања прајмера за DNA и синтезе DNA ланца на 60°C током 60 секунди. Реакције су изведене на термоциклеру *Mastercycler ep realplex* (Eppendorf, Hamburg, Germany). Релативна експресија сваког гена одређена је према формули $2^{-(C_t - C_{t\text{actin}})}$, где C_t представља праг циклуса за циљни ген, а $C_{t\text{actin}}$ вредност за референтни ген *β-actin*. Сви узорци су анализирани у трипликатима. Секвенце свих коришћених прајмера наведене су у Табели 3.

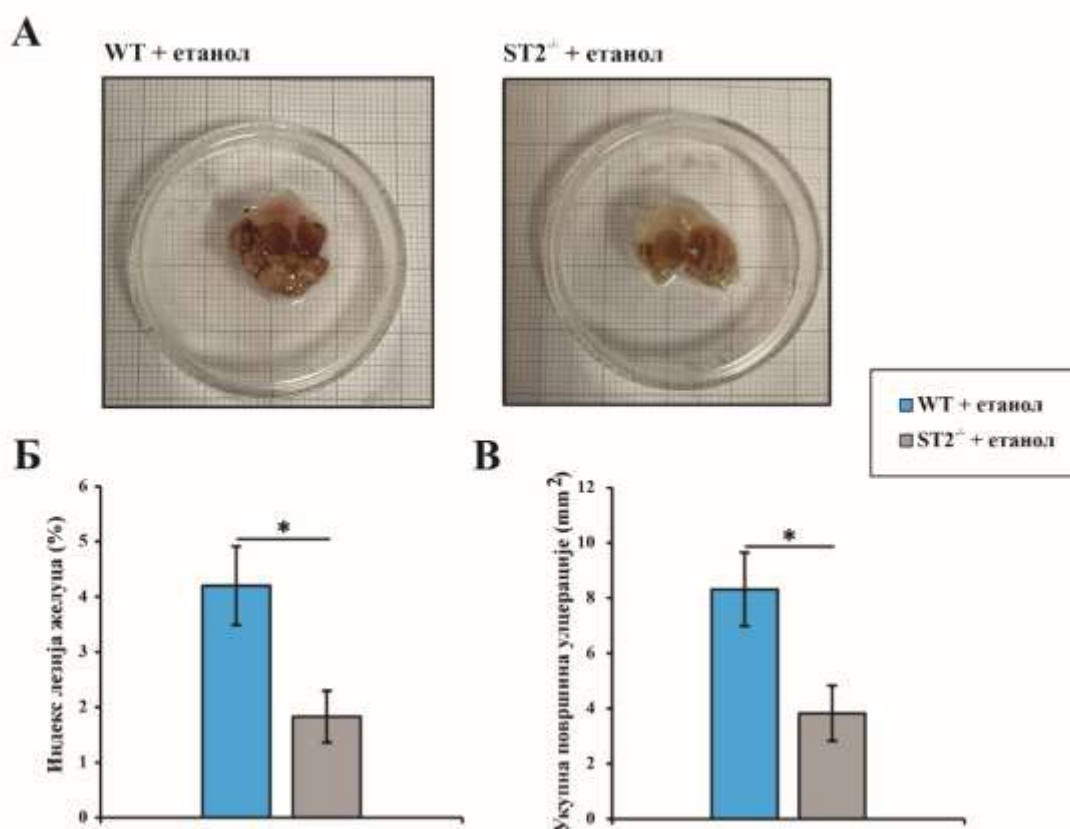
3.10. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Нормалност расподеле је одређена тестом *Kolmogorov-Smirnov*. Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student's*-ов *t* тест. У случају неправилне расподеле коришћен је непараметарски *Mann-Whitney*-ев *U* тест. Резултати су приказана као средња вредност \pm стандардна грешка средње вредности (енгл. *standard error*, SE). Статистички значајном разликом сматране су добијене вредности $p < 0.05$, а статистички веома значајним означене су оне за које је $p < 0.01$. За израду графикона и табела коришћен је програм Microsoft Excel (*Microsoft Corp., Redmond, WA, USA*)

4. РЕЗУЛТАТИ

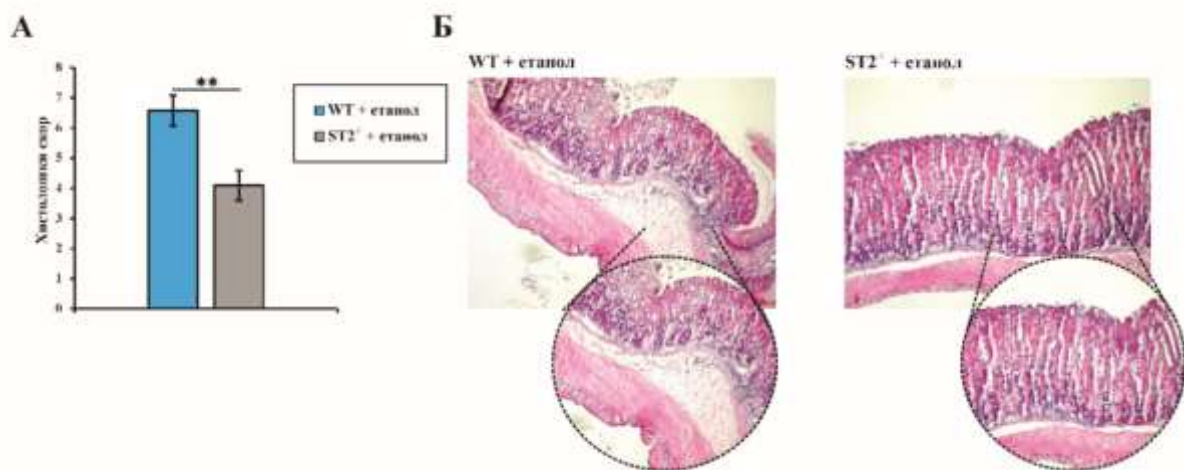
4.1. ДЕЛЕЦИЈА ST2 УБЛАЖАВА АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ СЛУЗНИЦЕ ЖЕЛУЦА

Верификација модела акутног оштећења слузнице желуца изазваног етанолом, као и процена степена ткивног оштећења, процењивани су одређивањем макроскопског и хистолошког скорa узорака ткива желуца добијених након жртвовања животиња три сата по примени 80% етанола оралном гаважом. Код WT мишева, апликација етанола изазвала је опсежно макроскопско оштећење слузнице желуца, које се одликовало израженим улцерацијама и хеморагичним лезијама. Насупрот томе, код $ST2^{-/-}$ мишева третираних етанолом уочено је значајно мање макроскопско оштећење желуца, при чему је слузница углавном задржала своју морфологију и структуру, изгледајући глатко и компактно, уз дискретне тачкасте ерозије и појединачне линеарне хеморагије (Фигура 1А). Квантитативна анализа макроскопских промена показала је да су $ST2^{-/-}$ мишеви имали значајно ниже вредности индекса лезија желуца и мању укупну површину улцерација у поређењу са WT мишевима (Фигура 1Б и В). Ови резултати указују да недостатак ST2 гена испољава заштитни ефекат у условима акутног оштећења слузнице желуца.



Фигура 1. Дефицијенција ST2 гена смањује макроскопски видљиво акутно оштећење слузнице желуца. (А) Репрезентативне фотографије слузнице желуца експерименталних група које приказују разлике у обиму оштећења слузнице након излагања етанолу. **(Б-В)** Квантитативна процена макроскопског оштећења слузнице желуца одређивањем **(Б)** индекса лезија желуца (%) и **(В)** укупне површине улцерација (mm²) који су добијени снимањем дигиталних фотографија унутрашње површине желуца и њиховом анализом помоћу *ImageJ* софтвера. Резултати су изражени као средња вредност ± SE * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Патохистолошка анализа ткива желуца додатно је потврдила заштитну улогу дефицијенције ST2 гена у моделу акутног оштећења слuzнице желуца етанолом. Делесија ST2 значајно је смањила степен оштећења слuzнице желуца, што је потврђено нижим вредностима хистолошког скорa код ST2^{-/-} мишева у поређењу са WT мишевима третираним етанолом (Фигура 2А). Код ST2^{-/-} животиња је углавном очувана структура слuzнице са минималним хистопатолошким променама. Насупрот томе, WT мишеви третирани етанолом испољили су изражено оштећење слuzнице желуца, које се одликовало нарушеном ћелијском организацијом и губитком епителних ћелија, дезинтеграцијом жлезда, присуством бројних хеморагичних фокуса, субмукозним едемом и интензивном инфилтрацијом инфламацијских ћелија (Фигура 2Б).



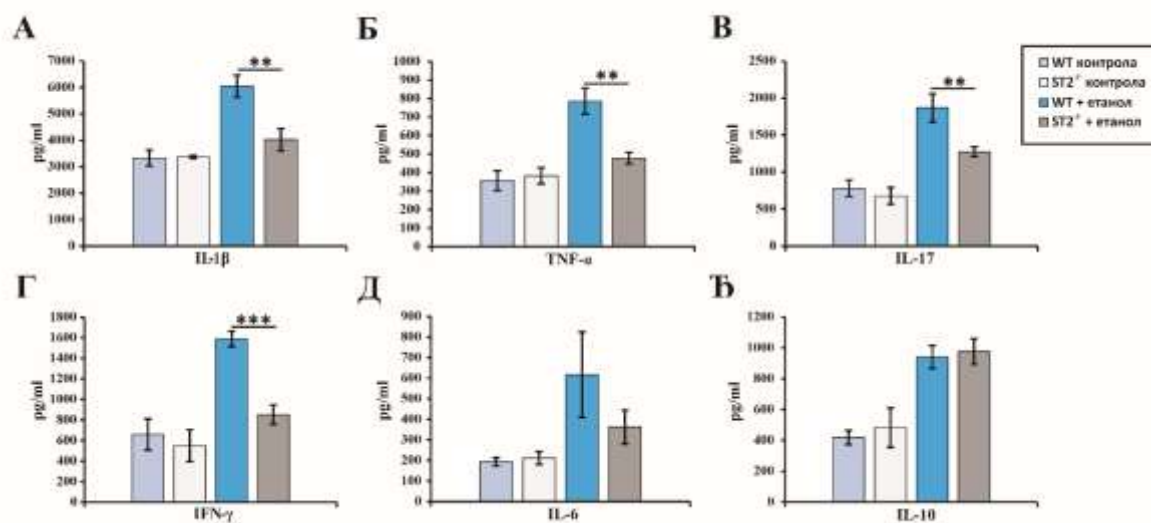
Фигура 2. Делесија ST2 значајно смањује хистолошке параметре оштећења слuzнице желуца. (А) Микроскопска процена оштећења ткива желуца на основу хистолошког скорa. (Б) Репрезентативне фотографије пресека ткива желуца обојених хематоксилином и еозином (увећање од 10x) приказују разлике у интегритету епитела, степену инфилтрације инфламацијских ћелија и организацији ткива између експерименталних група. Подаци су представљени као средња вредност ± SE; *p < 0.05, **p < 0.01.

4.2. ДЕФИЦИЈЕНЦИЈА ST2 ГЕНА СМАЊУЈЕ ЛОКАЛНУ И СИСТЕМСКУ ПРОДУКЦИЈУ ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЦИТОКИНА

У складу са резултатима макроскопских и хистопатолошких анализа, делесија ST2 значајно је смањила продукцију проинфламацијских цитокина код мишева третираних етанолом, како у ткиву желуца, тако и на системском нивоу у серуму мишева. Анализа хомогената ткива желуца показала је да су ST2^{-/-} мишеви третирани етанолом имали значајно ниже концентрације проинфламацијских цитокина IL-1β, TNF-α, IL-17 и IFN-γ (Фигура 3А-Г) у поређењу са WT мишевима. Код ST2^{-/-} мишева третираних етанолом уочене су ниже концентрације проинфламацијског цитокина IL-6 у поређењу са WT мишевима, међутим, ова разлика није достигла статистичку значајност (Фигура 3Д). Насупрот томе, концентрације антиинфламацијског цитокина IL-10 биле су значајно повећане у ткиву желуца и ST2^{-/-} и WT мишева третираних етанолом у односу на контролне групе (Фигура 3Ђ).

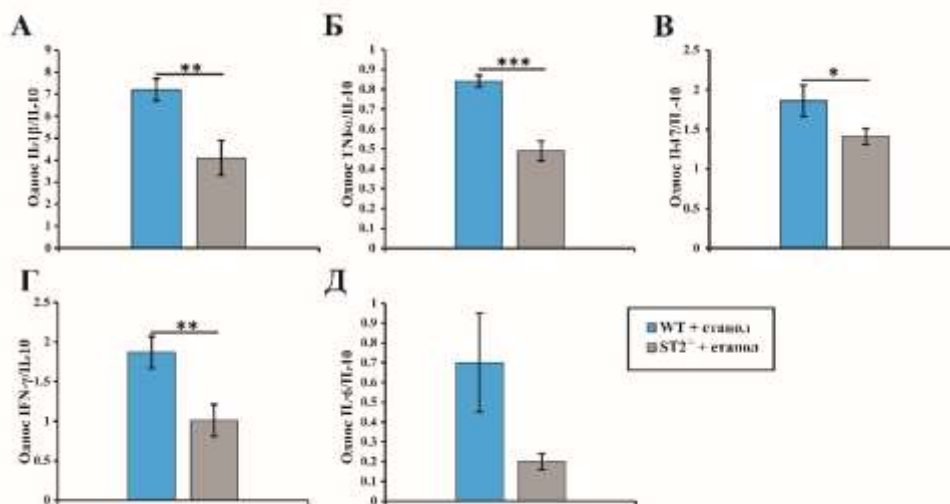
Ради бољег разумевања равнотеже између проинфламацијских и антиинфламацијских одговора, анализирани су односи концентрација цитокина у групама третираним етанолом. Уочено је да су односи проинфламацијских и антиинфламацијског цитокина (IL-1β/IL-10, TNF-α/IL-10, IL-17/IL-10 и IFN-γ/IL-10)

били значајно нижи код $ST2^{-/-}$ мишева у односу на WT животиње (Фигура 4А-Г). Иако је код $ST2^{-/-}$ мишева однос IL-6/IL-10 такође био нижи у односу на WT животиње, уочена разлика није била статистички значајна (Фигура 4Д). Преминација проинфламацијских цитокина код WT животиња додатно потврђује улогу IL-33/ST2 осовине у појачавању инфламацијског одговора током акутног оштећења желуца.



Фигура 3. Делетија $ST2$ супримира локалну продукцију проинфламацијских цитокина.

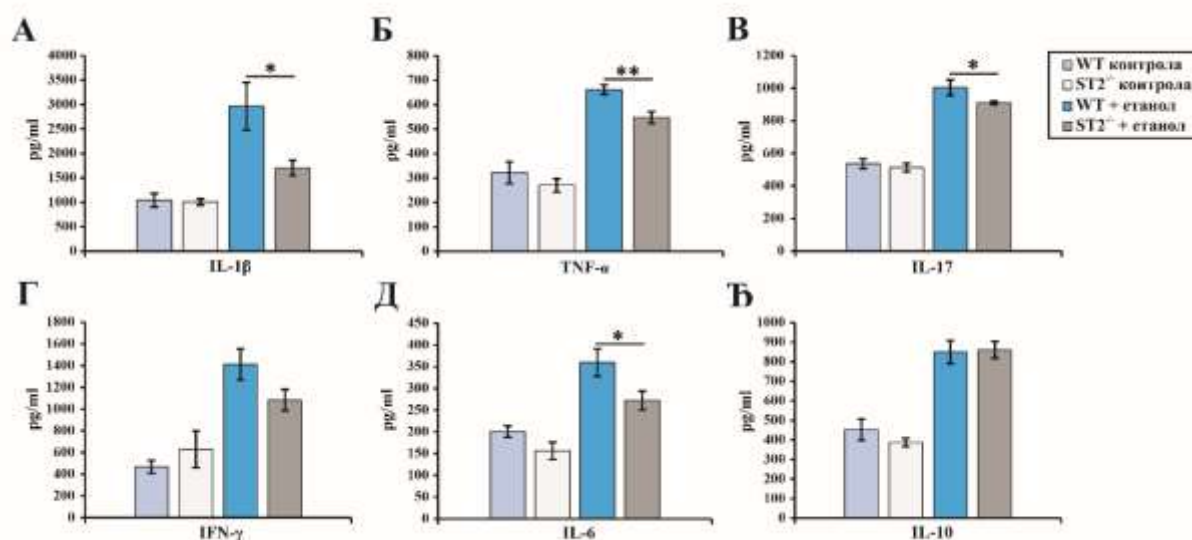
(А-Е) Вредности концентрације проинфламацијских (IL-1 β , TNF- α , IL-17, IFN- γ и IL-6) и антиинфламацијског (IL-10) цитокина у хомогенатима ткива желуца након апликације 80% етанола одређене ELISA методом. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Фигура 4. $ST2$ делеција снижава однос проинфламацијских и антиинфламацијског цитокина у хомогенатима ткива желуца. (А-Д) Вредности односа концентрација проинфламацијских и антиинфламацијског цитокина (IL-1 β /IL-10, TNF- α /IL-10, IL-17/IL-10, IFN- γ /IL-10 и IL-6/IL-10) у хомогенатима ткива желуца након третмана 80% етанолом одређени ELISA методом. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

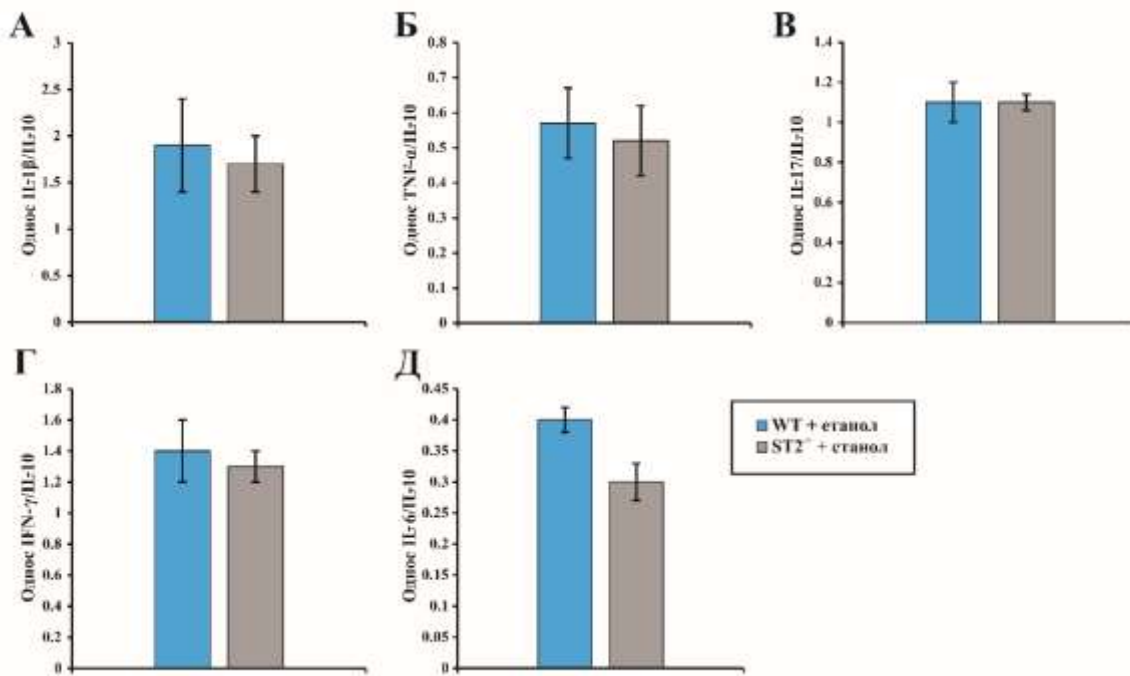
На системском нивоу, $ST2^{-/-}$ мишеви третирани етанолом показивали су значајно ниже концентрације кључних проинфламацијских цитокина $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-17$ и $IL-6$ у серуму у поређењу са WT мишевима третираним етанолом (Фигура 5А, Б, В и Д). Иако је концентрација $IFN-\gamma$ такође била нижа код $ST2^{-/-}$ мишева у поређењу са WT мишевима третираним етанолом, разлика није достигла статистичку значајност (Фигура 5Г). Насупрот томе, вредности концентрације $IL-10$ биле су значајно повећане у серуму обе групе животиња третираних етанолом (Фигура 5Ђ), што додатно потврђује имунорегулаторну функцију $IL-33/ST2$ осовине у условима акутног општећења слузнице желуца.

Анализирани су и односи серумских концентрација цитокина у групама третираним етанолом. Уочено је да у односу концентрација проинфламацијских и антиинфламацијског цитокина ($IL-1\beta/IL-10$, $TNF-\alpha/IL-10$, $IL-17/IL-10$ и $IFN-\gamma/IL-10$) није било значајне разлике код $ST2^{-/-}$ мишева у односу на WT животиње (Фигура 6А-Д).



Фигура 5. Делетија $ST2$ супримира системску продукцију проинфламацијских цитокина.

(А-Ђ) Вредности концентрације проинфламацијских ($IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-17$, $IFN-\gamma$ и $IL-6$) и антиинфламацијског ($IL-10$) цитокина у серуму животиња третираних 80% етанолом одређене ELISA методом. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

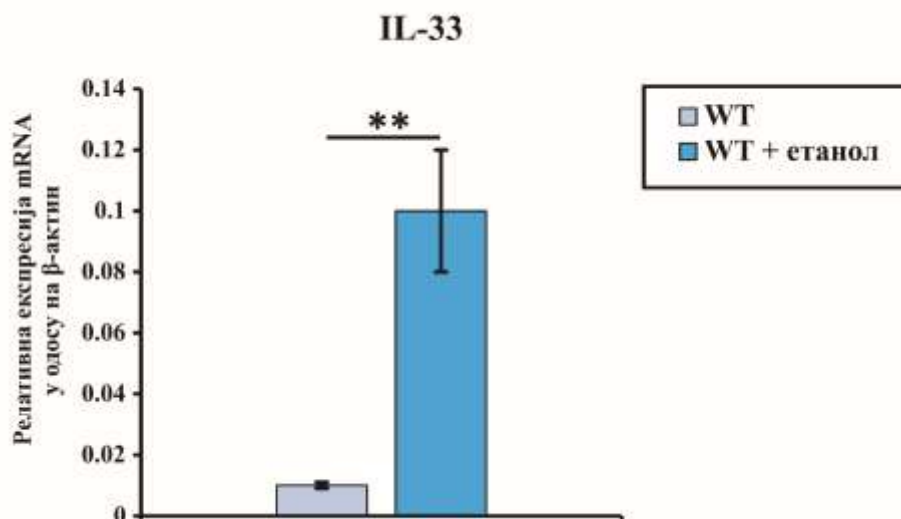


Фигура 6. ST2 делеција не мења значајно однос проинфламацијских и антиинфламацијског цитокина у серумима експерименталних животиња. (А-Д) Вредности односа концентрација проинфламацијских и антиинфламацијског цитокина (IL-1β/IL-10, TNF-α/IL-10, IL-17/IL-10, IFN-γ/IL-10 и IL-6/IL-10) у серумима животиња након третмана 80% етанолом одређени ELISA методом. Вредности су приказане као средња вредност ± SE; *p < 0.05, **p < 0.01.

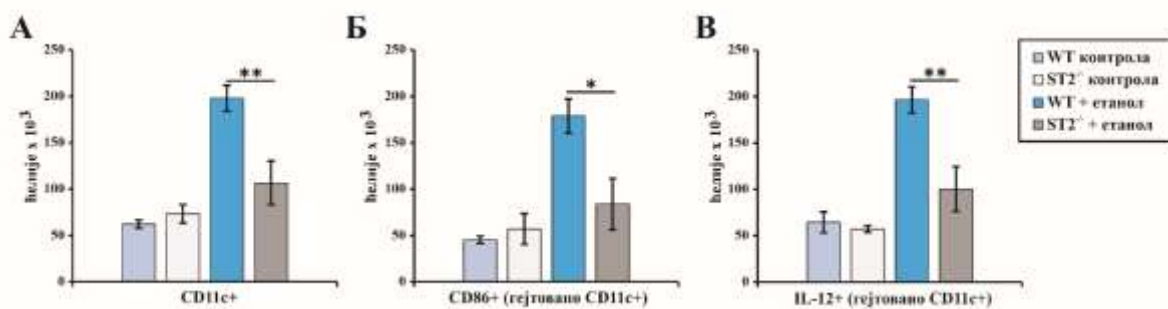
4.3. ПОВИШЕНА ЕКСПРЕСИЈА IL-33 У АКУТНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА ПОДСТИЧЕ Tc1 ИМУНСКИ ОДГОВОР

Познато је да се током оштећења ткива ослобађају различити DAMPs, који делују као специфични сигнални посредници. IL-33, као чувар интегритета епителних баријера, функционише као DAMP и алармин који појачава имунски одговор након повреде или инфекције (257). Добијени резултати су показали да примена етанола значајно повећава експресију IL-33 mRNA у ткиву желуца у односу на контролне животиње (Фигура 7).

Паралелно са повећаном експресијом гена за IL-33, етанол је изазвао изражену инфилтрацију CD11c⁺ дендритских ћелија у ламину проприју желуца WT мишева, укључујући и субпопулације дендритских ћелија који експримирају костимулаторни молекула CD86 као и оних које продукују IL-12, док је овај одговор био слабије изражен код ST2^{-/-} мишева (Фигура 8А-В). Ови резултати указују да IL-33/ST2 сигнални пут подстиче регрутовање и активацију дендритских ћелија током акутног оштећења слузнице желуца.

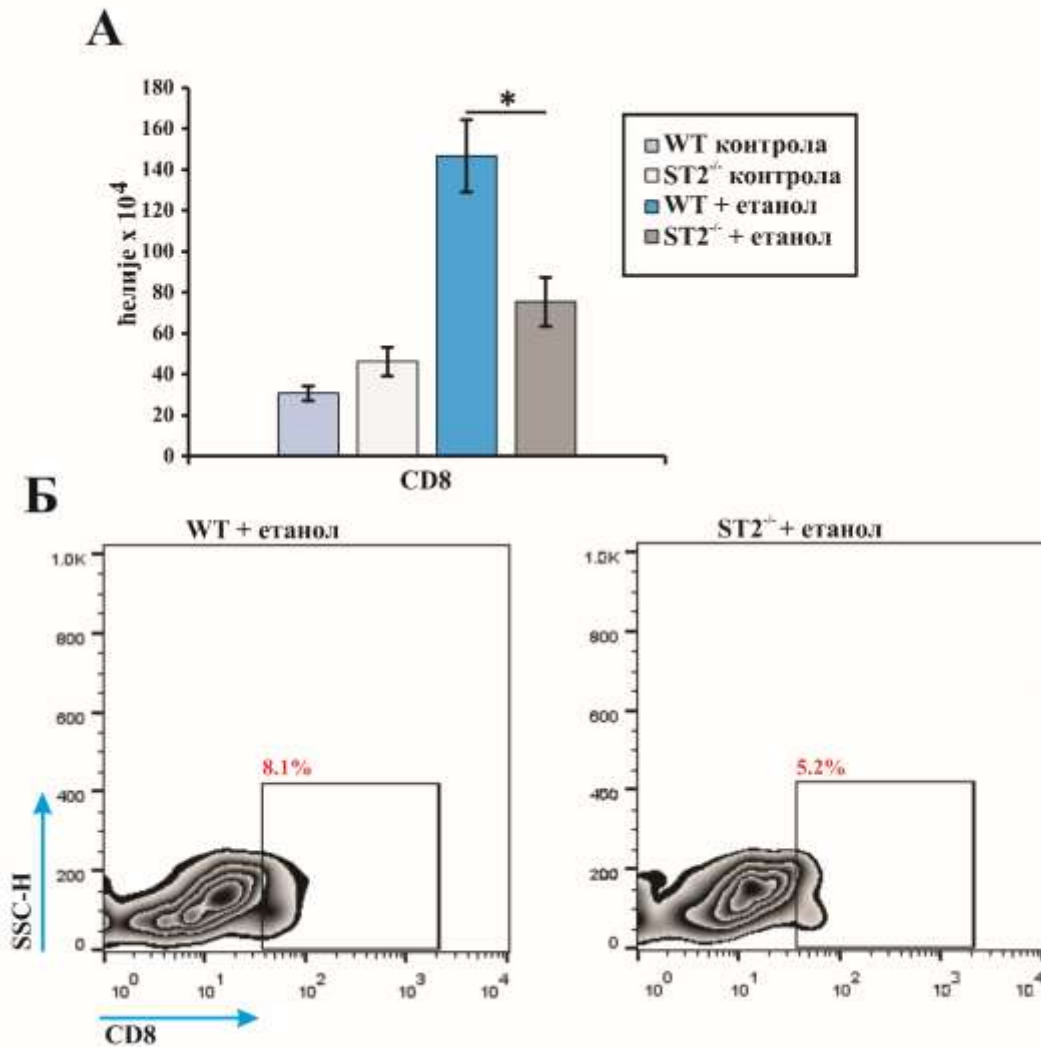


Фигура 7. Повишена експресија IL-33 mRNA у ткиву желуца након апликације етанола. Одређивање експресије IL-33 mRNA након апликације етанола методом RT-PCR. Вредности су приказане као средња вредност ± SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

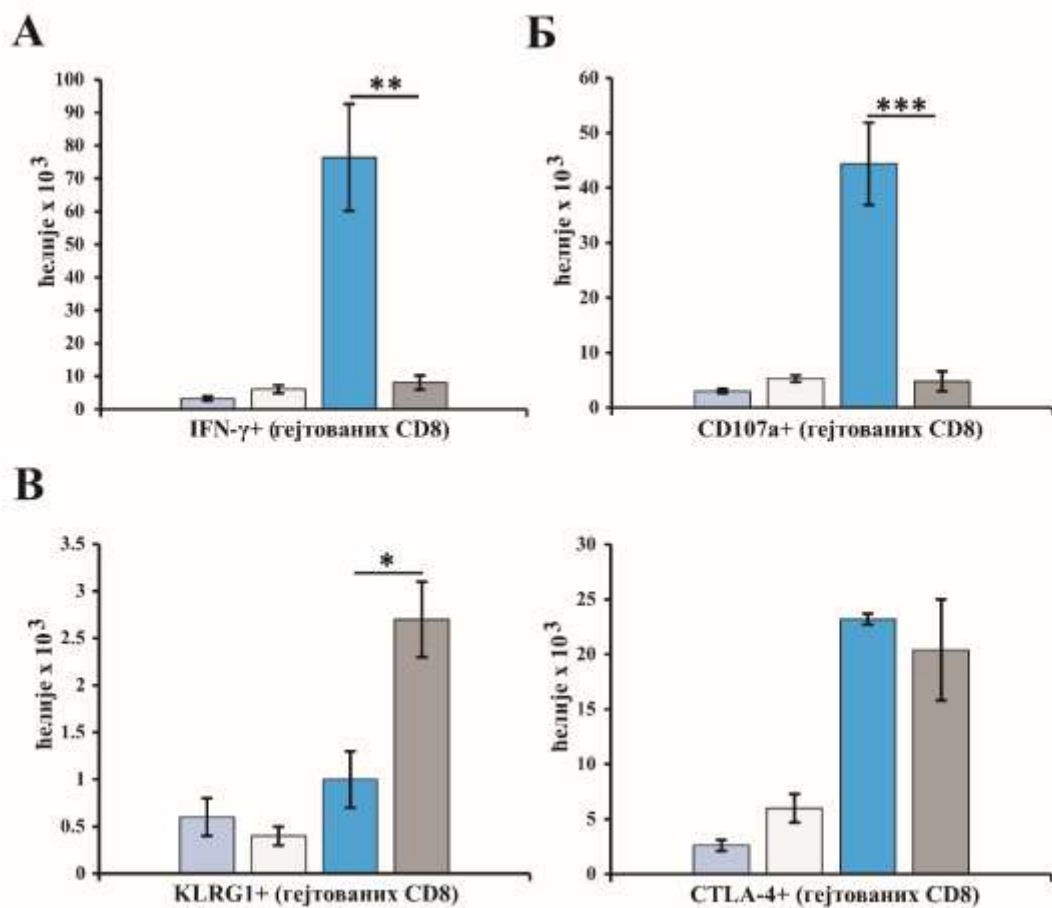


Фигура 8. Повишена експресија IL-33 гена повећава инфилтрацију и функционалну активацију дендритских ћелија. (А-В) Анализа проточном цитометријом показује (А) повећану инфилтрацију CD11c⁺ дендритских ћелија, укључујући (Б) CD86⁺ и (В) IL-12⁺ дендритске ћелије у ламину проприју желуца WT мишева у поређењу са ST2^{-/-} мишевима након третмана етанолом. Вредности су приказане као средња вредност ± SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Поред тога, примена етанола код WT мишева довела је до битног пораста броја CD8⁺ Т лимфоцита у ламину проприју желуца, тачније Тс1 подтипа, који карактерише продукција проинфламацијског цитокина IFN- γ и експресија маркера дегранулације CD107a. Овај пораст био је значајно смањен код ST2^{-/-} мишева (Фигура 9; Фигура 10А и Б), што указује да је ST2 сигнализација неопходна за пуну активацију Тс1 лимфоцита у овом моделу. Штавише, недостатак ST2 гена био је праћен порастом броја CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају инхибиторни рецептор KLRG1, док се број CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају CTLA-4 није разликовао између експерименталних група третираних етанолом (Фигура 10В и Г).



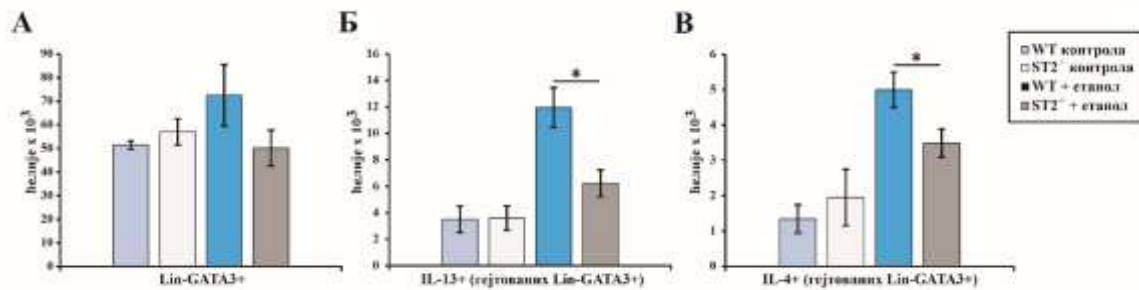
Фигура 9. Повишена експресија IL-33 гена повећава инфилтрацију CD8⁺ Т лимфоцита. Графикони и репрезентативни дот плотови приказују број CD8⁺ Т лимфоцита у ламини проприји желуца WT и ST2^{-/-} мишева након индукције оштећења слузнице желуца етанолом. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Фигура 10. Повишена експресија IL-33 у акутном оштећењу желуца поспешује функционалну активацију CD8⁺ Т лимфоцита. (А и Б) Третман етанолом повећава број Тс1 лимфоцита (IFN- γ^+ CD8⁺ и CD107a⁺CD8⁺) у ламини проприји желуца WT мишева. (В и Г) Недостатак гена за ST2 праћен је повећаним бројем KLRG1⁺CD8⁺ Т лимфоцита након третмана етанолом, док је број CTLA-4⁺CD8⁺ Т лимфоцита повећан у обе групе третиране етанолом, без значајне разлике између њих. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.4. ДЕЛЕЦИЈА ST2 СМАЊУЈЕ ФУНКЦИОНАЛНУ АКТИВНОСТ ILC2 ЋЕЛИЈА И ИМУНСКЕ ОДГОВОРЕ ПОСРЕДОВАНЕ ЕОЗИНОФИЛИМА У АКУТНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА

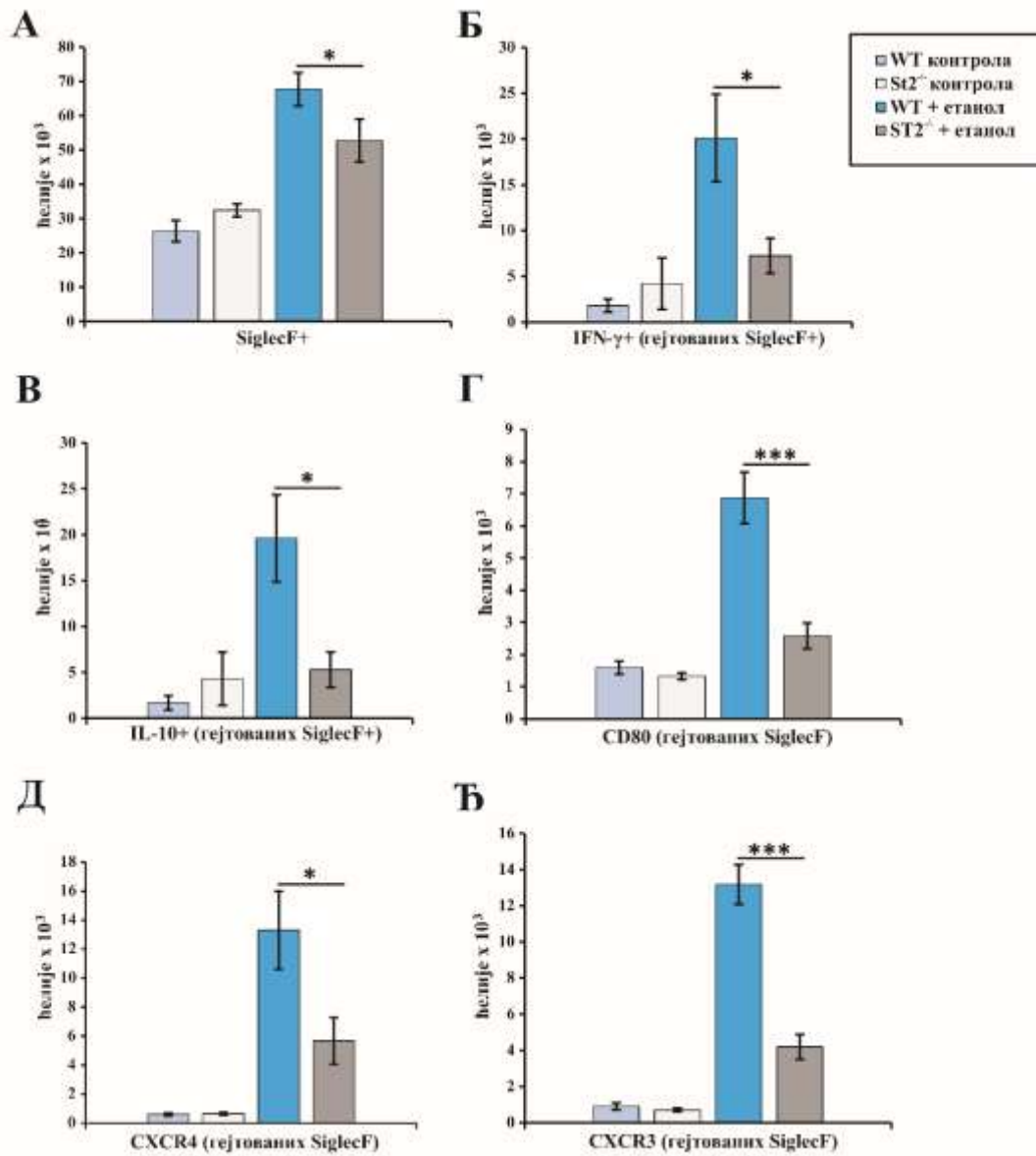
Етанолом изазвано оштећење слузнице желуца није узроковало значајну инфилтрацију ILC2 у ламини проприји желуца (Фигура 11А), док је квалитативном анализом њихове функционалне активности уочен значајно мањи број ILC2 које продукују IL-13 и IL-4 код ST2^{-/-} мишева у поређењу са WT животињама (Фигура 11Б и В).



Фигура 11. Дефицијенција ST2 гена смањује активацију ILC2 у акутном оштећењу желуца. (А-В) Анализа проточном цитометријом показује (А) укупан број ILC2 (Lin-GATA3⁺) као и ILC2 које продукују (Б) IL-13 и (В) IL-4 у ламини проприји желуца након третмана етанолом. Вредности су приказане као средња вредност ± SE; *p < 0.05, **p < 0.01.

У складу са претходно приказаним резултатима, укупан број еозинофила, идентификованих као SiglecF⁺ ћелије, био је значајно мањи у ламини проприји желуца ST2^{-/-} мишева након третмана етанолом у поређењу са WT групом (Фигура 12А). Даља анализа њиховог функционалног фенотипа показала је да је недостатак ST2 рецептора праћен значајним смањењем субпопулација еозинофила које продукују проинфламацијски цитокин IFN- γ (Фигура 12Б), антиинфламацијски цитокин IL-10 (Фигура 12В), као и еозинофила који експримирају костимулаторни молекул CD80 (Фигура 12Г) и хемокинске рецепторе CXCR4 и CXCR3 на својој површини (Фигура 12Д, Ђ). Ови рецептори имају кључну улогу у миграцији и задржавању ћелија у инфламацијским жариштима (258), те смањена експресија додатно указује на умањену способност еозинофила да активно учествују у инфламацијским процесима код ST2^{-/-} мишева.

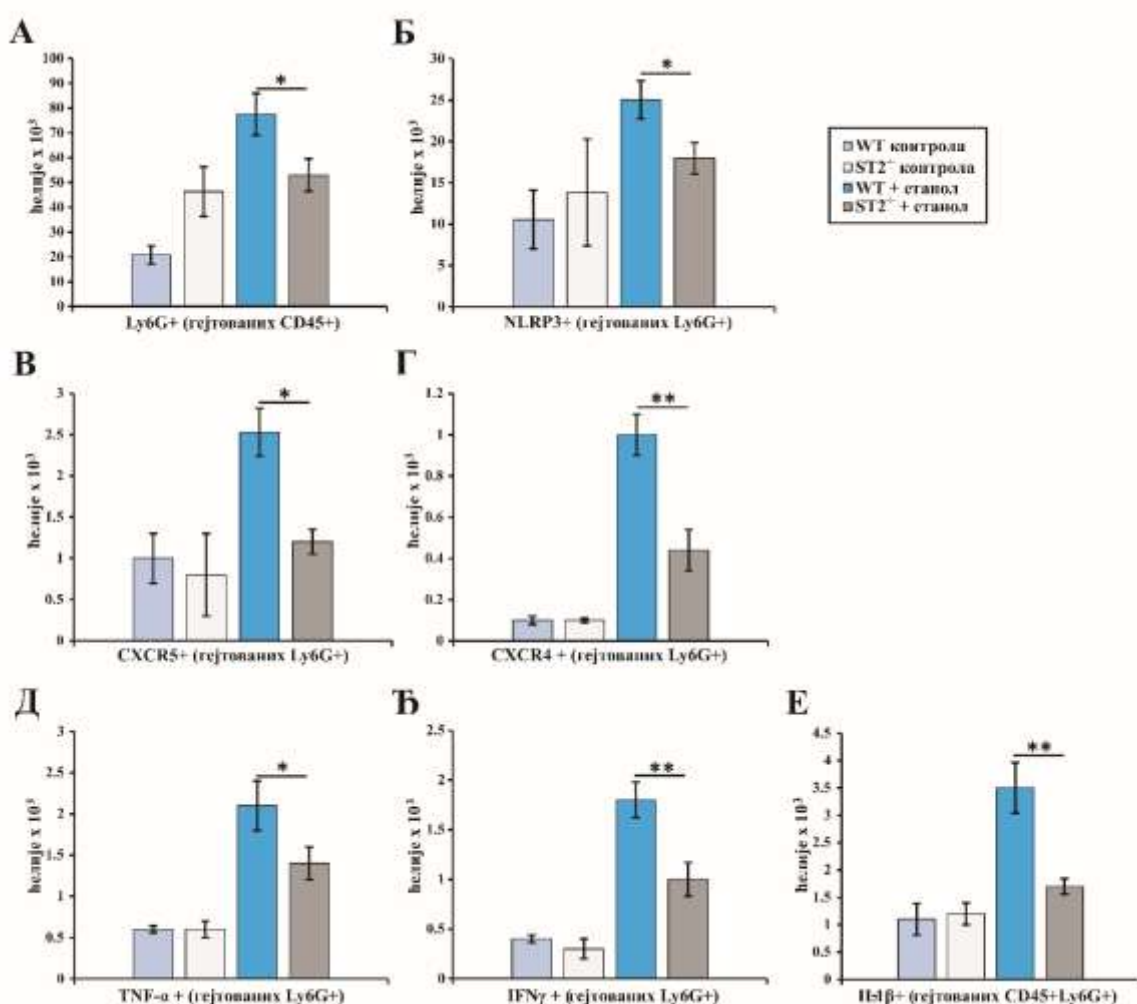
Ови резултати јасно указују на то да IL-33/ST2 осовина игра битну улогу у регрутовању, активацији и задржавању еозинофила на месту оштећења, при чему ове ћелије учествују у продукцији и тип 1 и тип 2 цитокина, чиме доприносе обликовању сложеног локалног инфламацијског окружења током акутног оштећења слузнице желуца.



Фигура 12. Делеција ST2 смањује регрутацију и функционалну активацију еозинофила у акутном оштећењу желуца. (А) Укупан број еозинофила (SiglecF⁺), (Б) IFN- γ +SiglecF⁺, (В) IL-10+SiglecF⁺; (Г) CD80+SiglecF⁺, (Д) CXCR4+SiglecF⁺ и (Е) CXCR3+SiglecF⁺ еозинофила у ткиву желуца након апликације етанола, одређен проточном цитометријом. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.5. ДЕЛЕЦИЈА ST2 РЕГУЛИШЕ АКТИВНОСТ НЕУТРОФИЛА И МАКРОФАГА ИНХИБИЦИЈОМ ЕКСПРЕСИЈЕ NF- κ B И NLRP3 У АКУТНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА

Ради даљег испитивања улоге делеције ST2 у модулацији инфламацијског миљеа током акутног оштећења желуца, анализирани су фенотип и функција неутрофила и макрофага који инфилтришу ламину проприју желуца код WT и ST2^{-/-} мишева. Добијени резултати показали су да је код ST2^{-/-} мишева третираних етанолом акумулација Ly6G⁺ неутрофила у слузници желуца била значајно мања у поређењу са WT животињама (Фигура 13А). Такође, уочен је значајно мањи број неутрофила који експримирају NLRP3, CXCR5 и CXCR4 у овој групи животиња у односу на WT животиње (Фигура 13Б-Г). Поред тога, број неутрофила који продукују проинфламацијске цитокине TNF- α , IFN- γ и IL-1 β је значајно редукован код ST2^{-/-} мишева третираних етанолом (Фигура 13Д-Е) поређењем са WT животињама, што додатно потврђује да делеција ST2 умањује како акумулацију тако и активацију неутрофила током акутног оштећења желуца.

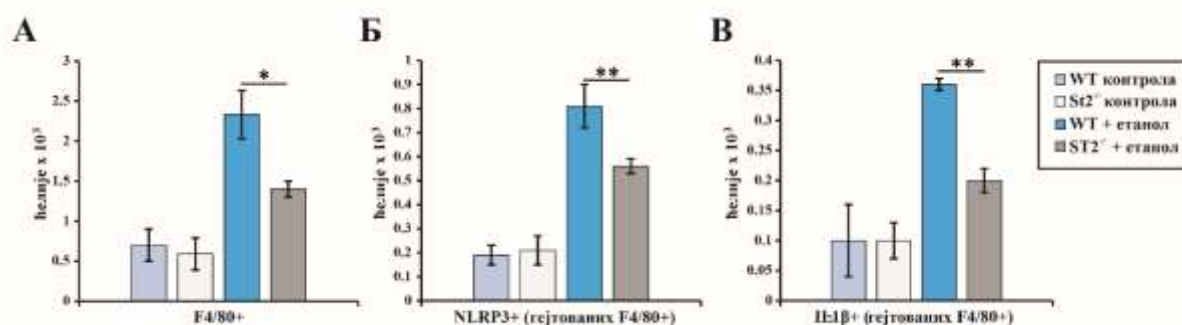


Фигура 13. Делеција ST2 смањује акумулацију и активацију неутрофила. (А) Проточном цитометријом одређен је укупан број неутрофила (Ly6G⁺) у ткиву желуца након апликације етанола. Поред тога, анализирани су функционалне и фенотипске карактеристике неутрофила, укључујући субпопулације које експримирају (Б) NLRP3, (В) CXCR5 и (Г) CXCR4, као и оне које продукују проинфламацијске цитокине (Д) TNF- α , (Ђ) IFN- γ и (Е) IL-1 β . Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

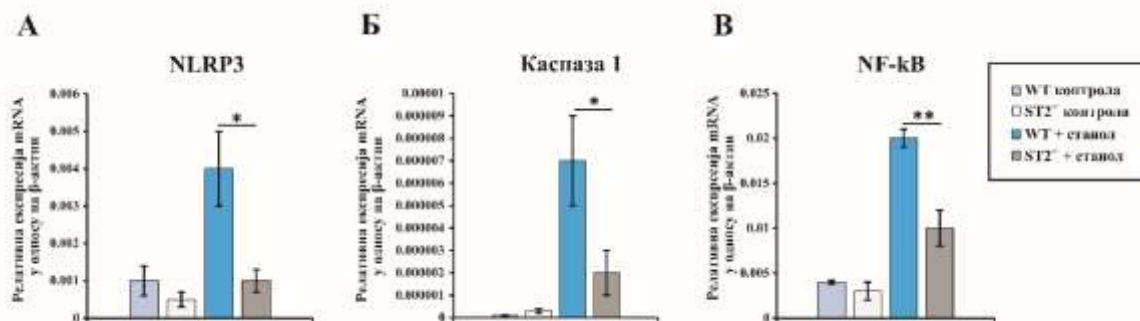
Анализа броја и активности макрофага проточном цитометријом у оштећеном ткиву желуца показала је да је код $ST2^{-/-}$ мишева након примене етанола број $F4/80^{+}$ макрофага значајно смањен, као и присуство проинфламацијских M1 макрофага који експримирају NLRP3 и продукују IL-1 β у поређењу са WT мишевима (Фигура 14А-В).

У складу са овим резултатима, ткиво желуца $ST2^{-/-}$ мишева показало је значајно ниже нивое експресије mRNA за NLRP3 и каспазу 1 у поређењу са WT групом (Фигура 15А и Б), што указује на то да делеција ST2 гена супримира инфламацијске процесе зависне од активације NLRP3 инфлазома и каспазе 1, чиме се ублажава оштећење слузнице желуца.

С обзиром на централну улогу NF- κ B у регулацији инфламацијских процеса и преживљавања ћелија, даља анализа била је усмерена на испитивање утицаја делеције ST2 гена на активност овог транскрипционог фактора. У том контексту, код $ST2^{-/-}$ мишева третираних етанолом показан је значајно нижи ниво експресије NF- κ B mRNA у поређењу са WT животињама (Фигура 15В), што додатно указује на значајну регулаторну улогу IL 33/ST2 осовине у контроли инфламацијских одговора.



Фигура 14. Дефицијенција ST2 гена смањује инфилтрацију и активацију M1 макрофага. (А) Укупан број макрофага ($F4/80^{+}$) у ткиву желуца након излагања етанолу, укључујући M1 субпопулације макрофага које експримирају (Б) NLRP3 и продукују (В) IL-1 β , одређени проточном цитометријом. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



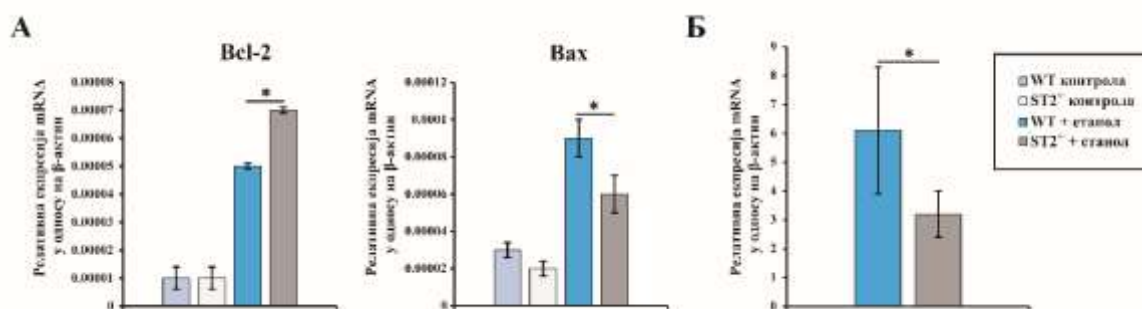
Фигура 15. Делеција ST2 смањује експресију гена за NLRP3, каспазу 1 и NF- κ B у ткиву желуца након акутног оштећења изазваног етанолом. (А-В) Нивои експресије mRNA за (А) NLRP3, (Б) каспазу 1 и (В) NF- κ B у ткиву желуца одређени методом RT-PCR. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.6. ДЕЛЕЦИЈА ST2 ОГРАНИЧАВА АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ ЖЕЛУЦА ИНХИБИЦИЈОМ РАЗЛИЧИТИХ ВИДОВА ЋЕЛИЈСКЕ СМРТИ

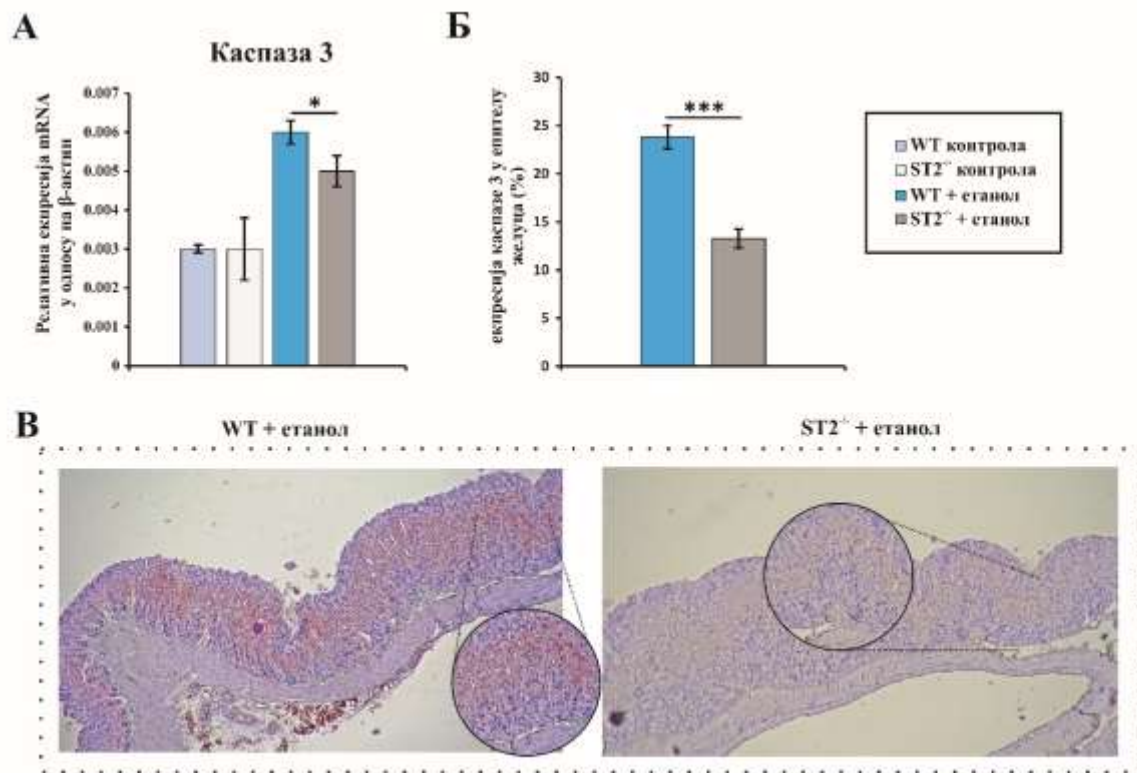
Поред инфламацијских процеса, акутно оштећење ткива желуца укључује и активацију различитих механизма ћелијске смрти (259). Анализа утицаја делеције ST2 на поремећај регулације сигнала који контролишу ћелијско преживљавање и смрт показала је да су ST2^{-/-} мишеви третирани етанолом имали значајно повећану експресију антиапоптотског протеина Bcl-2 у ткиву желуца у поређењу са WT животињама. Насупрот томе, ниво експресије проапоптотског протеина Вах био је значајно смањен код ST2^{-/-} мишева након излагања етанолу (Фигура 16А). Поред наведеног, однос експресије Вах/Bcl-2 mRNA био је значајно мањи код ST2^{-/-} мишева третираних етанолом, што додатно потврђује улогу IL-33/ST2 осовине у промоцији апоптозе (Фигура 16Б).

Такође, код ST2^{-/-} мишева третираних етанолом утврђен је значајно нижи ниво експресије mRNA за извршну каспазу-3 у поређењу са WT животињама (Фигура 17А). Имунохистохемијска анализа желудачног ткива додатно је потврдила ове резултате, показујући значајно мању процентуалну заступљеност епителних ћелија које експримирају каспазу-3 у слузници желуца ST2^{-/-} мишева (Фигура 17Б, В).

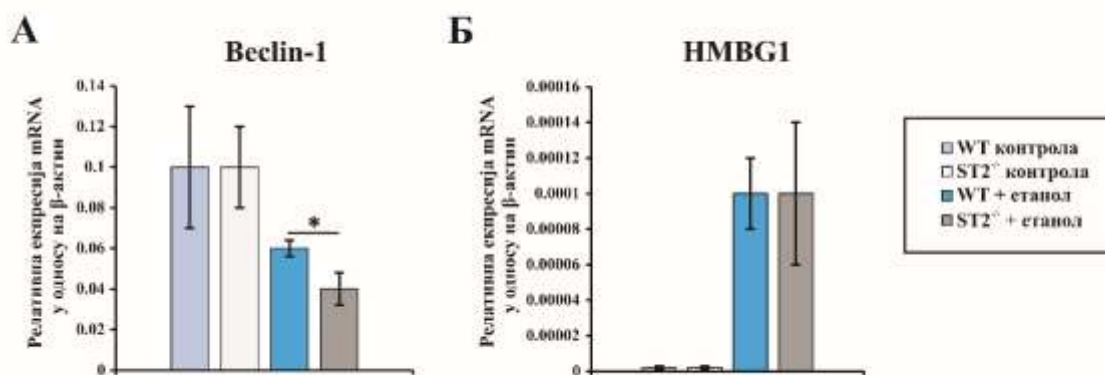
Осим утицаја на апоптозу, делеција ST2 може утицати и на друге облике ћелијске смрти. Као што је приказано на Фигури 18А, код ST2^{-/-} мишева третираних етанолом забележена је значајно снижена експресија Beclin-1 mRNA, кључног регулатора аутофагије (260), у поређењу са WT групом. Истовремено, повећана експресија HMGB1 mRNA у оба генотипа третирана етанолом (Фигура 18Б) може указивати на индукцију некрозе у овом моделу. Такође, код ST2^{-/-} мишева уочен је знатно мањи број епителних ћелија које експримирају TNF- α у слузници желуца (Фигура 19А и Б), што указује на могућност да IL-33/ST2 осовина учествује у регулацији некроптотичких механизма.



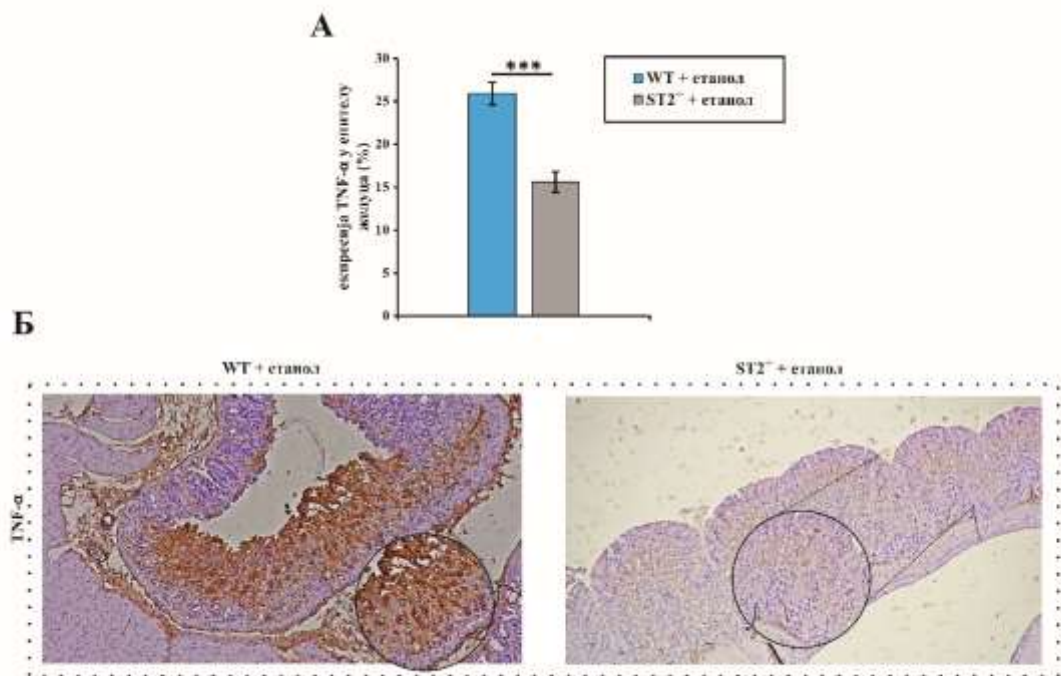
Фигура 16. Делеција ST2 инхибира апоптозу у ткиву желуца. (А) Анализа експресије mRNA методом RT-PCR за Bcl-2 и Вах. (Б) Однос експресије Вах/Bcl-2 у ткиву желуца након третмана етанолом. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Фигура 17. Делесија ST2 смањује експресију извршне каспазе-3 у ткиву желуца. (А) Анализа експресије каспазе-3 mRNA методом RT-PCR. (Б и В) Процентуална заступљеност епителних ћелија слузнице желуца које експримирају каспазу-3 анализирана имунохистохемијском методом. Репрезентативни пресеци ткива желуца где се запажа присуство и дистрибуција епителних ћелија које експримирају каспазу-3 на увећању од 10х. Вредности су приказане као средња вредност ± SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Фигура 18. Делесија ST2 утиче на експресију молекула укључених у различите видове ћелијске смрти. Ниво експресије mRNA за (А) Beclin-1 и (Б) HMGB1 у ткиву желуца одређен методом RT-PCR. Вредности су приказане као средња вредност ± SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

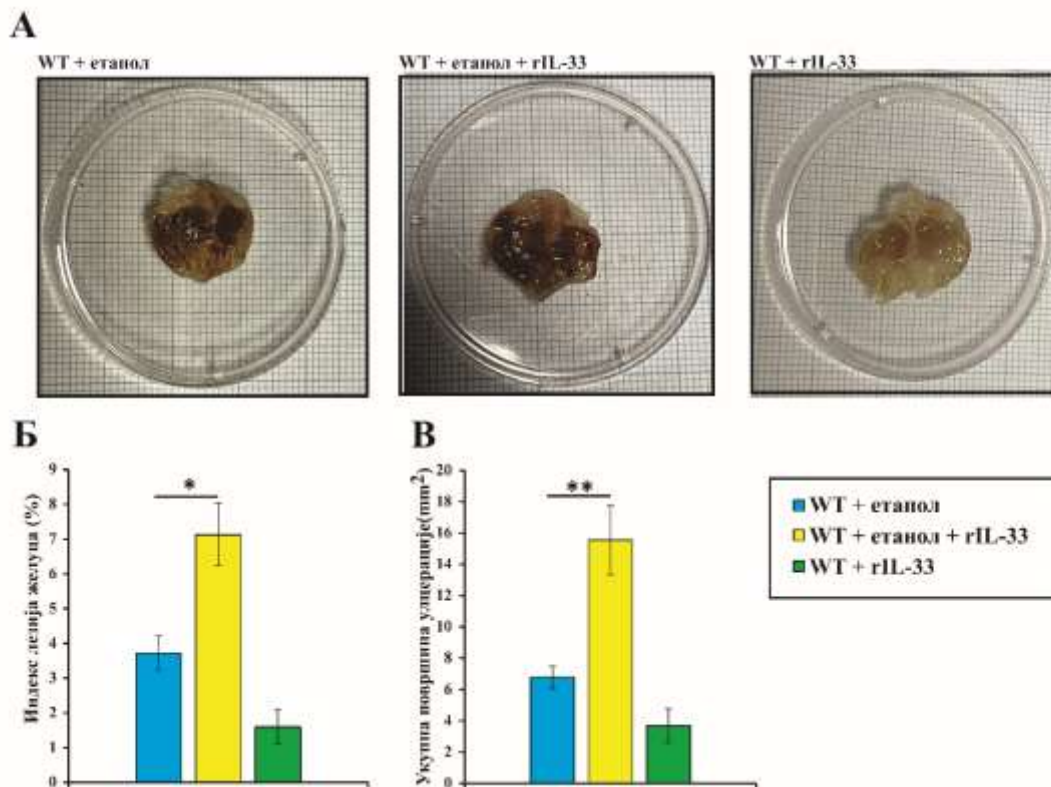


Фигура 19. Делетија ST2 смањује експресију TNF- α у епителу слuzнице желуца након третмана етанолом. (А и Б) Графикони и репрезентативне фотографије приказују процентуалну заступљеност епителних ћелија слuzнице желуца које експримирају TNF- α процењен имунохистохемијском методом на увећању од 10х. Вредности су приказане као средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

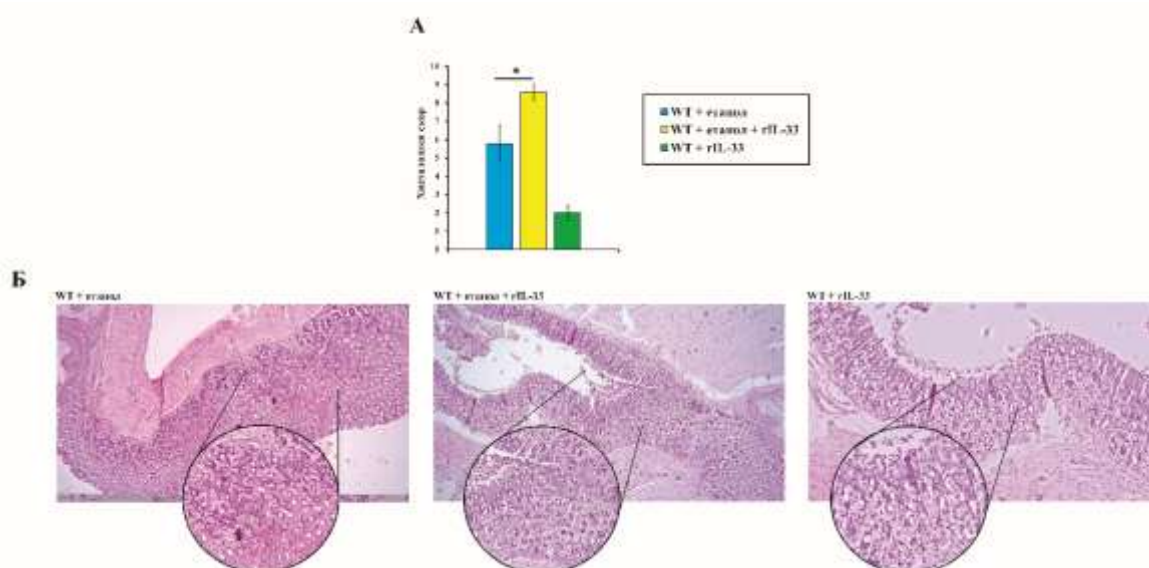
4.7. ПРЕТРЕТМАН СА rIL-33 ПОГОРШАВА АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ ЖЕЛУЦА

Додатно, испитан је ефекат стимулације IL-33/ST2 сигналног пута на развој акутног оштећења желуца након примене једнократне дозе rIL-33 интраперитонеално, два сата пре излагања етанолу. Резултати су показали да су WT мишеви који су претходно третирани екзогеним IL-33 испољили значајно израженије структурно оштећење слuzнице желуца, које се карактерисало опсежним ерозијама и хеморагичним лезијама, у поређењу са WT мишевима који су третирани само етанолом. Квантитативна макроскопска анализа потврдила је да је претретман са rIL-33 изазвао значајно веће вредности индекса лезија желуца и повећање укупне површине улцерација у односу на групу мишева која је третирана само етанолом (Фигура 20А-В).

У складу са резултатима макроскопске анализе оштећења ткива желуца, патохистолошка анализа је показала значајно повећане вредности хистолошког скорa након апликације етанола код WT мишева претходно третираних са rIL-33 у односу на мишеве који су третирани само етанолом (Фигура 21А), што додатно потврђује улогу IL-33 у погоршању оштећења слuzнице желуца. Иако су у обе групе забележене изражене хистолошке промене, претретман са rIL-33 узроковао је опсежније оштећење ткива, уз наглашену структурну дезорганизацију и појачану инфилтрацију инфламацијских ћелија (Фигура 21Б). Изражено погоршање макроскопских и патохистолошких параметара оштећења након примене rIL-33 потврђује патогену улогу IL-33/ST2 осовине у развоју акутних оштећења слuzнице желуца.



Фигура 20. Апликација rIL-33 интензивира макроскопско оштећење желуца. (А) Репрезентативне макроскопске фотографије које илуструју обимност оштећења слузнице желуца изазване етанолом након претретмана са rIL-33. (Б-В) Квантитативна процена оштећења желуца одређивањем (Б) индекса лезија желуца (%) и (В) укупне површина улцерације (mm²) анализирани помоћу *ImageJ* софтвера. Вредности су приказане као средња вредност ± SE; *p < 0.05, **p < 0.01.



Фигура 21. Апликација rIL-33 погоршава хистолошке параметре оштећења слузнице желуца. (А) Патохистолошка процена степена оштећења ткива одређивањем хистолошког скорa семиквантитативном методом. (Б) Репрезентативне микрофотографије пресека ткива желуца обојених хематоксилином и еозином на увећању од 10x и 40x. Вредности су приказане као средња вредност ± SE; *p < 0.05, **p < 0.01.

5. ДИСКУСИЈА

Основни закључак спроведеног истраживања указује да дефицијенција гена за ST2 смањује оштећење слузнице желуца кроз супресију инфламације и ограничавање ћелијске смрти у моделу акутног оштећења желуца изазваног етанолом.

5.1. ДЕЛЕЦИЈА ST2 СМАЊУЈЕ АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ ТКИВА ЖЕЛУЦА ИЗАЗВАНО ЕТАНОЛОМ

Због своје учесталости и клиничког значаја, пептична улкусна болест заузима важно место у свакодневној гастроентеролошкој пракси (2, 14, 15). Због изражених симптома који значајно нарушавају квалитет живота и ограничавају свакодневне активности, као и због потенцијално животно угрожавајућих компликација попут крварења, перфорације и опструкције, ова болест остаје један од важних узрока морбидитета и морталитета у општој популацији (2, 17). Упркос напретку у разумевању патогенезе и развоју савремених терапијских приступа, механизми који управљају настанком и прогресијом акутног оштећења слузнице желуца и даље нису у потпуности разјашњени, што намеће потребу за даљим експерименталним истраживањима.

У том смислу, модел акутног оштећења желуца изазван етанолом представља добро утемељен и широко примењиван експериментални приступ за проучавање патофизиолошких механизма настанка улкусне болести желуца, а истовремено служи и као поуздан систем за процену ефикасности потенцијалних гастропротективних терапеутика. Овај модел на веродостојан начин репродукује кључне патогенетске одлике акутног оштећења слузнице желуца, као и егзацербације хроничног улкуса код људи (154-158). Значајан допринос разумевању раних догађаја у оштећењу слузнице желуца дала је студија *Buzzelli* и сарадника (214), која је показала рани пораст експресије IL-33 у желуцу након инфективног и хемијског оштећења, чиме је овај цитокин препознат као алармин у акутном оштећењу желуца. У складу са овим налазима, у овој студији уочен је значајан пораст експресије IL-33 mRNA након апликације етанола, чиме је додатно потврђена његова улога „раног сензора“, односно алармина ткивног оштећења у овом моделу (Фигура 7). Међутим, кључно питање које се наметнуло било је да ли ово повећање експресије IL-33 mRNA представља само епифеномен оштећења слузнице или има стварни функционални значај у патогенези акутног оштећења желуца. Како бисмо разјаснили ову дилему, у наставку истраживања користили смо модел акутног стерилног оштећења желуца индукованог етанолом у условима генетске делеције ST2, кључног рецептора посредством кога IL-33 остварује своје биолошке ефекте.

Резултати ове студије јасно су потврдили функционални значај IL-33/ST2 осовине, с обзиром на то да су кључне морфолошке одлике акутног оштећења желуца, укључујући ексфолијацију епитела, хеморагију, едем и изражен инфламацијски инфилтрат, биле значајно ублажене у условима дефицијенције гена за ST2 рецептор (Фигура 1; Фигура 2). Ови резултати недвосмислено указују да IL-33/ST2 осовина има значајну улогу у настанку и интензитету акутног стерилног оштећења желуца, те указују на потребу за даљим истраживањем имуномеханизма путем којих ова осовина обликује патолошке процесе у слузници желуца.

5.2. ДЕЛЕЦИЈА ST2 СУПРИМИРА ИНФЛАМАЦИЈУ И АКТИВАЦИЈУ ЕФЕКТОРСКИХ ЋЕЛИЈА УРОЂЕНЕ ИМУНОСТИ У АКУТНОМ СТЕРИЛНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА

Након што смо утврдили да IL-33/ST2 сигнална осовина има функционално значајну улогу у развоју акутног стерилног оштећења желуца, следећи корак ове студије био је да испита у којој мери су уочени ефекти посредовани инфламацијом и активацијом имунског одговора. С обзиром на то да инфламација представља један од кључних

патофизиолошких механизма у настанку и прогресији акутног оштећења слuzнице желуца (104-106), анализирани су концентрације цитокина у хомогенатима ткива желуца, као и у серуму експерименталних животиња. Недостатак ST2 рецептора значајно је смањено концентрације проинфламацијских цитокина (IL-1 β , TNF- α , IL-17, IFN- γ и IL-6), како на локалном, тако и на системском нивоу (Фигура 3; Фигура 4; Фигура 5; Фигура 6). Ови резултати указују да смањено морфолошко оштећење слuzнице желуца у ST2^{-/-} животиња прати и ослабљен инфламацијски одговор што представља полазну основу за даљу анализу појединачне улоге ћелија имунског система укључених у овај процес. Вреди истаћи да је пораст локалних и системских концентрација IL-10, уочен код оба генотипа (Фигура 3Б; Фигура 5Б), вероватно одраз компензаторног механизма чији је циљ ограничавање прекомерне и потенцијално штетне инфламације у овом моделу.

Неутрофили и макрофаги заузимају средишње место међу ефекторским ћелијама у настанку и напредовању улкусне болести, делујући као директни посредници инфламацијског оштећења слuzнице желуца (261, 262). Неутрофили, као прве и бројчано најзаступљеније ћелије које пристижу на место оштећења, представљају поуздан показатељ хистолошке активности болести у клиничкој пракси, при чему се њихово присуство у хистолошким пресецима слuzнице желуца сматра обележјем акутне фазе или егзацербације улкусне болести (263, 264). Активирани неутрофили доприносе оштећењу слuzнице желуца кроз појачану продукцију реактивних врста кисеоника, проинфламацијских цитокина и протеолитичких ензима, чиме се последично нарушава интегритет епителне баријере (265, 266). Посебно значајну улогу има ензим мијелопероксидаза (енгл. *myeloperoxidase*, MPO), чијим дејством се разграђују компоненте везивног ткива и као крајњи резултат се јавља прогресивна деструкција епитела (265, 267). Недавна истраживања указују да неутрофили учествују у оштећењу слuzнице желуца и путем формирања екстрацелуларних замки (енгл. *neutrophil extracellular traps*, NETs), комплексних структура састављених од DNA и грануларних протеина, које иако имају протективну улогу у одбрани од патогена, у условима неконтролисаних инфламација могу постати значајан узрок ткивног оштећења (268, 269).

У том инфламацијском миљеу, макрофаги крећу да обликују ток болести кроз продукцију цитокина, регулацију инфламацијског одговора и интеракцију са другим ћелијама имунског система, чиме заједно са неутрофилима чине динамичну и патогенетски релевантну ћелијску основу оштећења слuzнице желуца (104-106, 270). У зависности од карактеристика локалног инфламацијског окружења, макрофаги испољавају изражену функционалну пластичност и могу се поларизовати ка проинфламацијском M1 фенотипу, који доприноси оштећењу ткива појачаном продукцијом TNF- α , IL-1 β и реактивних врста кисеоника, или ка антиинфламацијском M2 фенотипу, који је превасходно укључен у репаративне процесе, резолуцију инфламације и ремоделовање ткива (270). У том смислу, IL-33 се издваја као значајан регулатор поларизације макрофага, способан да у зависности од контекста инфламације, усмерава њихову диференцијацију ка оба функционална фенотипа (271). Поред тога, макрофаги делују као антиген-презентујуће ћелије, повезујући урођени и стечени имунски одговор и додатно утичући на активацију Т лимфоцита у слuzници желуца (272). На тај начин, кроз сложене интеракције са неутрофилима, епителним ћелијама и другим ћелијским популацијама имунског система, макрофаги представљају централне регулаторе патолошких процеса који одређују интензитет, ток и исход улкусног оштећења желуца. Анализирајући улогу наведених ефекторских ћелија у овом моделу, показали смо да је ослабљен инфламацијски одговор, условљен недостатком ST2 рецептора, био праћен смањеном акумулацијом и активацијом неутрофила и макрофага у оштећеној слuzници желуца (Фигура 13; Фигура 14). Детаљнијом анализом неутрофила показано је да IL-33/ST2 сигнална осовина не утиче искључиво на бројност ових ћелија,

већ и на њихов функционални фенотип. Штавише, делеција ST2 била је повезана са смањеном продукцијом проинфламацијских цитокина од стране неутрофила (Фигура 13Д-Е), као и са редукованом експресијом хемокинских рецептора, укључујући CXCR5 (Фигура 13В, Г). Ови налази указују на потенцијално нову и до сада недовољно истражену улогу CXCR5 у регулацији функције неутрофила у условима акутне инфламације (273). У прилог значају IL-33/ST2 осовине у имуномодулацији неутрофила говоре и раније студије које су показале да IL-33 подстиче миграцију неутрофила у реуматоидном артритису, као и да промовише формирање NETs током стерилног оштећења јетре, чиме се додатно интензивира инфламација и оштећење ткива (274, 275). Уз то, уочено је смањење броја M1 макрофага у оштећеном ткиву желуца мишева са недостатком ST2 рецептора (Фигура 14А, В), што јасно указује на улогу IL-33/ST2 осовине у усмеравању поларизације макрофага ка проинфламацијском фенотипу у овом моделу.

Имајући у виду централну улогу транскрипционог фактора NF-κB у регулацији експресије бројних медијатора инфламације који значајно доприносе настанку и прогресији акутног оштећења желуца (276), у наставку истраживања испитиван је утицај IL-33/ST2 осовине на његову транскрипциону активност. У овој студији, показано је да делеција ST2 смањује експресију NF-κB mRNA у оштећеном ткиву желуца (Фигура 15В), што јасно указује да ова сигнална осовина учествује у обликовању инфламацијског одговора, бар делимично и посредством активације NF-κB транскрипционог фактора. Ови налази су у сагласности са ранијим подацима из литературе, који су показали да IL-33/ST2 сигнализација може заиста да активира NF-κB у различитим популацијама имунских и стромалних ћелија (277-279). Насупрот томе, *Buzzelli* и сарадници (214) су показали да акутна примена rIL-33 активира ERK1/2 сигнални пут, али без значајног пораста нивоа NF-κB у ткиву желуца. Ова разлика указује на евидентно разграничење између ефеката егзогене, фармаколошке примене IL-33 и ендogene IL-33 сигнализације, која се покреће као последица ткивног оштећења у акутном моделу оштећења желуца изазваног етанолом. У овом контексту, може се претпоставити да сигнали ћелијске смрти и ослобођени DAMPs активирају различите инфламацијске програме, у зависности од природе и извора IL-33.

5.3. ДЕЛЕЦИЈА ST2 КАО МЕХАНИЗАМ ГАШЕЊА „ВАТРЕ“ ИНФЛАМАЗОМА У АКУТНОМ ОШТЕЋЕЊУ ЖЕЛУЦА

Имајући у виду појачану продукцију IL-1β условљену активацијом IL-33/ST2 осовине, као и изражену инфилтрацију макрофага проинфламацијског M1 фенотипа и неутрофила у оштећеној слузници желуца, у наставку истраживања усмерена је пажња на могућу укљученост NLRP3 инфламазома у овом патолошком процесу. NLRP3 инфламазом представља цитоплазматски сензорски комплекс који се активира широким спектром инфективних и неинфективних стимулуса и посредује активацији IL-1β и IL-18 преко каспазе-1 (280), чиме значајно доприноси настанку и продубљивању улкусних лезија желуца (281). Традиционално, макрофаги су сматрани примарним ћелијама одговорним за канонску активацију NLRP3 инфламазома (282), међутим, све већи број доказа указује да и неутрофили могу деловати као активни учесници биологије инфламазома (283-285).

У складу са тим, резултати овог истраживања показали су да је делеција ST2 повезана са смањеном експресијом mRNA за NLRP3 и каспазу-1 у оштећеном ткиву желуца (Фигура 15А и Б), као и са смањеном продукцијом IL-1β и сниженом експресијом NLRP3 унутар макрофага и неутрофила (Фигура 13Б и Е; Фигура 14Б и В). Иако прецизне молекулске везе које повезују IL-33/ST2 сигнализацију са активацијом инфламазома још увек нису у потпуности разјашњене, може се претпоставити да у том процесу учествује

више конвергентних сигналних путева. Као што је раније показано у оквиру овог истраживања, IL-33/ST2 осовина праћена је појачаном активношћу NF-κB, добро познатог „прајминг“ сигнала који транскрипционо повећава експресију кључних компоненти инфламазома (286). Поред тога, Li и сарадници показали су да IL-33/ST2 осовина може индуковати стрес ендоплазматског ретикулума (287) и тиме подстицати активацију инфламазома, што указује на додатни ниво регулације овог сложеног процеса. Ослобађање секундарних сигнала опасности, као што су екстрацелуларни АТФ и интрацелуларни Ca²⁺, из оштећених епителних ћелија током акутног оштећења желуца, може додатно олакшати састављање и активацију инфламазома у ћелијама имунског система осетљивим на дејство IL-33 (280). Међутим, остаје, да се утврди да ли активација NLRP3 инфламазома представља директну последицу IL-33/ST2 сигнализације или пак паралелни одговор на епително оштећење. Добијени резултати јасно указују на то да IL-33/ST2-NLRP3 сигнална осовина има значајну улогу у појачавању инфламације и продубљивању оштећења слuzнице желуца изазваног етанолом. С обзиром на то да активација NLRP3 инфламазома узрокује цепање гасдермина D преко активације каспазе-1 (288), IL-33/ST2 осовина може допринети оштећењу епитела не само кроз индукцију инфламације, већ и путем покретања пироптозе, инфламацијског облика програмиране ћелијске смрти (289). Овај механизам може додатно подстаћи ослобађање цитокина и погоршати оштећење ткива желуца.

5.4. УТИЦАЈ ДЕЛЕЦИЈЕ ST2 НА ILCs2 И ЕОЗИНОФИЛЕ

ILCs представљају недавно препознату групу лимфоцита урођене имуности који обезбеђују брзу, прву линију одбране имунског система у слuzницама (290). За разлику од ћелија стечене имуности, ILCs не поседују рецепторе специфичне за одређени антиген, већ је њихова функција регулисана цитокинима из локалног ткивног окружења (291). Ова особина омогућава им да брзо одговоре на оштећење ткива продукцијом ефекторских цитокина, који доприносе очувању интегритета ткива и одржавању хомеостазе. На основу кључних транскрипционих фактора и цитокинског профила, ILC се деле у три подгрупе: ILCs1, ILCs2 и ILCs3 (290, 291). ILCs2 се претежно налазе у ламини проприји слuzница и активирају се приликом оштећења епитела различитим агенсима, најчешће паразитима или алергенима. Њихова диференцијација зависи од транскрипционих фактора GATA3 и RORα (енгл. *retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha*), а након оштећења ткива ослобађају се алармини, као што је IL-33, а затим се и активирају ILCs2, које пак продукују широк спектар цитокина повезаних са имунским одговором тип 2, укључујући IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13. Продукцијом ових цитокина подстиче се акумулација и активација еозинофила и мастоцита, а истовремено се омогућава елиминација паразита и репарација оштећеног ткива (292, 293). Sluzница желуца има специфичну расподелу ILCs популација, коју карактеришу изражена доминација ILCs2, мали број ILCs1 и готово потпуно одсуство ILCs3, што се значајно разликује од црева, где су све три подгрупе присутне у приближно једнаким односима. Оваква ткивно-специфична дистрибуција, потврђена како у експерименталним моделима тако и код људи, указује на посебну улогу ILCs2 у имунском одговору слuzнице желуца (294, 295).

Вођени овим сазнањима, наметнуло се питање који је функционални значај недостатка гена за ST2 рецептор на одговор ILCs2 у експерименталном моделу акутног стерилног оштећења слuzнице желуца. Показали смо да делеција ST2 смањује функционалну активацију ILCs2 тиме што смањује број ILCs2 које продукују IL-4 и IL-13 након оштећења ткива желуца етанолом, без утицаја на укупан број самих ILCs2 (Фигура 11). Ови резултати су у сагласности са студијом Buzzelli и сарадника (214), у којој је показано да стимулација егзогеним IL-33 појачава експресију гена повезаних са

активацијом ILCs2 у ткиву желуца, без промене у њиховом укупном броју. Поред тога, недавна истраживања показала су да је IL-33/ST2 сигнална осовина, посредована активацијом ILCs2, неопходна за настанак оштећења слузнице желуца након примене супстанце L635, што резултује акутним губитком паријеталних ћелија и формирањем метапластичних фокуса који потенцијално могу представљати основу за развој карциногенезе (296). Истовремено, важно је нагласити да ILCs2 могу имати и протективну улогу у обољењима гастроинтестиналног тракта, јер индукцијом секреције IgA доприносе ефикасном уклањању *H. pylori* (294), док под дејством IL-33 ублажавају тежину DSS и амебног колитиса (235, 297).

У физиолошким условима, ламина проприја интактне слузнице желуца садржи тек спорадичне еозинофиле, док у патолошким стањима еозинофили постају значајна компонента инфламацијског инфилтрата, како у хроничном гастритису повезаном са *H. pylori*, тако и у аутоимунском гастритису (298). Њихова изражена акумулација и перзистентна активација могу, додатно, подстаћи развој ретког клиничко-патолошког ентитета познатог као еозинофилни гастритис, чиме се потврђује њихов потенцијални патогенетски значај у обољењима желуца (299, 300). Полазећи од ових чињеница, а имајући у виду да су еозинофили циљане ћелије цитокина које продукују ILCs2, даље истраживање смо усмерили ка испитивању њихове улоге у контексту акутног оштећења слузнице желуца. Циљ овог приступа био је да се разјасни да ли и у којој мери, еозинофили учествују у регулацији инфламацијског одговора зависног од делеције ST2 након третмана етанолом. Показали смо да је делеција ST2 значајно смањила укупан број еозинофила који инфилтришу ламину проприју желуца, као и број еозинофила који експримирају костимулаторне и молекуле задужене за миграцију ових ћелија (Фигура 12А, Г-Ђ). Такође, делеција ST2 смањила је популацију еозинофила који продукују проинфламацијски IFN- γ и антиинфламацијски IL-10 (Фигура 12Б и В). Ови резултати су у сагласности са резултатима из других модела акутне стерилне инфламације, попут оштећења јетре индукованог применом конканавалина А, у којима се након оштећења ткива јетре ослобођени IL-33 везује за ILCs2 и активира их, што последично индукује регрутовање и активацију еозинофила и тиме пак даље доприноси развоју инфламације и оштећења (301). Поред тога, студије указују да IFN- γ пореклом из еозинофила може аутокринно појачати њихову проинфламацијску активност, поспешујући ослобађање пероксидазе, хемотаксу и ћелијско преживљавање (302). Насупрот томе, присуство IL-10⁺ еозинофила вероватно осликава компензаторни механизам усмерен ка „смиривању“ инфламације, који се одржава у условима очуване IL-33/ST2 сигнализације.

Свеукупно, ови резултати указују да IL-33/ST2 сигнални пут истовремено обликује функционалну поларизацију ILC2 и ефекторско програмирање еозинофила, при чему њихово координисано деловање доприноси развоју и модулацији акутне инфламације слузнице желуца.

5.5. IL-33/ST2 ОСОВИНА АКТИВИРА Tc1 ЛИМФОЦИТЕ ПОСРЕДСТВОМ IL-12 ИЗ ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА

Стечени имунски одговор, посредован CD8⁺ Т лимфоцитима, има важну улогу у одржавању хомеостазе гастроинтестиналног тракта, јер омогућава деликатну равнотежу између толеранције према коменсалној микробиоти и ефикасне одбране од инвазивних патогена. Када су ови пажљиво усклађени имунски механизми нарушени, долази до компромитовања интегритета епителних баријера и покретања инфламације и последичног оштећења слузнице (303). Иако се CD8⁺ Т лимфоцити сматрају значајним чуварима слузница, њихова улога у обољењима желуца је недовољно позната, чак и у добро проученим патолошким стањима као што је инфекција *H. pylori* (304, 305). Досадашња истраживања указују да су први Т лимфоцити које инфилтришу желуцац

током *H. pylori* инфекције управо резидентни меморијски CD8⁺ Т лимфоцити специфични за СаgА, који потом доминирају имунским одговором у раној фази хроничне *H. pylori* инфекције (306). Стога, да ли CD8⁺ Т лимфоцити учествују у патогенези акутног стерилног оштећења желуца и на који начин IL-33/ST2 сигнална осовина обликује њихову активацију и функционалну поларизацију је недовољно разјашњено. У складу са тим, резултати овог истраживања указују да активација IL-33/ST2 сигналног пута подстиче како експанзију, тако и функционалну активацију CD8⁺ Т лимфоцита. Овај ефекат се огледа у порасту броја CD8⁺ Т лимфоцита који продукују проинфламацијски IFN- γ и експримирају маркер дегранулације CD107a, уз смањење броја CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају инхибиторни KLRG1 (Фигура 9; Фигура 10). Оваква фенотипска обележја карактеристична су за Тc1 ћелије, изразито потентне ефекторске CD8⁺ Т лимфоците који продукују перфорин, гранзим В, IFN- γ и TNF- α , чиме се омогућава ефикасна елиминација инфицираних или малигно трансформисаних ћелија (305, 307). Будући да је диференцијација Тc1 ћелија условљена деловањем IL-12, цитокина који луче антиген-презентујуће ћелије (305), даљи фокус истраживања био је усмерен ка испитивању улоге дендритских ћелија у регулацији овог процеса.

Дендритске ћелије као професионалне антиген-презентујуће ћелије се налазе у запаљенском инфилтрату ламине проприје желуца код људи и мишева, где се након оштећења ткива, активирају под утицајем разних PAMPs и DAMPs (308). Насупрот томе, њихово присуство у здравој слузници желуца и даље остаје предмет научне расправе (309-311). Дендритске ћелије продукују IL-12, који има круцијалну улогу у индукцији Th1 поларизације и последичне продукције IFN- γ у CD4⁺ Т лимфоцита током инфекције *H. pylori* (310, 312, 313). Поред тога, дендритске ћелије, путем експресије костимулаторних молекула и секреције IL-12, обезбеђују неопходне сигнале за потпуну активацију CD8⁺ Т лимфоцита и њихову диференцијацију ка ефекторском Тc1 фенотипу (314). У овом истраживању смо показали да након примене етанола IL-33/ST2 сигнална осовина интензивира како акумулацију, тако и матурацију дендритских ћелија, што се огледа у повећаном броју субпопулација дендритских ћелија које експримирају костимулаторни молекул CD86 и продукују IL-12 (Фигура 8). Овим смо додатно потврдили улогу IL-33/ST2 сигналне осовине као кључне спојнице између урођене и стечене имуности. Претходне *in vitro* студије су показале да IL-33 делује синергистички са IL-12 у индукцији продукције IFN- γ и цитотоксичне активности CD8⁺ Т лимфоцита (315), ови резултати потврђују постојање овог механизма и у *in vivo* моделу. Такође, Zhang и сарадници (301) су у моделу хепатитиса индукованог конканавалином А показали да оштећење хепатоцита посредовано CD8⁺ Т лимфоцитима даље подстиче ослобађање IL-33, који затим додатно појачава оштећење ткива, успостављајући позитивну повратну инфламацијску спрегу. Постоји могућност да се сличан механизам одирава и у слузници желуца током акутног стерилног оштећења. Идентификовањем потенцијалне улоге Тc1 ћелија, ово истраживање расветљава до сада недовољно препознату компоненту имунопатогенезе обољења слузнице желуца и доприноси разумевању начина на који стечена ћелијска имуност обликује акутну инфламацију и последично оштећење ткива желуца. Ипак, иако ови резултати јасно указују на појачану активацију Тc1 ћелија нисходно од IL-33/ST2 сигналног пута, остаје неразјашњено да ли ове ћелије директно иницирају оштећење епитела или преваходно доприносе погоршању већ постојећег инфламацијског процеса.

5.6. УЛОГА ДЕЛЕЦИЈЕ ST2 НА РАЗЛИЧИТЕ МЕХАНИЗМЕ ЋЕЛИЈСКЕ СМРТИ

Акутно оштећење желуца не огледа се само у снажном инфламацијском одговору, већ и у израженом губитку епителних ћелија, који настаје као последица активације различитих путева ћелијске смрти (316-318). У основи ових дешавања налазе се два

доминантна облика ћелијске смрти: програмирана ћелијска смрт, односно апоптоза и некроза (319). Апоптоза је прецизно уређен процес самоуништења ћелије, који се покреће као одговор на унутрашње или спољашње поремећаје и има пресудну улогу у очувању ткивне равнотеже, омогућавајући уклањање оштећених или сувишних ћелија. Њена прецизна регулација зависи од деловања кључних молекула, попут каспаза, Bcl-2 и Вах (320). Насупрот томе, некроза представља неуређен и неконтролисан облик ћелијске смрти, који настаје услед тешког оштећења ћелије и често је праћен бурним патолошким реакцијама (319). Поред ова два основна облика, данас су препознате и додатне, регулисане форме ћелијске смрти, као што су аутофагија и некроптоза, које додатно расветљавају сложеност ових биолошких процеса (317, 319).

У оквиру акутног оштећења слузнице желуца, апоптоза се издваја као једно од централних патолошких својстава и настаје активацијом како унутрашњих, тако и спољашњих сигналних путева (316, 320). Унутрашњи пут апоптозе покреће се дејством оксидативног стреса и оштећења DNA, док се спољашњи пут активира деловањем проинфламацијског цитокина TNF- α и FasL (енгл. *Fas ligand*) (320). Резултати овог истраживања показују да делеција ST2 узрокује значајно смањење апоптозе епителних ћелија у оштећеној слuzници желуца. Овај протективни ефекат праћен је порастом експресије mRNA за антиапоптотски протеин Bcl-2, уз истовремено смањењем експресије mRNA за проапоптотски Вах, смањену експресију mRNA за ефекторску каспазу-3 и мањи број епителних ћелија које у оштећеном ткиву желуца експримирају каспазу-3 (Фигура 16; Фигура 17). Овакви резултати указују на проапоптотску улогу IL-33/ST2 сигналне осовине током оштећења ткива, што је у сагласности са резултатима из експерименталних модела оштећења бубрега (321, 322), при чему се може претпоставити да у нашем моделу унутрашњи и спољашњи апоптотски путеви не делују изоловано, већ се међусобно преплићу и појачавају, градећи јединствен и координисан одговор на прекомерну инфламацију и оксидативни стрес. Ипак, биолошко дејство IL-33 не може се сагледати само са једне стране. Док је у појединим инфламацијским стањима IL-33/ST2 осовина повезана са индукцијом апоптозе и прогресијом оштећења ткива, у другим органским системима она испољава изражена цитопротективна својства. Тако је показано да IL-33/ST2 осовина може смањити апоптозу кардиомиоцита након инфаркта миокарда (323), као и ћелијску смрт неурона након понављаних неонаталних конвулзија (324). Ови, наизглед опречни исходи сведоче о сложености функције IL-33/ST2 осовине и указују да су њени нисходни ефекти одређени врстом захваћеног ткива, природом оштећења и локалним особинама инфламацијског окружења.

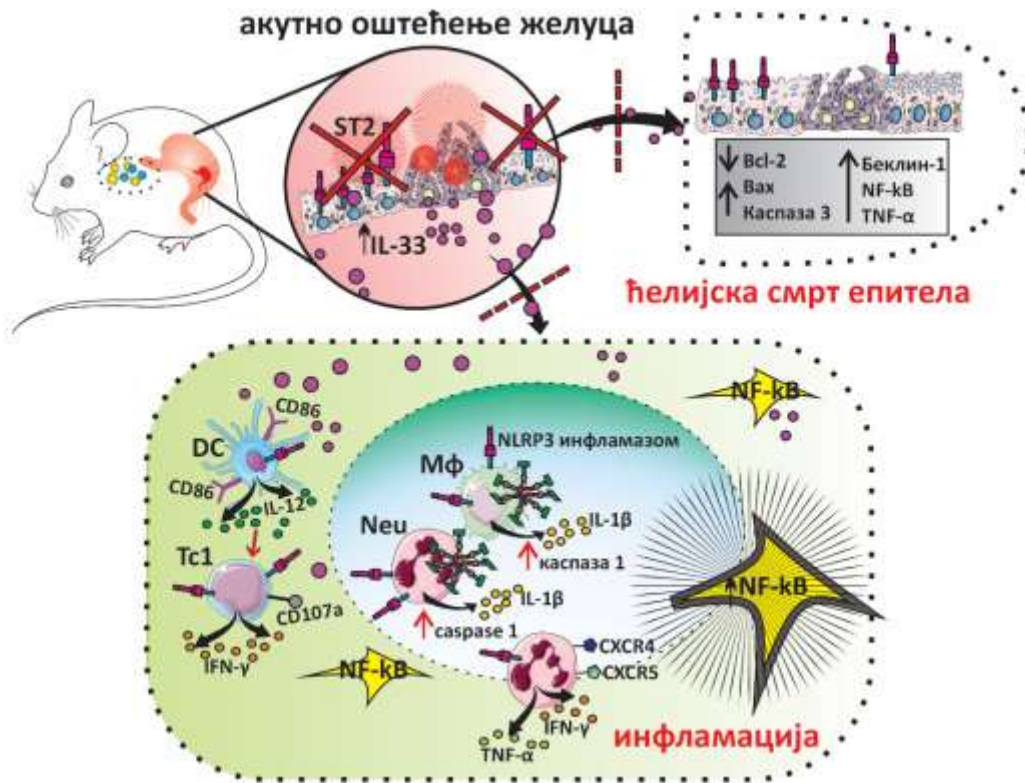
Етанол, осим што подстиче развој инфламације и оксидативног стреса, својим директним цитотоксичним дејством изазива и процес некрозе епителних ћелија слузнице желуца (316, 325). Штавише, HMGB1, као добро познат маркер некрозе, заузима важно место у регулацији инфламацијских и имунских одговора (326). Примена етанола је повећала експресију HMGB1 mRNA у обе експерименталне групе, без статистички значајних разлика између њих (Фигура 18Б), што указује да његово ослобађање превасходно одражава директно оштећење епитела изазвано деловањем етанола, а не генотипски условљену модулацију инфламацијског одговора у овом моделу.

Поред наведеног, резултати овог истраживања указују да делеција ST2 рецептора потенцијално утиче и на друге облике ћелијске смрти. Смањена експресија TNF- α , индиректног маркера некроптозе (327) указује на могућу улогу IL-33/ST2 сигналне осовине у регулацији овог облика програмиране ћелијске смрти (Фигура 19). Овакво тумачење додатно је поткрепљено ранијим студијама које су показале да IL-33 може индуковати механизме некроптозе, чиме доприноси продубљивању ткивног оштећења у условима изражене и перзистентне инфламације (328). Истовремено, делеција ST2 узрокује смањену експресију *Beclin-1* гена, кључног регулатора аутофагије (329), код

животиња изложених етанолу, што указује на укљученост IL-33/ST2 осовине у модулацији аутофагије (Фигура 18А). У складу са овим резултатима, Wang и сарадници (330) су показали је да IL-33 може утицати и на динамику аутофагије, поспешујући је у моделу токсичног оштећења јетре и тиме усмеравајући исход ћелијске судбине ка оштећењу ткива. Иако се аутофагија у физиолошким условима сматра превасходно цитопротективним процесом, њена прекомерна или поремећена активација у условима инфламацијског стреса може постати патолошка и допринети оштећењу епитела (331). Посебно је значајно да недавна истраживања препознају Bcl-2 и Beclin-1 као кључне молекулске регулаторе равнотеже између апоптозе и аутофагије. Везивањем Bcl-2 за Beclin-1 инхибира се аутофагија и преусмерава ћелијски одговор ка апоптози (332-334). Ова узајамна регулација додатно појашњава сложену мрежу сигналних путева у којој IL-33/ST2 осовина заузима важно место, обликујући равнотежу између различитих облика ћелијске смрти у оштећеној слузници желуца.

Значајно погоршање акутног оштећења слузнице желуца, уочено након примене егзогеног IL-33 (Фигура 20; Фигура 21), пружа снажан функционални доказ да се патогени ефекти овог цитокина остварују превасходно посредством његовог специфичног рецептора ST2. Ови резултати јасно указују да појачана активација IL-33/ST2 сигналне осовине директно индукује инфламацијски одговор и погоршава оштећења у акутном стерилном оштећењу желуца.

Етанол у овом моделу акутног оштећења желуца делује двоструко, испољавајући директне цитотоксичне ефекте на епител желуца, али и индиректно, путем индукције снажне инфламације (Слика 12). Настало оштећење ткива ослобађа нуклеарни алармин IL-33 из ћелија слузнице желуца, који везивањем за ST2 рецептор покреће и координише сложену мрежу урођених и стечених имунских одговора. Наиме, делеција ST2 узрокује изразито смањење инфилтрације и активације дендритских ћелија, уз редукацију броја дендритских ћелија које експримирају костимулаторни молекул CD86 и продукују IL-12 што последично пак нарушава Tc1 поларизацију и смањује продукцију IFN- γ . Истовремено, одсуство ST2 ограничава инфилтрацију неутрофила и макрофага, смањује број неутрофила који експримирају CXCR4 и CXCR5, као и продукцију TNF- α и IFN- γ у овим ћелијама. Код обе ћелијске популације уочава се супримирана активација NLRP3 инфламазома и каспазе-1, што резултира смањеном последичном продукцијом IL-1 β . Поред наведеног, овај инфламацијски одговор је инхибиран и редукованом активацијом NF- κ B, централног транскрипционог регулатора медијатора инфламације. У таквом „пригушеном“ инфламацијском окружењу, делеција ST2 значајно ограничава активацију апоптозе и пироптозе, док смањена експресија TNF- α и Beclin-1 указује и на потенцијалну модулацију некроптозе и аутофагије. Сагледано у целини, блокада IL-33/ST2 сигналне осовине функционално раздваја примарно оштећење епитела од накнадне активације урођеног и стеченог имунског одговора, истовремено ограничавајући укључивање више путева ћелијске смрти. На тај начин, IL-33/ST2 осовина се издваја као централна спојница инфламацијских и епителних одговора у акутном стерилном оштећењу желуца, чија појачана активација погоршава, а њена инхибиција значајно ублажава оштећење слузнице. Ови резултати не само да заокружују разумевање имуномеханизма у овом моделу, већ јасно позиционирају IL-33/ST2 осовину као потенцијалну терапијску мету у превенцији и лечењу акутног оштећења слузнице желуца.



Слика 12. Схематски приказ имунопатогенетских механизма регулисаних делецијом ST2 у акутном оштећењу желуца. Етанол индукује директно оштећење епитела и ослобађање алармина IL-33 из ћелија слузнице желуца, који везивањем за ST2 рецептор покреће инфламацијску каскаду у којој учествују како ћелије урођеног тако и стеченог имунског одговора. Активација IL-33/ST2 осовине подстиче инфилтрацију и активацију неутрофила и макрофага, дендритских ћелија, Tc1 поларизацију, функционалну активације ILCs2 и еозинофила, активацију NF-κB сигналног пута и NLRP3 инфламазома, као и повећану продукцију проинфламацијских цитокина. Истовремено, ова сигнална осовина утиче на више путева ћелијске смрти у епителу желуца, укључујући апоптозу, некрозу, пироптозу, као и потенцијално некроптозу и аутофагију. Делеција ST2 инхибира ове патолошке сигналне токове, ограничава инфламацију и оштећење епитела, чиме се значајно ублажава акутно оштећење слузнице желуца.

6. ЗАКЉУЧАК

Делесија ST2 редукује оштећење слузнице желуца у моделу мишијег акутног стерилног оштећења желуца изазваног етанолом. Делесија ST2 значајно ублажава инфламацију, што је последица супресије активације NF-κB сигналног пута и NLRP3 инфлазома. Недостатак ST2 рецептора смањује инфилтрацију и функционалну активацију ћелија имунског система и смањује продукције проинфламацијских цитокина у ткиву желуца. Ови резултати постављају чврсту основу за разумевање улоге IL-33/ST2 осовине у патогенези акутног стерилног оштећења желуца, и истовремено представљају полазиште за развој нових терапијских приступа усмерених ка превенцији и ублажавању оштећења слузнице желуца.

Закључак је изведен на основу следећих резултата добијених након третмана ST2^{-/-} и WT BALBc мишева 80% етанолом:

1. ST2^{-/-} мишеви имају значајно мање оштећење слузнице желуца што се манифестује мањим вредностима макроскопског и хистолошког скорa
2. Делесија ST2 инхибира продукцију проинфламацијских цитокина како локално тако и системски
3. Делесија ST2 смањује функционалну активацију ILCs2 и еозинофила
4. IL-33/ST2 осовина поспешује акумулацију и активацију Tc1 лимфоцита и дендритских ћелија
5. Делесија ST2 смањује инфлукс M1 макрофага и проинфламацијских неутрофила
6. Недостатак ST2 рецептора супримира активацију NF-κB сигналног пута, NLRP3 инфлазома и каспазе-1, те следствено смањује продукцију IL-1β у макрофагима и неутрофилима ламине проприје желуца
7. Одсуство ST2 рецептора супримира апоптозу, уз потенцијално учешће у модулацији аутофагије и некроптотске ћелијске смрти
8. Апликација егзогеног IL-33 пре излагања етанолу узрокује израженије оштећење слузнице желуца, праћено значајним повећањем макроскопских и хистопатолошких параметара ткивног оштећења.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

AEC - aminoethyl carbazole
APC - allophycocyanin
babA - blood group antigen-binding adhesin gene
Bcl-2 - B-cell lymphoma 2
CAFs - cancer-associated fibroblasts
cagA - cytotoxin-associated gene A
cAMP - cyclic adenosine monophosphate
CCK2 - cholecystokinin receptor 2
CEUS - contrast-enhanced ultrasound
CGRP - calcitonin gene-related peptide
CMV - cytomegalovirus
COX-1 - cyclooxygenase 1
CT - computed tomography
CTLA-4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCR4 - C-X-C motif chemokine receptor 4
CYP2C19 - cytochrome p450 family 2 subfamily c member 19
DALYs - disability-adjusted life years
DAMPs - damage-associated molecular patterns
DNA - deoxyribonucleic acid
DSS - dextran sulfate sodium
DTT - dithiothreitol
ECLs - enterochromaffin-like cells
EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay
EMT - epithelial-mesenchymal transition
ERK - extracellular signal-regulated kinase
FasL - fas ligand
FBS - fetal bovine serum
FITC - fluorescein isothiocyanate
FSC/SSC - forward scatter/side scatter
GATA3 - GATA binding protein 3
GLP-1 - glucagon-like peptide 1
HBSS - Hanks' balanced salt solution
H⁺/K⁺-ATPase – hydrogen-potassium adenosine triphosphatase
HMGB1 - high mobility group box 1
HRP - horseradish peroxidase
HSV - herpes simplex virus
Ig - immunoglobulin
IL-1RAcP - interleukin 1 receptor accessory protein
IL-6 - interleukin 6
IL-33 - interleukin 33
IL-33FL - full-length interleukin 33
IL1RL1 - interleukin 1 receptor-like 1
ILC2s - type 2 innate lymphoid cells
iNKT - invariant natural killer T cells
IRAK - interleukin-1 receptor-associated kinase
JNK - c-jun n-terminal kinase
KLRG1 - killer cell lectin-like receptor g1

MAPK - mitogen-activated protein kinase
MDSCs - myeloid-derived suppressor cells
MMP - matrix metalloproteinase
MPO - myeloperoxidase
mRNA - messenger RNA
miRNA - microRNA
MyD88 - myeloid differentiation primary response 88
NETs - neutrophil extracellular traps
NF-HEV - nuclear factor from high endothelial venules
NF- κ B - nuclear factor kappa b
NK - natural killer cells
NLRP3 - nlr family pyrin domain containing 3
NOD1 - nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
NOD2 - nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
NSAIDs - non-steroidal anti-inflammatory drugs
OCUS - oral contrast ultrasonography
oipA - outer inflammatory protein A
PAMPs - pathogen-associated molecular patterns
PBS - phosphate-buffered saline
PD-1 - programmed cell death protein 1
PE - phycoerythrin
PerCP - peridinin-chlorophyll-protein complex
PMA - phorbol 12-myristate 13-acetate
POCUS - point-of-care ultrasound
PPIs - proton pump inhibitors
PSCA - prostate stem cell antigen
rIL-33 - recombinant interleukin 33
RNA - ribonucleic acid
ROR α - retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha
RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction
SAMP - senescence-accelerated mouse prone
SE - standard error
siRNA - small interfering RNA
SPEM - spasmodic polypeptide-expressing metaplasia
STAT3 - signal transducer and activator of transcription 3
ST2 - suppression of tumorigenicity 2
ST2^{-/-} - ST2 gene knockout
ST2L - ST2 ligand
ST2V - ST2 variant
ST2LV - ST2 ligand variant
sST2 - soluble ST2
Th - T helper cells
TIR - toll/interleukin-1 receptor domain
TNBS - 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid
TNF- α - tumor necrosis factor alpha
TRAF6 - TNF receptor-associated factor 6
Tregs - regulatory T cells
vacA - vacuolating cytotoxin A
WHO - World Health Organization
WT - wild type

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Getachew D, Beyna AT, Abdelwuhab M, Asrie AB. Evaluation of anti-ulcer activity of hydromethanol crude extract and solvent fractions of *Vicia faba* (Fabaceae) seeds in mice. *PLoS One* 2025; 20(10):e0334119.
2. Almadi MA, Lu Y, Alali AA, Barkun AN. Peptic ulcer disease. *Lancet* 2024; 404(10447):68-81.
3. Srivastava A, Lauwers GY. Pathology of non-infective gastritis. *Histopathology* 2007; 50(1):15-29.
4. Tytgat GN. Etiopathogenetic principles and peptic ulcer disease classification. *Dig Dis* 2011; 29(5):454-8.
5. Falkeis-Veits C, Vieth M. Non-malignant *Helicobacter pylori*-Associated Diseases. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1149:121-134.
6. Genta RM. Differential diagnosis of reactive gastropathy. *Semin Diagn Pathol* 2005; 22(4):273-83.
7. Shah SC, Piazuelo MB, Kuipers EJ, Li D. AGA Clinical Practice Update on the Diagnosis and Management of Atrophic Gastritis: Expert Review. *Gastroenterology* 2021; 161(4):1325-1332.e7.
8. Oshima T. Functional Dyspepsia: Current Understanding and Future Perspective. *Digestion* 2024; 105(1):26-33.
9. Graham DY. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(18):5191-204.
10. Roberts-Thomson IC. Rise and fall of peptic ulceration: A disease of civilization? *J Gastroenterol Hepatol* 2018; 33(7):1321-1326.
11. Duggan JM, Duggan AE. The possible causes of the pandemic of peptic ulcer in the late 19th and early 20th century. *Med J Aust* 2006; 185(11-12):667-9.
12. Baron JH, Sonnenberg A. Early history of dyspepsia and peptic ulcer in the United States. *Am J Gastroenterol* 2009; 104(12):2893-6.
13. Banić M, Malferteiner P, Babić Z, Ostojić R, Kujundžić M, Fatović-Ferenčić S, Plesko S, Petričušić L. Historical impact to drive research in peptic ulcer disease. *Dig Dis* 2011; 29(5):444-53.
14. Xie X, Ren K, Zhou Z, Dang C, Zhang H. The global, regional and national burden of peptic ulcer disease from 1990 to 2019: a population-based study. *BMC Gastroenterol* 2022; 22(1):58.
15. Ren J, Jin X, Li J, Li R, Gao Y, Zhang J, Wang X, Wang G. The global burden of peptic ulcer disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Int J Epidemiol* 2022; 51(5):1666-1676.
16. Zhuo M, Fang M, Yin Y, Wang J, Wei Z, Lu J, Jia Y. Investigating the prevalence burden of peptic ulcer disease in older adults aged 70+ from 1990 to 2019: an analysis of Global Disease Burden Studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2025; 37(1):39-46.
17. Vakil N. Peptic Ulcer Disease: A Review. *JAMA* 2024; 332(21):1832-1842.
18. Hao W, Zheng C, Wang Z, Ma H. Global burden and risk factors of peptic ulcer disease between 1990 and 2021: An analysis from the global burden of disease study 2021. *PLoS One* 2025; 20(7):e0325821.
19. Zhang T, Zhang B, Tang X. Global Burden of Peptic Ulcer Disease in Adolescents and Young Adults: Trends and Disparities from 1990-2021. *Arch Med Res* 2025; 56(8):103320.
20. Søreide K, Thorsen K, Harrison EM, Bingener J, Møller MH, Ohene-Yeboah M, Søreide JA. Perforated peptic ulcer. *Lancet* 2015; 386(10000):1288-1298.

21. World Health Organization. WHO Mortality Database: Serbia-country details [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2023 [cited 2025 Nov 26]. Available from: <https://platform.who.int/mortality/countries/country-details/MDB/serbia>
22. Jovanović I, Đurić P, Alempijević T, Sokić-Milutinović A, Krstić M, Milosavljević T. Ulkusna bolest dvanaestopalačnog creva tokom dvadeset godina nakon otkrića *Helicobacter pylori* - iskustvo iz jednog centra. *Med Pregl* 2010; 63(3-4):258-261.
23. Kunkalienkar S, Gandhi NS, Gupta A, Saha M, Pai A, Shetty S, Gupta A, Dhas N, Hariharapura RC, Nandakumar K, Narasimhaswamy N, Moorkoth S. Targeting Urease: A Promising Adjuvant Strategy for Effective *Helicobacter pylori* Eradication. *ACS Omega* 2025; 10(27):28643-28669.
24. Bansil R, Constantino MA, Su-Arcaro C, Liao W, Shen Z, Fox JG. Motility of Different Gastric *Helicobacter* spp. *Microorganisms* 2023; 11(3):634.
25. Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, Liou JM, Peek R, Schulz C, Smith SI, Suerbaum S. *Helicobacter pylori* infection. *Nat Rev Dis Primers* 2023; 9(1):19.
26. Laucirica I, García Iglesias P, Calvet X. Peptic ulcer. *Med Clin (Barc)* 2023; 161(6):260-266.
27. Bjarnason I, Scarpignato C, Holmgren E, Olszewski M, Rainsford KD, Lanas A. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Gastroenterology* 2018; 154(3):500-514.
28. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol* 2020; 180:114147.
29. Venerito M, Wex T, Malfertheiner P. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Gastrointestinal Bleeding: Risk Factors and Prevention Strategies. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010; 3(7):2225-2237.
30. Hirschowitz BI, Lanas A. Atypical and aggressive upper gastrointestinal ulceration associated with aspirin abuse. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34(5):523-8.
31. Montuori P, Shojaeian SZ, Pennino F, D'Angelo D, Sorrentino M, Di Sarno S, Nubi R, Nardo A, Triassi M. Consumer awareness and knowledge regarding use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in a metropolitan area. *Front Pharmacol* 2024; 15:1362632.
32. Yegen BC. Lifestyle and Peptic Ulcer Disease. *Curr Pharm Des* 2018; 24(18):2034-2040.
33. Arshad SA, Murphy P, Gould JC. Management of Perforated Peptic Ulcer: A Review. *JAMA Surg* 2025; 160(4):450-454.
34. Andersen IB, Jørgensen T, Bonnevie O, Grønbaek M, Sørensen TI. Smoking and alcohol intake as risk factors for bleeding and perforated peptic ulcers: a population-based cohort study. *Epidemiology* 2000; 11(4):434-9.
35. Vītola ME, Eisāne RA, Iļičuka S, Kļaviņa KA, Junga A, Pilmane M. Effects of Nutrients and Alcoholic Beverages on Gastrointestinal Tract Morphology. *Gastroenterol Insights* 2025; 16(4):42.
36. Dore MP, Soro S, Niolu C, Longo NP, Bibbò S, Manca A, Pes GM. Clinical features and natural history of idiopathic peptic ulcers: a retrospective case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2019; 54(11):1315-1321.
37. Choi YJ, Kim TJ, Bang CS, Lee YK, Lee MW, Nam SY, Shin WG, Seo SI. Changing trends and characteristics of peptic ulcer disease: A multicenter study from 2010 to 2019 in Korea. *World J Gastroenterol* 2023; 29(44):5882-5893.
38. Charpignon C, Lesgourgues B, Pariente A, Nahon S, Pelaquier A, Gatineau-Sailliant G, Roucayrol AM, Courillon-Mallet A; Group de l'Observatoire National des Ulcères de l'Association Nationale des Hépatogastroentérologues des Hôpitaux Généraux (ANGH). Peptic ulcer disease: one in five is related to neither *Helicobacter pylori* nor aspirin/NSAID intake. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38(8):946-54.

39. Yakoob J, Jafri W, Jafri N, Islam M, Abid S, Hamid S, AliShah H, Shaikh H. Prevalence of non-Helicobacter pylori duodenal ulcer in Karachi, Pakistan. *World J Gastroenterol* 2005; 11(23):3562-5.
40. Chung CS, Chiang TH, Lee YC. A systematic approach for the diagnosis and treatment of idiopathic peptic ulcers. *Korean J Intern Med* 2015; 30(5):559-70.
41. Keller CL, Jones NT, Abadie RB, Barham W, Behara R, Patil S, Paladini A, Ahmadzadeh S, Shekoochi S, Varrassi G, Kaye AD. Non-steroidal Anti-inflammatory Drug (NSAID)-, Potassium Supplement-, Bisphosphonate-, and Doxycycline-Mediated Peptic Ulcer Effects: A Narrative Review. *Cureus* 2024; 16(1):e51894.
42. Gosavi S, Krishnan G, Acharya RV. Aspirin vs Clopidogrel: Antiplatelet Agent of Choice for Those With Recent Bleeding or at Risk for Gastrointestinal Bleed. *Cureus* 2023; 15(4):e37890.
43. Liu P, Li G, Yang Q, Cao K, Wang J. Risk factors for gastrointestinal complications during glucocorticoid therapy in internal medicine inpatients: a real-world retrospective analysis. *BMC Pharmacol Toxicol* 2025; 26(1):37.
44. Verhamme K, Mosis G, Dieleman J, Stricker B, Sturkenboom M. Spironolactone and risk of upper gastrointestinal events: population based case-control study. *BMJ* 2006; 333(7563):330.
45. Abbass A, Khalid S, Boppana V, Hanson J, Lin H, McCarthy D. Giant Gastric Ulcers: An Unusual Culprit. *Dig Dis Sci* 2020; 65(10):2811-2817.
46. Odat RM, Idrees M, Marsool MDM, Oglat SM, Tbayshat SO, Adnan ZI, Alkhateeb YA, Aldamen AO, Jain H, Nguyen D, Hanifa H. Stomach and duodenal ulcer as a cause of death in patients with cancer: a cohort study. *Int J Emerg Med* 2024; 17(1):199.
47. Wang Q, Yu M, Zhang S. Peptic ulcer induced by immune checkpoint inhibitors successfully treated with glucocorticoids: A report of three cases and a literature review. *Exp Ther Med* 2024; 28(5):410.
48. Phan J, Benhammou JN, Pisegna JR. Gastric Hypersecretory States: Investigation and Management. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2015; 13(4):386-97.
49. Zanelli M, Pizzi M, Sanguedolce F, Zizzo M, Palicelli A, Soriano A, Bisagni A, Martino G, Caprera C, Moretti M, Masia F, De Marco L, Froio E, Foroni M, Bernardelli G, Alvarez de Celis MI, Giunta A, Merli F, Ascani S. Gastrointestinal Manifestations in Systemic Mastocytosis: The Need of a Multidisciplinary Approach. *Cancers (Basel)* 2021; 13(13):3316.
50. Palermo M, Acquafresca PA, Rogula T, Duza GE, Serra E. Late surgical complications after gastric by-pass: a literature review. *Arq Bras Cir Dig* 2015; 28(2):139-43.
51. Chen G, Yu Z, Zhang Y, Liu S, Chen C, Zhang S. Radiation-induced gastric injury during radiotherapy: molecular mechanisms and clinical treatment. *J Radiat Res* 2023; 64(6):870-879.
52. Czempik PF, Buś K, Dziecioł K, Gołda M, Osicki J, Wosiewicz P. Risk factors for gastric mucosa lesion in critically ill patients undergoing endoscopy for percutaneous gastrostomy: a case-control study. *BMC Gastroenterol* 2024; 24(1):464.
53. Holland-Bill L, Christiansen CF, Gammelager H, Mortensen RN, Pedersen L, Sørensen HT. Chronic liver disease and 90-day mortality in 21,359 patients following peptic ulcer bleeding--a Nationwide Cohort Study. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 41(6):564-72.
54. Liang CC, Muo CH, Wang IK, Chang CT, Chou CY, Liu JH, Yen TH, Huang CC, Chung CJ. Peptic ulcer disease risk in chronic kidney disease: ten-year incidence, ulcer location, and ulcerogenic effect of medications. *PLoS One* 2014; 9(2):e87952.
55. Huang KW, Kuan YC, Chi NF, Huang YH, Luo JC, Chien LN. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with increased recurrent peptic ulcer bleeding risk. *Eur J Intern Med* 2017; 37:75-82.

56. Li H, Shi Q, Chen C, Li J, Wang K. Smoking-attributable peptic ulcer disease mortality worldwide: trends from 1990 to 2021 and projections to 2046 based on the global burden of disease study. *Front Public Health* 2024; 12:1465452.
57. Garrow D, Delegge MH. Risk factors for gastrointestinal ulcer disease in the US population. *Dig Dis Sci* 2010; 55(1):66-72.
58. Li LF, Chan RL, Lu L, Shen J, Zhang L, Wu WK, Wang L, Hu T, Li MX, Cho CH. Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: the causal relationship and underlying molecular mechanisms (review). *Int J Mol Med* 2014; 34(2):372-80.
59. Levenstein S, Rosenstock S, Jacobsen RK, Jorgensen T. Psychological stress increases risk for peptic ulcer, regardless of *Helicobacter pylori* infection or use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13(3):498-506.e1.
60. Lee YB, Yu J, Choi HH, Jeon BS, Kim HK, Kim SW, Kim SS, Park YG, Chae HS. The association between peptic ulcer diseases and mental health problems: A population-based study: a STROBE compliant article. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(34):e7828.
61. Kanno T, Iijima K, Abe Y, Koike T, Shimada N, Hoshi T, Sano N, Ohyauchi M, Ito H, Atsumi T, Konishi H, Asonuma S, Shimosegawa T. Peptic ulcers after the Great East Japan earthquake and tsunami: possible existence of psychosocial stress ulcers in humans. *J Gastroenterol* 2013; 48(4):483-90.
62. Yim MH, Kim KH, Lee BJ. The number of household members as a risk factor for peptic ulcer disease. *Sci Rep* 2021; 11(1):5274.
63. Miftahussurur M, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* virulence genes and host genetic polymorphisms as risk factors for peptic ulcer disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 9(12):1535-47.
64. Almorish MA, Al-Absi B, Elkhalfa AME, Elamin E, Elderdery AY, Alhamidi AH. ABO, Lewis blood group systems and secretory status with *H.pylori* infection in yemeni dyspeptic patients: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2023; 23(1):520.
65. Alkebsi L, Ideno Y, Lee JS, Suzuki S, Nakajima-Shimada J, Ohnishi H, Sato Y, Hayashi K. Gastroduodenal Ulcers and ABO Blood Group: the Japan Nurses' Health Study (JNHS). *J Epidemiol* 2018; 28(1):34-40.
66. Shiao TH, Liu CJ, Luo JC, Su KC, Chen YM, Chen TJ, Chou KT, Shiao GM, Lee YC. Sleep apnea and risk of peptic ulcer bleeding: a nationwide population-based study. *Am J Med* 2013; 126(3):249-55, 255.e1.
67. Engevik AC, Kaji I, Goldenring JR. The Physiology of the Gastric Parietal Cell. *Physiol Rev* 2020; 100(2):573-602.
68. Schubert ML. Functional anatomy and physiology of gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 2015; 31(6):479-85.
69. Lee YHG, Cerf NT, Shalaby N, Montes MR, Clarke RJ. Bioinformatic Study of Possible Acute Regulation of Acid Secretion in the Stomach. *J Membr Biol* 2024; 257(1-2):79-89.
70. Schubert ML. Physiologic, pathophysiologic, and pharmacologic regulation of gastric acid secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 2017; 33(6):430-438.
71. Schubert ML. Gastric acid secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 2016; 32(6):452-460.
72. Schubert ML, Rehfeld JF. Gastric Peptides-Gastrin and Somatostatin. *Compr Physiol* 2019; 10(1):197-228.
73. Yao X, Smolka AJ. Gastric Parietal Cell Physiology and *Helicobacter pylori*-Induced Disease. *Gastroenterology* 2019; 156(8):2158-2173.
74. Chen D, Hagen SJ, Boyce M, Zhao CM. Neuroendocrine mechanism of gastric acid secretion: Historical perspectives and recent developments in physiology and pharmacology. *J Neuroendocrinol* 2023; 35(11):e13305.

75. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Drozdowicz D, Kwiecień S, Pajdo R, Bielanski W, Hahn EG. Role of gastric acid secretion in progression of acute gastric erosions induced by ischemia-reperfusion into gastric ulcers. *Eur J Pharmacol* 2000; 398(1):147-58.
76. Andrawes M, Andrawes W, Das A, Siau K. Proton Pump Inhibitors (PPIs)-An Evidence-Based Review of Indications, Efficacy, Harms, and Deprescribing. *Medicina (Kaunas)* 2025; 61(9):1569.
77. Perrais M, Rousseaux C, Ducourouble MP, Courcol R, Vincent P, Jonckheere N, Van Seuning I. Helicobacter pylori urease and flagellin alter mucin gene expression in human gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 2014; 17(2):235-46.
78. Clyne M, Ó Cróinín T. Pathogenicity and virulence of Helicobacter pylori: A paradigm of chronic infection. *Virulence* 2025; 16(1):2438735.
79. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* 2008; 134(1):306-23.
80. McColl KE, el-Omar E, Gillen D. Helicobacter pylori gastritis and gastric physiology. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29(3):687-703, viii.
81. Huang XQ. Helicobacter pylori infection and gastrointestinal hormones:a review. *World J Gastroenterol* 2000; 6(6):783-788.
82. Chari S, Teysen S, Singer MV. Alcohol and gastric acid secretion in humans. *Gut* 1993; 34(6):843-7.
83. Aures D, Guth PH, Paulsen G, Grossman MI. Effect of increased gastric mucosal histamine on alcohol-induced gastric damage in rats. *Dig Dis Sci* 1982; 27(4):347-52.
84. Cook D, Guyatt G. Prophylaxis against Upper Gastrointestinal Bleeding in Hospitalized Patients. *N Engl J Med* 2018; 378(26):2506-2516.
85. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 2008; 135(1):41-60.
86. Lewis OL, Keener JP, Fogelson AL. A physics-based model for maintenance of the pH gradient in the gastric mucus layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; 313(6):G599-G612.
87. Boltin D, Niv Y. Pharmacological and alimentary alteration of the gastric barrier. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28(6):981-94.
88. Galura GM, Chavez LO, Robles A, McCallum R. Gastroduodenal Injury: Role of Protective Factors. *Curr Gastroenterol Rep* 2019;21(8):34.
89. Gyires K, Németh J, Zádori ZS. Gastric mucosal protection and central nervous system. *Curr Pharm Des* 2013; 19(1):34-9.
90. Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev* 2008; 88(4):1547-65.
91. Bansil R, Celli JP, Hardcastle JM, Turner BS. The Influence of Mucus Microstructure and Rheology in Helicobacter pylori Infection. *Front Immunol* 2013; 4:310.
92. Niv Y, Boltin D. Secreted and membrane-bound mucins and idiopathic peptic ulcer disease. *Digestion* 2012; 86(3):258-63.
93. Takeuchi K, Amagase K. Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract. *Curr Pharm Des* 2018; 24(18):2002-2011.
94. Lichtenberger LM, Zhou Y, Dial EJ, Raphael RM. NSAID injury to the gastrointestinal tract: evidence that NSAIDs interact with phospholipids to weaken the hydrophobic surface barrier and induce the formation of unstable pores in membranes. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58(11):1421-8.
95. Galati EM, Pergolizzi S, Miceli N, Monforte MT, Tripodo MM. Study on the increment of the production of gastric mucus in rats treated with Opuntia ficus indica (L.) Mill. cladodes. *J Ethnopharmacol* 2002; 83(3):229-33.

96. Vázquez-Ramírez R, Olguín-Martínez M, Kubli-Garfias C, Hernández-Muñoz R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *World J Gastroenterol* 2006; 12(27):4318-24.
97. Liu S, Deng Z, Zhu J, Ma Z, Tuo B, Li T, Liu X. Gastric immune homeostasis imbalance: An important factor in the development of gastric mucosal diseases. *Biomed Pharmacother* 2023; 161:114338.
98. Nie S, Yuan Y. The Role of Gastric Mucosal Immunity in Gastric Diseases. *J Immunol Res* 2020; 2020:7927054.
99. Ahluwalia B, Magnusson MK, Öhman L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand J Gastroenterol* 2017; 52(11):1185-1193.
100. Wershil BK, Furuta GT. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(2 Suppl):S380-3; quiz S415.
101. Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr* 2010; 156(2 Suppl):S8-15.
102. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 2009; 70(6):505-15.
103. Lamichhane A, Azegamia T, Kiyono H. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine* 2014; 32(49):6711-23.
104. Obeagu EI, Obeagu GU. Exploring the intricate relationship between peptic ulcers and immunohematological responses: A narrative review. *Medicine (Baltimore)* 2025; 104(15):e42187.
105. H Altemani F, H Elmaidomy A, H Abu-Baih D, M Abdel Zaher A, Mokhtar FA, A Algehainy N, T Bakhsh H, Bringmann G, Ramadan Abdelmohsen U, Abdelhafez OH. Tamarix aphylla derived metabolites ameliorate indomethacin-induced gastric ulcers in rats by modulating the MAPK signaling pathway, alleviating oxidative stress and inflammation: In vivo study supported by pharmacological network analysis. *PLoS One* 2024; 19(5):e0302015.
106. Fu S, Chen J, Zhang C, Shi J, Nie X, Hu Y, Fu C, Li X, Zhang J. Gastroprotective Effects of *Periplaneta americana* L. Extract Against Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Mice by Suppressing Apoptosis-Related Pathways. *Front Pharmacol* 2021; 12:798421.
107. Eletto D, Mentucci F, Voli A, Petrella A, Porta A, Tosco A. Helicobacter pylori Pathogen-Associated Molecular Patterns: Friends or Foes? *Int J Mol Sci* 2022; 23(7):3531.
108. Mazumder S, Bindu S, De R, Debsharma S, Pramanik S, Bandyopadhyay U. Emerging role of mitochondrial DAMPs, aberrant mitochondrial dynamics and anomalous mitophagy in gut mucosal pathogenesis. *Life Sci* 2022; 305:120753.
109. Imam H, Shabbir A, Jamil A, Butt AM, Fatima T, Haji EM, Alswailmi FK, Almutairy AF, Parrey MUR, Ahmad A. Protective effects of vincamine against ethanol-induced gastric ulcer by attenuation of IL-6, IL-1 β , and TNF- α mRNA expression levels in the gastric mucosa of BALB/c mice. *J Mol Histol* 2025; 56(2):100.
110. Mao J, Shen Y, Qi H. Inflammation in gastric epithelium associated with infection of Helicobacter pylori is induced by inhibited PPAR γ pathway: the key role of TLRs/NF- κ B axis. *Cytokine* 2025; 196:157061.
111. Ma C, Zhang L, Huang Q, Deng Q, Huang F, Xu J. Canolol Alleviates Ethanol-Induced Gastric Ulcer by Inhibiting p38 MAPK/NF- κ B/NLRP3 Pathway. *J Agric Food Chem* 2025; 73(15):9103-9111.
112. Balaha MF, Almalki ZS, Alahmari AK, Ahmed NJ, Balaha MF. AMPK/mTOR-driven autophagy & Nrf2/HO-1 cascade modulation by amentoflavone ameliorates indomethacin-induced gastric ulcer. *Biomed Pharmacother* 2022; 151:113200.

113. Meng X, Liu J, Kang J, Wang M, Guan Z, Tian D, Chen X. Lamivudine protects mice from gastric ulcer by activating PGK1 to suppress ferroptosis. *Biochem Pharmacol* 2024; 227:116440.
114. Buyukcolak-Cebeci Y, Timucin E, Akcelik-Deveci S, Mansur-Ozen N, Aydinlar T, Tiftikci A, Oktem-Okullu S. Determination of the Roles of *H. pylori* Outer Membrane Virulence Factors and Pyroptosis-Associated NLRP3, ASC, Caspase-1, Gasdermin D, IL-1 β , and IL-18 in Ulcer and Gastritis Pathogenesis. *Biology (Basel)* 2025; 14(6):634.
115. Kavitt RT, Lipowska AM, Anyane-Yeboah A, Gralnek IM. Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease. *Am J Med* 2019; 132(4):447-456.
116. 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.
117. Huh CW, Kim BW. Clinical Significance of Risk Factors for Asymptomatic Peptic Ulcer Disease. *Clin Endosc* 2017; 50(6):514-515.
118. 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.
119. McConaghy JR, Decker A, Nair S. Peptic Ulcer Disease and *H. pylori* Infection: Common Questions and Answers. *Am Fam Physician* 2023; 107(2):165-172.
120. Tarasconi A, Coccolini F, Biffi WL, Tomasoni M, Ansaloni L, Picetti E, Molfino S, Shelat V, Cimbanassi S, Weber DG, Abu-Zidan FM, Campanile FC, Di Saverio S, Baiocchi GL, Casella C, Kelly MD, Kirkpatrick AW, Leppaniemi A, Moore EE, Peitzman A, Fraga GP, Ceresoli M, Maier RV, Wani I, Pattonieri V, Perrone G, Velmahos G, Sugrue M, Sartelli M, Kluger Y, Catena F. Perforated and bleeding peptic ulcer: WSES guidelines. *World J Emerg Surg* 2020; 15:3.
121. Hawkey C, Avery A, Coupland CAC, Crooks C, Dumbleton J, Hobbs FDR, Kendrick D, Moore M, Morris C, Rubin G, Smith M, Stevenson D; HEAT Trialists. Helicobacter pylori eradication for primary prevention of peptic ulcer bleeding in older patients prescribed aspirin in primary care (HEAT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2022; 400(10363):1597-1606.
122. Hasadia R, Kopelman Y, Olsha O, Alfici R, Ashkenazi I. Short- and long-term outcomes of surgical management of peptic ulcer complications in the era of proton pump inhibitors. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2018; 44(5):795-801.
123. Costa CS, Pratas N, Capote H. Massive gastric dilation caused by gastric outlet obstruction in the setting of peptic ulcer disease-A case report. *Int J Surg Case Rep* 2020; 70:64-67.
124. Fashner J, Gitu AC. Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease and *H. pylori* Infection. *Am Fam Physician* 2015; 91(4):236-42.
125. Ramakrishnan K, Salinas RC. Peptic ulcer disease. *Am Fam Physician* 2007; 76(7):1005-12.
126. Liao EC, Yu CH, Lai JH, Lin CC, Chen CJ, Chang WH, Chien DK. A pilot study of non-invasive diagnostic tools to detect Helicobacter pylori infection and peptic ulcer disease. *Sci Rep* 2023; 13(1):22800.
127. Zhang YH, Xu ZH, Ni SS, Luo HX. Gastrointestinal contrast-enhanced ultrasonography for diagnosis and treatment of peptic ulcer in children. *World J Gastroenterol* 2024; 30(7):705-713.
128. Mu K, Sun Q, Li X, Du X, Gao H, Zhang W. The value of oral contrast-enhanced gastric ultrasonography in the diagnosis and staging of benign peptic ulcer. *Sci Rep* 2024; 14(1):17390.
129. Expert Panel on Gastrointestinal Imaging; Vij A, Zaheer A, Kamel IR, Porter KK, Arif-Tiwari H, Bashir MR, Fung A, Goldstein A, Herr KD, Kamaya A, Kobi M, Landler MP, Russo GK, Thakrar KH, Turturro MA, Wahab SA, Wardrop RM 3rd, Wright CL, Yang X, Carucci

- LR. ACR Appropriateness Criteria® Epigastric Pain. *J Am Coll Radiol* 2021; 18(11S):S330-S339.
130. Shanika LGT, Reynolds A, Pattison S, Braund R. Proton pump inhibitor use: systematic review of global trends and practices. *Eur J Clin Pharmacol* 2023; 79(9):1159-1172.
131. Garegnani L, Oltra G, Burgos MA, Ivaldi D, Varela LB, Díaz Menai S, Puga-Tejada M, Escobar Liquitay CM, Franco JV. Proton pump inhibitors for the prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced ulcers and dyspepsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2025; 5(5):CD014585.
132. Clarke K, Adler N, Agrawal D, Bhakta D, Sata SS, Singh S, Gupta A, Pahwa A, Pherson E, Sun A, Volpicelli F, Cho HJ. Indications for the Use of Proton Pump Inhibitors for Stress Ulcer Prophylaxis and Peptic Ulcer Bleeding in Hospitalized Patients. *Am J Med* 2022; 135(3):313-317.
133. Maideen NMP. Adverse Effects Associated with Long-Term Use of Proton Pump Inhibitors. *Chonnam Med J* 2023; 59(2):115-127.
134. Kou E, Zhang X, Dong B, Wang B, Zhu Y. Combination of H1 and H2 Histamine Receptor Antagonists: Current Knowledge and Perspectives of a Classic Treatment Strategy. *Life (Basel)* 2024; 14(2):164.
135. St Onge E, Phillips B. Vonoprazan: A New Potassium-Competitive Acid Blocker. *J Pharm Technol* 2023; 39(3):139-146.
136. Shirley M. Vonoprazan: A Review in Helicobacter pylori Infection. *Drugs* 2024; 84(3):319-327.
137. Szabo S. "Gastric cytoprotection" is still relevant. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29 Suppl 4:124-32.
138. Mózsik G, Szabó IL, Czimmer J. Approaches to gastrointestinal cytoprotection: from isolated cells, via animal experiments to healthy human subjects and patients with different gastrointestinal disorders. *Curr Pharm Des* 2011; 17(16):1556-72.
139. Tarnawski A, Ahluwalia A, Jones MK. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. *Curr Pharm Des* 2013; 19(1):126-32.
140. Wildeman RA. Focus on misoprostol: review of worldwide safety data. *Clin Invest Med* 1987; 10(3):243-5.
141. Yadav S, Pandey A, Mali SN. From lab to nature: Recent advancements in the journey of gastroprotective agents from medicinal chemistry to phytotherapy. *Eur J Med Chem* 2024; 272:116436.
142. Akash SR, Tabassum A, Aditee LM, Rahman A, Hossain MI, Hannan MA, Uddin MJ. Pharmacological insight of rutin as a potential candidate against peptic ulcer. *Biomed Pharmacother* 2024; 177:116961.
143. Zhang W, Lian Y, Li Q, Sun L, Chen R, Lai X, Lai Z, Yuan E, Sun S. Preventative and Therapeutic Potential of Flavonoids in Peptic Ulcers. *Molecules* 2020; 25(20):4626.
144. Prayoga DK, Aulifa DL, Budiman A, Levita J, Jiranusornkul S. Cyanidin and Cyanidin-3-Glucoside Alleviate Peptic Ulcer Disease: Insights from in vitro, and in vivo Studies. *Drug Des Devel Ther* 2025; 19:841-856.
145. Périco LL, Emilio-Silva MT, Ohara R, Rodrigues VP, Bueno G, Barbosa-Filho JM, Rocha LRMD, Batista LM, Hiruma-Lima CA. Systematic Analysis of Monoterpenes: Advances and Challenges in the Treatment of Peptic Ulcer Diseases. *Biomolecules* 2020; 10(2):265.
146. Shipa SJ, Khandokar L, Bari MS, Qais N, Rashid MA, Haque MA, Mohamed IN. An insight into the anti-ulcerogenic potentials of medicinal herbs and their bioactive metabolites. *J Ethnopharmacol* 2022; 293:115245.

147. Prayoga DK, Aulifa DL, Budiman A, Levita J. Plants with Anti-Ulcer Activity and Mechanism: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Drug Des Devel Ther* 2024; 18:193-213.
148. Kim JS, Park SM, Kim BW. Endoscopic management of peptic ulcer bleeding. *Clin Endosc* 2015; 48(2):106-11.
149. Abe N, Takeuchi H, Yanagida O, Sugiyama M, Atomi Y. Surgical indications and procedures for bleeding peptic ulcer. *Dig Endosc* 2010; 22 Suppl 1:S35-7.
150. Sartelli M, Chichom-Mefire A, Labricciosa FM, Hardcastle T, Abu-Zidan FM, Adesunkanmi AK, Ansaloni L, Bala M, Balogh ZJ, Beltrán MA, Ben-Ishay O, Biffi WL, Birindelli A, Cainzos MA, Catalini G, Ceresoli M, Che Jusoh A, Chiara O, Coccolini F, Coimbra R, Cortese F, Demetrashvili Z, Di Saverio S, Diaz JJ, Egiev VN, Ferrada P, Fraga GP, Ghnam WM, Lee JG, Gomes CA, Hecker A, Herzog T, Kim JI, Inaba K, Isik A, Karamarkovic A, Kashuk J, Khokha V, Kirkpatrick AW, Kluger Y, Koike K, Kong VY, Leppaniemi A, Machain GM, Maier RV, Marwah S, McFarlane ME, Montori G, Moore EE, Negroi I, Olaoye I, Omari AH, Ordonez CA, Pereira BM, Pereira Júnior GA, Pupelis G, Reis T, Sakakhushev B, Sato N, Segovia Lohse HA, Shelat VG, Søreide K, Uhl W, Ulrych J, Van Goor H, Velmahos GC, Yuan KC, Wani I, Weber DG, Zachariah SK, Catena F. The management of intra-abdominal infections from a global perspective: 2017 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg* 2017; 12:29.
151. Abdalgilil HH, Ismail AS, Alshmaily HO, Alshammari DS. A Conservative Management of Perforated Peptic Ulcer: A Case Report. *Cureus* 2024; 16(3):e56491.
152. Behrman SW. Management of complicated peptic ulcer disease. *Arch Surg* 2005; 140(2):201-8.
153. Adinortey MB, Ansah C, Galyuon I, Nyarko A. In vivo models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents. *Ulcers* 2013; 2013:796405.
154. Beiranvand M. A review of the most common in vivo models of stomach ulcers and natural and synthetic anti-ulcer compounds: A comparative systematic study. *Phytomedicine Plus* 2022; 2(2):100264.
155. Park HS, Seo CS, Baek EB, Rho JH, Won YS, Kwun HJ. Gastroprotective Effect of Myricetin on Ethanol-Induced Acute Gastric Injury in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021; 2021:9968112.
156. Chang W, Bai J, Tian S, Ma M, Li W, Yin Y, Deng R, Cui J, Li J, Wang G, Zhang P, Tao K. Autophagy protects gastric mucosal epithelial cells from ethanol-induced oxidative damage via mTOR signaling pathway. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017; 242(10):1025-1033.
157. Kang GD, Kim DH. Ponciretin attenuates ethanol-induced gastric damage in mice by inhibiting inflammatory responses. *Int Immunopharmacol* 2017; 43:179-186.
158. Li Q, Hu X, Xuan Y, Ying J, Fei Y, Rong J, Zhang Y, Zhang J, Liu C, Liu Z. Kaempferol protects ethanol-induced gastric ulcers in mice via pro-inflammatory cytokines and NO. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2018; 50(3):246-253.
159. Tai FWD, McAlindon ME. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. *Clin Med (Lond)* 2021; 21(2):131-134.
160. Chang L, Wei S, Wang X, Li H, Zhou X, Wu W, Zhu S, Jing M, Zhao Y. Rutaecarpine alleviates aspirin-induced gastric injury via oxidative stress and ferroptosis inhibition. *Eur J Pharmacol* 2025; 1003:177969.
161. Yigit S, Kaci FN, Gezer A, Yayla M, Duysak L, Aksu Kilicle P, Toktay E, Eyerci N, Karadag GEA, Bingol SA. Gastroprotective and Antioxidant Effects of Ferula Plant Extract Against Indomethacin Induced Gastric Ulcer in Rats. *Food Sci Nutr* 2025; 13(8):e70730.
162. Balasubramanian T, Somasundaram M, Felix AJ. Taurine prevents Ibuprofen-induced gastric mucosal lesions and influences endogenous antioxidant status of stomach in rats. *ScientificWorldJournal* 2004; 4:1046-54.

163. Ahmad SS, Najmi AK, Kaundal M, Akhtar M. Gastroprotective Effect of Thymoquinone on Water Immersion Restraint Stress Induced Ulceration in Rats. *Drug Res (Stuttg)* 2017; 67(6):366-372.
164. Di Cerbo A, Carnevale G, Avallone R, Zavatti M, Corsi L. Protective Effects of *Borago officinalis* (Borago) on Cold Restraint Stress-Induced Gastric Ulcers in Rats: A Pilot Study. *Front Vet Sci* 2020; 7:427.
165. Zhao DQ, Xue H, Sun HJ. Nervous mechanisms of restraint water-immersion stress-induced gastric mucosal lesion. *World J Gastroenterol* 2020; 26(20):2533-2549.
166. Omayone TP, Salami AT, Olopade JO, Olaleye SB. Attenuation of ischemia-reperfusion-induced gastric ulcer by low-dose vanadium in male Wistar rats. *Life Sci* 2020; 259:118272.
167. Singh V, Gohil N, Ramírez-García R. New insight into the control of peptic ulcer by targeting the histamine H₂ receptor. *J Cell Biochem* 2018; 119(2):2003-2011.
168. Ma XJ, Lu GC, Song SW, Liu W, Wen ZP, Zheng X, Lü QZ, Su DF. The features of reserpine-induced gastric mucosal lesions. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31(8):938-43.
169. Song JL, Zhu K, Feng X, Zhao X. Protective effect *Malus pumila* Mill leaf polyphenols in reserpine-induced gastric ulcer in mice. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2015; 58:249-256.
170. Shah DI, Santani DD, Goswami SS. A novel use of methylene blue as a pharmacological tool. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006; 54(3):273-7.
171. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 2003; 163(1):69-79.
172. Blanchard L, Girard JP. High endothelial venules (HEVs) in immunity, inflammation and cancer. *Angiogenesis* 2021; 24(4):719-753.
173. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005; 23(5):479-90.
174. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(1):282-7.
175. Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev* 2018; 281(1):154-168.
176. Zeng F, Chen H, Chen L, Mao J, Cai S, Xiao Y, Li J, Shi J, Li B, Xu Y, Tan Z, Gong F, Li B, Qian Y, Dong L, Zheng F. An Autocrine Circuit of IL-33 in Keratinocytes Is Involved in the Progression of Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2021; 141(3):596-606.e7.
177. Topczewska PM, Savvopoulou A, Cosovanu C, Klose CSN. Transcriptional profiling identifies IL-33-expressing intestinal stromal cells as a signaling hub poised to interact with enteric neurons. *Front Cell Dev Biol* 2024; 12:1420313.
178. Jia Z, Guo M, Ge X, Chen F, Lei P. IL-33/ST2 Axis: A Potential Therapeutic Target in Neurodegenerative Diseases. *Biomolecules* 2023; 13(10):1494.
179. Luzina IG, Clerman A, Fischelevich R, Todd NW, Lockett V, Atamas SP. Identification of the IL-33 protein segment that controls subcellular localization, extracellular secretion, and functional maturation. *Cytokine* 2019; 119:1-6.
180. Lefrançais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP, Cayrol C. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(5):1673-8.
181. Liu X, Hammel M, He Y, Tainer JA, Jeng US, Zhang L, Wang S, Wang X. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(37):14918-23.

182. Lingel A, Weiss TM, Niebuhr M, Pan B, Appleton BA, Wiesmann C, Bazan JF, Fairbrother WJ. Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure* 2009; 17(10):1398-410.
183. Jamwal A, Colomb F, McSorley HJ, Higgins MK. Structural basis for IL-33 recognition and its antagonism by the helminth effector protein HpARI2. *Nat Commun* 2024; 15(1):5226.
184. He PY, Wu MY, Zheng LY, Duan Y, Fan Q, Zhu XM, Yao YM. Interleukin-33/serum stimulation-2 pathway: Regulatory mechanisms and emerging implications in immune and inflammatory diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2024; 76:112-126.
185. Saikumar Jayalatha AK, Hesse L, Ketelaar ME, Koppelman GH, Nawijn MC. The central role of IL-33/IL-1RL1 pathway in asthma: From pathogenesis to intervention. *Pharmacol Ther* 2021; 225:107847.
186. Ketelaar ME, Portelli MA, Dijk FN, Shrine N, Faiz A, Vermeulen CJ, Xu CJ, Hankinson J, Bhaker S, Henry AP, Billington CK, Shaw DE, Johnson SR, Benest AV, Pang V, Bates DO, Pogson ZEK, Fogarty A, McKeever TM, Singapuri A, Heaney LG, Mansur AH, Chaudhuri R, Thomson NC, Holloway JW, Lockett GA, Howarth PH, Niven R, Simpson A, Tobin MD, Hall IP, Wain LV, Blakey JD, Brightling CE, Obeidat M, Sin DD, Nickle DC, Bossé Y, Vonk JM, van den Berge M, Koppelman GH, Sayers I, Nawijn MC. Phenotypic and functional translation of IL33 genetics in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2021; 147(1):144-157.
187. Talabot-Ayer D, Calo N, Vigne S, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. The mouse interleukin (IL)33 gene is expressed in a cell type- and stimulus-dependent manner from two alternative promoters. *J Leukoc Biol* 2012; 91(1):119-25.
188. Polumuri SK, Jayakar GG, Shirey KA, Roberts ZJ, Perkins DJ, Pitha PM, Vogel SN. Transcriptional regulation of murine IL-33 by TLR and non-TLR agonists. *J Immunol* 2012; 189(1):50-60.
189. Gautier V, Cayrol C, Farache D, Roga S, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Gonzalez de Peredo A, Girard JP. Extracellular IL-33 cytokine, but not endogenous nuclear IL-33, regulates protein expression in endothelial cells. *Sci Rep* 2016; 6:34255.
190. Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, Schlicht S, Smith SH, Iglesias A, Cote-Sierra J. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun* 2014; 55:33-41.
191. Shao D, Perros F, Caramori G, Meng C, Dormuller P, Chou PC, Church C, Papi A, Casolari P, Welsh D, Peacock A, Humbert M, Adcock IM, Wort SJ. Nuclear IL-33 regulates soluble ST2 receptor and IL-6 expression in primary human arterial endothelial cells and is decreased in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 451(1):8-14.
192. Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol* 2014; 31:31-7.
193. Zhou Z, Yan F, Liu O. Interleukin (IL)-33: an orchestrator of immunity from host defence to tissue homeostasis. *Clin Transl Immunology* 2020; 9(6):e1146.
194. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol* 2016; 17(2):122-31.
195. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B-stimulated gene transcription. *J Immunol* 2011; 187(4):1609-16.
196. Lefrançois E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, Girard JP. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(43):15502-7.
197. Pascual-Figal DA, Januzzi JL. The biology of ST2: the International ST2 Consensus Panel. *Am J Cardiol* 2015; 115(7 Suppl):3B-7B.

198. Wang X, Zhu YF, Li DM, Qin Q, Wang Q, Muhali FS, Jiang WJ, Zhang JA. Polymorphisms of ST2-IL18R1-IL18RAP gene cluster: a new risk for autoimmune thyroid diseases. *Int J Immunogenet* 2016; 43(1):18-24.
199. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett* 1989; 258(2):301-4.
200. Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett* 1993; 318(1):83-7.
201. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(10):827-40.
202. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 2017; 8:475.
203. Dwyer GK, D'Cruz LM, Turnquist HR. Emerging Functions of IL-33 in Homeostasis and Immunity. *Annu Rev Immunol* 2022; 40:15-43.
204. Kaur H, Kaur G, Ali SA. IL-33's role in the gut immune system: A comprehensive review of its crosstalk and regulation. *Life Sci* 2023; 327:121868.
205. Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2016; 16(11):676-689.
206. Vasanthakumar A, Kallies A. Interleukin (IL)-33 and the IL-1 Family of Cytokines-Regulators of Inflammation and Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2019; 11(3):a028506.
207. Drake LY, Kita H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. *Immunol Rev* 2017; 278(1):173-184.
208. Braun H, Afonina IS, Mueller C, Beyaert R. Dichotomous function of IL-33 in health and disease: From biology to clinical implications. *Biochem Pharmacol* 2018; 148:238-252.
209. Andreone S, Gambardella AR, Mancini J, Loffredo S, Marcella S, La Sorsa V, Varricchi G, Schiavoni G, Mattei F. Anti-Tumorigenic Activities of IL-33: A Mechanistic Insight. *Front Immunol* 2020; 11:571593.
210. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 2009; 31(1):84-98.
211. Cohen ES, Scott IC, Majithiya JB, Rapley L, Kemp BP, England E, Rees DG, Overed-Sayer CL, Woods J, Bond NJ, Veyssier CS, Embrey KJ, Sims DA, Snaith MR, Vousden KA, Strain MD, Chan DT, Carmen S, Huntington CE, Flavell L, Xu J, Popovic B, Brightling CE, Vaughan TJ, Butler R, Lowe DC, Higazi DR, Corkill DJ, May RD, Sleeman MA, Mustelin T. Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Commun* 2015; 6:8327.
212. Lv YP, Teng YS, Mao FY, Peng LS, Zhang JY, Cheng P, Liu YG, Kong H, Wang TT, Wu XL, Hao CJ, Chen W, Yang SM, Zhao YL, Han B, Ma Q, Zou QM, Zhuang Y. Helicobacter pylori-induced IL-33 modulates mast cell responses, benefits bacterial growth, and contributes to gastritis. *Cell Death Dis* 2018; 9(5):457.
213. Tran LS, Tran D, De Paoli A, D'Costa K, Creed SJ, Ng GZ, Le L, Sutton P, Silke J, Nachbur U, Ferrero RL. NOD1 is required for Helicobacter pylori induction of IL-33 responses in gastric epithelial cells. *Cell Microbiol* 2018; 20(5):e12826.
214. Buzzelli JN, Chalinor HV, Pavlic DI, Sutton P, Menheniott TR, Giraud AS, Judd LM. IL33 Is a Stomach Alarmin That Initiates a Skewed Th2 Response to Injury and Infection. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015; 1(2):203-221.e3.
215. Shahi H, Reisi S, Bahreini R, Bagheri N, Salimzadeh L, Shirzad H. Association Between Helicobacter pylori cagA, babA2 Virulence Factors and Gastric Mucosal Interleukin-33 mRNA

- Expression and Clinical Outcomes in Dyspeptic Patients. *Int J Mol Cell Med* 2015; 4(4):227-34.
216. Bassagh A, Jafarzadeh A, Kazempour N, Nemati M, Aminizadeh N, Larussa T, Ghazizadeh M, Abasi MH, Mirkamandar E. Decreased circulating interleukin-33 concentration in *Helicobacter pylori*-infected patients with peptic ulcer: Evaluation of its association with a cytokine gene polymorphism, gender of patients and bacterial virulence factor CagA. *Microb Pathog* 2019; 136:103708.
217. De Salvo C, Pastorelli L, Petersen CP, Buttò LF, Buela KA, Omenetti S, Locovei SA, Ray S, Friedman HR, Duijser J, Xin W, Osme A, Cominelli F, Mahabeleshwar GH, Mills JC, Goldenring JR, Pizarro TT. Interleukin 33 Triggers Early Eosinophil-Dependent Events Leading to Metaplasia in a Chronic Model of Gastritis-Prone Mice. *Gastroenterology* 2021; 160(1):302-316.e7.
218. Petersen CP, Meyer AR, De Salvo C, Choi E, Schlegel C, Petersen A, Engevik AC, Prasad N, Levy SE, Peebles RS, Pizarro TT, Goldenring JR. A signalling cascade of IL-33 to IL-13 regulates metaplasia in the mouse stomach. *Gut* 2018; 67(5):805-817.
219. Privitera G, Williams JJ, De Salvo C. The Importance of Th2 Immune Responses in Mediating the Progression of Gastritis-Associated Metaplasia to Gastric Cancer. *Cancers (Basel)* 2024; 16(3):522.
220. Zhou Q, Wu X, Wang X, Yu Z, Pan T, Li Z, Chang X, Jin Z, Li J, Zhu Z, Liu B, Su L. The reciprocal interaction between tumor cells and activated fibroblasts mediated by TNF- α /IL-33/ST2L signaling promotes gastric cancer metastasis. *Oncogene* 2020; 39(7):1414-1428.
221. Kudo-Saito C, Imazeki H, Nagashima K, Shoji H, Tsugaru K, Takahashi N, Kawakami T, Amanuma Y, Wakatsuki T, Okano N, Narita Y, Yamamoto Y, Kizawa R, Muro K, Ichikawa H, Boku N. IL33-ST2 axis is a predictive biomarker for anti-PD1 therapeutic efficacy in advanced gastric cancer. *J Transl Med* 2025; 23(1):1125.
222. Tran CP, Scurr M, O'Connor L, Buzzelli JN, Ng GZ, Chin SCN, Stamp LA, Minamoto T, Giraud AS, Judd LM, Sutton P, Menheniott TR. IL-33 promotes gastric tumour growth in concert with activation and recruitment of inflammatory myeloid cells. *Oncotarget* 2022; 13:785-799.
223. Huang N, Cui X, Li W, Zhang C, Liu L, Li J. IL-33/ST2 promotes the malignant progression of gastric cancer via the MAPK pathway. *Mol Med Rep* 2021; 23(5):361.
224. Eissmann MF, Dijkstra C, Jarnicki A, Pheesse T, Brunnberg J, Poh AR, Etemadi N, Tsantikos E, Thiem S, Huntington ND, Hibbs ML, Boussioutas A, Grimbaldston MA, Buchert M, O'Donoghue RJJ, Masson F, Ernst M. IL-33-mediated mast cell activation promotes gastric cancer through macrophage mobilization. *Nat Commun* 2019; 10(1):2735.
225. Pisani LF, Tontini GE, Gentile C, Marinoni B, Teani I, Nandi N, Creo P, Asti E, Bonavina L, Vecchi M, Pastorelli L. Proinflammatory Interleukin-33 Induces Dichotomic Effects on Cell Proliferation in Normal Gastric Epithelium and Gastric Cancer. *Int J Mol Sci* 2021; 22(11):5792.
226. Chatterjee A, Azevedo-Martins JM, Stachler MD. Interleukin-33 as a Potential Therapeutic Target in Gastric Cancer Patients: Current Insights. *Onco Targets Ther* 2023; 16:675-687.
227. Aggeletopoulou I, Tsounis EP, Triantos C. Molecular Mechanisms Underlying IL-33-Mediated Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci* 2022; 24(1):623.
228. Andoh A, Nishida A. Pro- and anti-inflammatory roles of interleukin (IL)-33, IL-36, and IL-38 in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2023; 58(2):69-78.
229. Chen J, He Y, Tu L, Duan L. Dual immune functions of IL-33 in inflammatory bowel disease. *Histol Histopathol* 2020; 35(2):137-146.
230. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mattioli B, Scarpa M, Fiocchi C, Vecchi M, Pizarro TT. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis

- and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(17):8017-22.
231. Beltrán CJ, Núñez LE, Díaz-Jiménez D, Farfan N, Candia E, Heine C, López F, González MJ, Quera R, Hermoso MA. Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16(7):1097-107.
232. Seo DH, Che X, Kwak MS, Kim S, Kim JH, Ma HW, Kim DH, Kim TI, Kim WH, Kim SW, Cheon JH. Interleukin-33 regulates intestinal inflammation by modulating macrophages in inflammatory bowel disease. *Sci Rep* 2017; 7(1):851.
233. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(43):18581-6.
234. Sedhom MA, Pichery M, Murdoch JR, Foligné B, Ortega N, Normand S, Mertz K, Sanmugalingam D, Brault L, Grandjean T, Lefrançais E, Fallon PG, Quesniaux V, Peyrin-Biroulet L, Cathomas G, Junt T, Chamaillard M, Girard JP, Ryffel B. Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut* 2013; 62(12):1714-23.
235. Ngo Thi Phuong N, Palmieri V, Adamczyk A, Klopffleisch R, Langhorst J, Hansen W, Westendorf AM, Pastille E. IL-33 Drives Expansion of Type 2 Innate Lymphoid Cells and Regulatory T Cells and Protects Mice From Severe, Acute Colitis. *Front Immunol* 2021; 12:669787.
236. Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, Tran SV, Zaiss DM, Artis D. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(34):10762-7.
237. Lopetuso LR, De Salvo C, Pastorelli L, Rana N, Senkfor HN, Petito V, Di Martino L, Scaldaferrri F, Gasbarrini A, Cominelli F, Abbott DW, Goodman WA, Pizarro TT. IL-33 promotes recovery from acute colitis by inducing miR-320 to stimulate epithelial restitution and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(40):E9362-E9370.
238. De Salvo C, Wang XM, Pastorelli L, Mattioli B, Omenetti S, Buela KA, Chowdhry S, Garg RR, Goodman WA, Rodriguez-Palacios A, Smith DE, Abbott DW, Cominelli F, Bamias G, Xin W, Lee JJ, Vecchi M, Pizarro TT. IL-33 Drives Eosinophil Infiltration and Pathogenic Type 2 Helper T-Cell Immune Responses Leading to Chronic Experimental Ileitis. *Am J Pathol* 2016; 186(4):885-98.
239. De Salvo C, Buela KA, Creyns B, Corridoni D, Rana N, Wargo HL, Cominelli CL, Delaney PG, Rodriguez-Palacios A, Cominelli F, Vermeire S, Pizarro TT. NOD2 drives early IL-33-dependent expansion of group 2 innate lymphoid cells during Crohn's disease-like ileitis. *J Clin Invest* 2021; 131(5):e140624.
240. Zhu JF, Xu Y, Zhao J, Li X, Meng X, Wang TQ, Zou BY, Zhao PY, Liu Q, Lu CL, Zheng FL, Liu HS. IL-33 Protects Mice against DSS-Induced Chronic Colitis by Increasing Both Regulatory B Cell and Regulatory T Cell Responses as Well as Decreasing Th17 Cell Response. *J Immunol Res* 2018; 2018:1827901.
241. Malik A, Sharma D, Zhu Q, Karki R, Guy CS, Vogel P, Kanneganti TD. IL-33 regulates the IgA-microbiota axis to restrain IL-1 α -dependent colitis and tumorigenesis. *J Clin Invest* 2016; 126(12):4469-4481.
242. Kurimoto M, Watanabe T, Kamata K, Minaga K, Kudo M. IL-33 as a Critical Cytokine for Inflammation and Fibrosis in Inflammatory Bowel Diseases and Pancreatitis. *Front Physiol* 2021; 12:781012.
243. Fang M, Li Y, Huang K, Qi S, Zhang J, Zgodzinski W, Majewski M, Wallner G, Gozdz S, Macek P, Kowalik A, Pasiarski M, Grywalska E, Vatan L, Nagarsheth N, Li W, Zhao L, Kryczek I, Wang G, Wang Z, Zou W, Wang L. IL33 Promotes Colon Cancer Cell Stemness via JNK Activation and Macrophage Recruitment. *Cancer Res* 2017; 77(10):2735-2745.

244. Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP, Lanza DG, Berger NA, Markowitz SD, Lenz HJ, Nadeau JH, Pizarro TT, Heaney JD. IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(19):E2487-96.
245. Cui G, Yuan A, Pang Z, Zheng W, Li Z, Goll R. Contribution of IL-33 to the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2018; 8:561.
246. Landskron G, De la Fuente López M, Dubois-Camacho K, Díaz-Jiménez D, Orellana-Serradell O, Romero D, Sepúlveda SA, Salazar C, Parada-Venegas D, Quera R, Simian D, González MJ, López-Köstner F, Kronberg U, Abedrapo M, Gallegos I, Contreras HR, Peña C, Díaz-Araya G, Roa JC, Hermoso MA. Interleukin 33/ST2 Axis Components Are Associated to Desmoplasia, a Metastasis-Related Factor in Colorectal Cancer. *Front Immunol* 2019; 10:1394.
247. Liu X, Zhu L, Lu X, Bian H, Wu X, Yang W, Qin Q. IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453(3):486-92.
248. Pastille E, Wasmer MH, Adamczyk A, Vu VP, Mager LF, Phuong NNT, Palmieri V, Simillion C, Hansen W, Kasper S, Schuler M, Muggli B, McCoy KD, Buer J, Zlobec I, Westendorf AM, Krebs P. The IL-33/ST2 pathway shapes the regulatory T cell phenotype to promote intestinal cancer. *Mucosal Immunol* 2019; 12(4):990-1003.
249. Song M, Yang J, Di M, Hong Y, Pan Q, Du Y, Xiang T, Liu J, Tang Y, Wang Q, Li Y, He J, Chen H, Zhao J, Weng D, Zhang Y, Xia JC. Alarmin IL-33 orchestrates antitumoral T cell responses to enhance sensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Theranostics* 2023; 13(5):1649-1668.
250. Yoo CY, Son HU, Kim SK, Kim SO, Lee SH. Improved Image Analysis for Measuring Gastric Ulcer Index in Animal Models and Clinical Diagnostic Data. *Diagnostics (Basel)* 2022; 12(5):1233.
251. Kwon DA, Kim YS, Baek SH, Kim SK, Kim HK, Jo SK, Jung U, Park HR, Lee HS. Protective effects of a standardized extract (HemoHIM) using indomethacin- and ethanol/HCl-induced gastric mucosal injury models. *Pharm Biol* 2019; 57(1):543-549.
252. Laine L, Weinstein WM. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. *Gastroenterology* 1988; 94(6):1254-62.
253. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer* 2014; 134(7):1669-82.
254. Jevtovic A, Pantic J, Jovanovic I, Milovanovic M, Stanojevic I, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Radosavljevic GD. Interleukin-33 pretreatment promotes metastatic growth of murine melanoma by reducing the cytotoxic capacity of CD8+ T cells and enhancing regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2020; 69(8):1461-1475.
255. Ruiz VE, Sachdev M, Zhang S, Wen S, Moss SF. Isolating, immunophenotyping and ex vivo stimulation of CD4+ and CD8+ gastric lymphocytes during murine *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol Methods* 2012; 384(1-2):157-63.
256. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000; 243(1-2):107-24.
257. Mehraj V, Ponte R, Routy JP. The Dynamic Role of the IL-33/ST2 Axis in Chronic Viral-infections: Alarming and Adjuvanting the Immune Response. *EbioMedicine* 2016; 9:37-44.
258. Xu J, Wang C, Xu Y, Li B, Ye J. The Critical Role and Therapeutic Potential of the CXCR Family in Skin Diseases. *Front Biosci* 2025; 30(5):26759.
259. Simon L, Souza-Smith FM, Molina PE. Alcohol-Associated Tissue Injury: Current Views on Pathophysiological Mechanisms. *Annu Rev Physiol* 2022; 84:87-112.
260. Cao Z, Tian K, Ran Y, Zhou H, Zhou L, Ding Y, Tang X. Beclin-1: a therapeutic target at the intersection of autophagy, immunotherapy, and cancer treatment. *Front Immunol* 2024; 15:1506426.

261. Raish M, Shahid M, Bin Jordan YA, Ansari MA, Alkharfy KM, Ahad A, Abdelrahman IA, Ahmad A, Al-Jenoobi FI. Gastroprotective Effect of Sinapic Acid on Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Rats: Involvement of Nrf2/HO-1 and NF- κ B Signaling and Antiapoptotic Role. *Front Pharmacol* 2021; 12:622815.
262. Huang XR, Chun Hui CW, Chen YX, Wong BC, Fung PC, Metz C, Cho CH, Hui WM, Bucala R, Lam SK, Lan HY. Macrophage migration inhibitory factor is an important mediator in the pathogenesis of gastric inflammation in rats. *Gastroenterology* 2001; 121(3):619-30.
263. Xu XQ, Wang ZH, Liao JX, Chen XY, Liu WZ, Xiao SD, Lu H. Predictive value of neutrophil infiltration as a marker of Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol* 2012; 18(36):5101-5.
264. Shukla GT, Yadav S, Shukla A, Yadav KK, Varma AV, Nandedekar S, Senger M, Gupta S. Histopathological Features of Chronic Gastritis and its Association with Helicobacter pylori Infection. *Korean J Gastroenterol* 2024; 84(4):153-159.
265. Li WS, Lin SC, Chu CH, Chang YK, Zhang X, Lin CC, Tung YT. The Gastroprotective Effect of Naringenin against Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Mice through Inhibiting Oxidative and Inflammatory Responses. *Int J Mol Sci* 2021; 22(21):11985.
266. Mousa AM, El-Sammad NM, Hassan SK, Madboli AENA, Hashim AN, Moustafa ES, Bakry SM, Elsayed EA. Antiulcerogenic effect of Cuphea ignea extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *BMC Complement Altern Med* 2019; 19(1):345.
267. Tariq M, Al Moutaery A. Menadione protects gastric mucosa against ethanol-induced ulcers. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 56(6):393-9.
268. Hou Y, Wang W, Ye J, Sun L, Zhou S, Zheng Q, Shi Y, Chen Y, Yao J, Wang L, Yan X, Wan R, Chen S, Li Y. The crucial role of neutrophil extracellular traps and IL-17 signaling in indomethacin-induced gastric injury in mice. *Sci Rep* 2025; 15(1):12109.
269. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol* 2021; 61(2):194-211.
270. Chen S, Saeed AFUH, Liu Q, Jiang Q, Xu H, Xiao GG, Rao L, Duo Y. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8(1):207.
271. Lin J, Liu J, Ma R, Hao J, Liang Y, Zhao J, Zhang A, Meng H, Lu J. Interleukin-33: Metabolic checkpoints, metabolic processes, and epigenetic regulation in immune cells. *Front Immunol* 2022; 13:900826.
272. Muntjewerff EM, Meesters LD, van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Front Immunol* 2020; 11:1276.
273. MacDonald RJ, Yen A. CXCR5 overexpression in HL-60 cells enhances chemotaxis toward CXCL13 without anticipated interaction partners or enhanced MAPK signaling. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2018; 54(10):725-735.
274. Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, Alves-Filho JC, Cunha TM, Guerrero AT, Mattos-Guimaraes RB, Oliveira FR, Teixeira MM, Silva JS, McInnes IB, Ferreira SH, Louzada-Junior P, Liew FY, Cunha FQ. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(9):1697-703.
275. Yazdani HO, Chen HW, Tohme S, Tai S, van der Windt DJ, Loughran P, Rosborough BR, Sud V, Beer-Stolz D, Turnquist HR, Tsung A, Huang H. IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation. *J Hepatol* 2017; S0168-8278(17)32291-2.
276. Yu L, Li R, Liu W, Zhou Y, Li Y, Qin Y, Chen Y, Xu Y. Protective Effects of Wheat Peptides against Ethanol-Induced Gastric Mucosal Lesions in Rats: Vasodilation and Anti-Inflammation. *Nutrients* 2020; 12(8):2355.
277. Ke J, Cai G. Effect of IL-33 on pyroptosis of macrophages in mice with sepsis via NF- κ B/p38 MAPK signaling pathway. *Acta Cir Bras* 2021; 36(5):e360501.

278. Choi YS, Park JA, Kim J, Rho SS, Park H, Kim YM, Kwon YG. Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF- κ B p65 and induces endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421(2):305-11.
279. Li W, Yin N, Tao W, Wang Q, Fan H, Wang Z. Berberine suppresses IL-33-induced inflammatory responses in mast cells by inactivating NF- κ B and p38 signaling. *Int Immunopharmacol* 2019; 66:82-90.
280. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov* 2020; 6:36.
281. Zhao T, Zhang Y, Mu S, Park JP, Bu H, Leng X, Wang S. Protective effects of genipin on ethanol-induced acute gastric injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Eur J Pharmacol* 2020; 867:172800.
282. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis* 2019; 10(2):128.
283. Fukui S, Fukui S, Van Bruggen S, Shi L, Sheehy CE, Chu L, Wagner DD. NLRP3 inflammasome activation in neutrophils directs early inflammatory response in murine peritonitis. *Sci Rep* 2022; 12(1):21313.
284. Heger LA, Schommer N, Van Bruggen S, Sheehy CE, Chan W, Wagner DD. Neutrophil NLRP3 promotes cardiac injury following acute myocardial infarction through IL-1 β production, VWF release and NET deposition in the myocardium. *Sci Rep* 2024; 14(1):14524.
285. Van Bruggen S, Jarrot PA, Thomas E, Sheehy CE, Silva CMS, Hsu AY, Cunin P, Nigrovic PA, Gomes ER, Luo HR, Waterman CM, Wagner DD. NLRP3 is essential for neutrophil polarization and chemotaxis in response to leukotriene B4 gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2023; 120(35):e2303814120.
286. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; 183(2):787-91.
287. Li PL, Fu HM, Liu K, Liu HF, Sui MZ, Yang JW. IL-33 facilitates endoplasmic reticulum stress and pyroptosis in LPS-stimulated ARDS model in vitro. *Mol Immunol* 2025; 181:102-112.
288. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6(1):128.
289. Wang C, Ruan J. Mechanistic Insights into Gasdermin Pore Formation and Regulation in Pyroptosis. *J Mol Biol* 2022; 434(4):167297.
290. Sunaga S, Tsunoda J, Teratani T, Mikami Y, Kanai T. Heterogeneity of ILC2s in the Intestine; Homeostasis and Pathology. *Front Immunol* 2022; 13:867351.
291. Srivastava RK, Sapra L, Bhardwaj A, Mishra PK, Verma B, Baig Z. Unravelling the immunobiology of innate lymphoid cells (ILCs): Implications in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2023;74:56-75.
292. Mathä L, Martinez-Gonzalez I, Steer CA, Takei F. The Fate of Activated Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol* 2021;12:671966.
293. Kobayashi T, Motomura Y, Moro K. The discovery of group 2 innate lymphoid cells has changed the concept of type 2 immune diseases. *Int Immunol* 2021;33(12):705-709.
294. Satoh-Takayama N, Kato T, Motomura Y, Kageyama T, Taguchi-Atarashi N, Kinoshita-Daitoku R, Kuroda E, Di Santo JP, Mimuro H, Moro K, Ohno H. Bacteria-Induced Group 2 Innate Lymphoid Cells in the Stomach Provide Immune Protection through Induction of IgA. *Immunity* 2020;52(4):635-649.e4.
295. Li R, Jiang XX, Zhang LF, Liu XM, Hu TZ, Xia XJ, Li M, Xu CX. Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Involved in Skewed Type 2 Immunity of Gastric Diseases Induced by *Helicobacter pylori* Infection. *Mediators Inflamm* 2017;2017:4927964.

296. Meyer AR, Engevik AC, Madorsky T, Belmont E, Stier MT, Norlander AE, Pilkinton MA, McDonnell WJ, Weis JA, Jang B, Mallal SA, Peebles RS Jr, Goldenring JR. Group 2 Innate Lymphoid Cells Coordinate Damage Response in the Stomach. *Gastroenterology* 2020;159(6):2077-2091.e8.
297. Uddin MJ, Leslie JL, Burgess SL, Oakland N, Thompson B, Abhyankar M, Revilla J, Frisbee A, Donlan AN, Kumar P, Petri WA Jr. The IL-33-ILC2 pathway protects from amebic colitis. *Mucosal Immunol* 2022; 15(1):165-175.
298. Yantiss RK. Eosinophils in the GI tract: how many is too many and what do they mean? *Mod Pathol* 2015;28 Suppl 1:S7-21.
299. Joo JY, Cho JM, Yoo IH, Yang HR. Eosinophilic gastroenteritis as a cause of non-*Helicobacter pylori*, non-gastrotoxic drug ulcers in children. *BMC Gastroenterol* 2020;20(1):280.
300. Abou Rached A, El Hajj W. Eosinophilic gastroenteritis: Approach to diagnosis and management. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2016; 7(4):513-523.
301. Zhang Y, Qi C, Li L, Hua S, Zheng F, Gong F, Fang M. CD8+ T cell/IL-33/ILC2 axis exacerbates the liver injury in Con A-induced hepatitis in T cell-transferred Rag2-deficient mice. *Inflamm Res* 2019;68(1):75-91.
302. Kanda A, Driss V, Hornez N, Abdallah M, Roumier T, Abboud G, Legrand F, Staumont-Sallé D, Quéant S, Bertout J, Fleury S, Rémy P, Papin JP, Julia V, Capron M, Dombrowicz D. Eosinophil-derived IFN-gamma induces airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the absence of lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(3):573-82, 582.e1-9.
303. Heidari M, Maleki Vareki S, Yaghobi R, Karimi MH. Microbiota activation and regulation of adaptive immunity. *Front Immunol* 2024;15:1429436.
304. Lauvau G, Boutet M, Williams TM, Chin SS, Chorro L. Memory CD8(+) T Cells: Innate-Like Sensors and Orchestrators of Protection. *Trends Immunol* 2016;37(6):375-385.
305. Koh CH, Lee S, Kwak M, Kim BS, Chung Y. CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential. *Exp Mol Med* 2023;55(11):2287-2299.
306. Koch MRA, Gong R, Friedrich V, Engelsberger V, Kretschmer L, Wanisch A, Jarosch S, Ralser A, Lugen B, Quante M, Vieth M, Vasapolli R, Schulz C, Buchholz VR, Busch DH, Mejías-Luque R, Gerhard M. CagA-specific Gastric CD8+ Tissue-Resident T Cells Control *Helicobacter pylori* During the Early Infection Phase. *Gastroenterology* 2023;164(4):550-566.
307. Kumar V. Cytotoxic T Cells: Kill, Memorize, and Mask to Maintain Immune Homeostasis. *Int J Mol Sci* 2025;26(18):8788.
308. Hargrave KE, MacLeod MKL, Worrell JC. Antigen presenting cells: Professionals, amateurs, and spectators in the 'long game' of lung immunity. *Int J Biochem Cell Biol* 2022;153:106331.
309. Zanna MY, Yasmin AR, Omar AR, Arshad SS, Mariatulqabtiah AR, Nur-Fazila SH, Mahiza MIN. Review of Dendritic Cells, Their Role in Clinical Immunology, and Distribution in Various Animal Species. *Int J Mol Sci* 2021;22(15):8044.
310. Ninomiya T, Matsui H, Akbar SM, Murakami H, Onji M. Localization and characterization of antigen-presenting dendritic cells in the gastric mucosa of murine and human autoimmune gastritis. *Eur J Clin Invest* 2000;30(4):350-8.
311. Bimczok D, Clements RH, Waites KB, Novak L, Eckhoff DE, Mannon PJ, Smith PD, Smythies LE. Human primary gastric dendritic cells induce a Th1 response to *H. pylori*. *Mucosal Immunol* 2010;3(3):260-9.
312. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, Anichini A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007;13(16):4677-85.

313. Guiney DG, Hasegawa P, Cole SP. *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. *Infect Immun* 2003;71(7):4163-6.
314. Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, Popescu F, Xiao Z. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 2006;211:81-92.
315. Yang Q, Li G, Zhu Y, Liu L, Chen E, Turnquist H, Zhang X, Finn OJ, Chen X, Lu B. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 2011;41(11):3351-60.
316. Li M, Lv R, Xu X, Ge Q, Lin S. *Tricholoma matsutake*-Derived Peptides Show Gastroprotective Effects against Ethanol-Induced Acute Gastric Injury. *J Agric Food Chem* 2021; 69(49):14985-14994.
317. Kumar P, Choudhary A, Kingler S, Jagtap YA, Prajapati VK, Chitkara D, Chinnathambi S, Verma RK, Mishra A. Autophagy as a potential therapeutic target in regulating improper cellular proliferation. *Front Pharmacol* 2025; 16:1579183.
318. Liu J, Guo M, Fan X. Ethanol induces necroptosis in gastric epithelial cells in vitro. *J Food Biochem* 2021; 45(4):e13692.
319. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, Abbas K, Moinuddin, Hassan MI, Habib S, Islam S. Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells* 2024; 13(22):1838.
320. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018; 25(3):486-541.
321. Shelite TR, Liang Y, Wang H, Mendell NL, Trent BJ, Sun J, Gong B, Xu G, Hu H, Bouyer DH, Soong L. IL-33-Dependent Endothelial Activation Contributes to Apoptosis and Renal Injury in *Orientia tsutsugamushi*-Infected Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(3):e0004467.
322. Akcay A, Nguyen Q, He Z, Turkmen K, Won Lee D, Hernando AA, Altmann C, Toker A, Pacic A, Ljubanovic DG, Jani A, Faubel S, Edelstein CL. IL-33 exacerbates acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(11):2057-67.
323. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J, Lee RT. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail* 2009; 2(6):684-91.
324. Gao Y, Luo CL, Li LL, Ye GH, Gao C, Wang HC, Huang WW, Wang T, Wang ZF, Ni H, Chen XP, Tao LY. IL-33 Provides Neuroprotection through Suppressing Apoptotic, Autophagic and NF- κ B-Mediated Inflammatory Pathways in a Rat Model of Recurrent Neonatal Seizure. *Front Mol Neurosci* 2017; 10:423.
325. Yuan Y, Wang X, Wang Y, Liu Y, Zhao L, Zhao L, Cai S. The Gastroprotective Effect of Walnut Peptides: Mechanisms and Impact on Ethanol-Induced Acute Gastric Mucosal Injury in Mice. *Nutrients* 2023; 15(23):4866.
326. Chen R, Kang R, Tang D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med* 2022; 54(2):91-102.
327. Pinci F, Gaidt MM, Jung C, Nagl D, Kuut G, Hornung V. Tumor necrosis factor is a necroptosis-associated alarmin. *Front Immunol* 2022; 13:1074440.
328. Tembhre MK, Sriwastva MK, Hote MP, Srivastava S, Solanki P, Imran S, Lakshmy R, Sharma A, Jaiswal K, Upadhyay AD. Interleukin-33 Induces Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation and Macrophage Necroptosis via Enhancing Oxidative Stress and Secretion of Proatherogenic Factors in Advanced Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel)* 2022; 11(12):2343.

329. Tran S, Fairlie WD, Lee EF. BECLIN1: Protein Structure, Function and Regulation. *Cells* 2021; 10(6):1522.
330. Wang Z, Wu L, Pan B, Chen Y, Zhang T, Tang N. Interleukin 33 mediates hepatocyte autophagy and innate immune response in the early phase of acetaminophen-induced acute liver injury. *Toxicology* 2021; 456:152788.
331. Liu S, Yao S, Yang H, Liu S, Wang Y. Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis* 2023; 14(10):648.
332. Zhang Z, Wang Q, Zhang H, Wang S, Ma X, Wang H. Golm1 facilitates the CaO₂-DOPC-DSPE200-PEI -CsPbBr₃ QDs -induced apoptotic death of hepatocytes through the stimulation of mitochondrial autophagy and mitochondrial reactive oxygen species production through interactions with P53/Beclin-1/Bcl-2. *Chem Biol Interact* 2024; 398:111076.
333. Zając A, Maciejczyk A, Sumorek-Wiadro J, Filipek K, Deryło K, Langner E, Pawelec J, Wasiak M, Ścibiorski M, Rzeski W, Tchorzewski M, Reichert M, Jakubowicz-Gil J. The Role of Bcl-2 and Beclin-1 Complex in "Switching" between Apoptosis and Autophagy in Human Glioma Cells upon LY294002 and Sorafenib Treatment. *Cells* 2023; 12(23):2670.
334. Prerna K, Dubey VK. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. *Int J Biol Macromol* 2022; 204:258-273.

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Ирфан Ђоровић, рођен је 4. новембра 1993. године у Тутину, Република Србија. Основно образовање завршио је у Основној школи „Рифат Бурџовић Тршо“ у Тутину, где је проглашен ђаком генерације, а средње образовање у Гимназији у Тутину, такође као ђак генерације. Образовање је наставио на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, који је уписао 2012. године. Дипломирао је 2018. године са просечном оценом 9,78, као студент генерације, и стекао звање доктора медицине. Након обавезног лекарског стажа, положио је стручни испит 2019. године. Исте године запослен је у Општој болници у Новом Пазару, на Одељењу интерне медицине. Специјализацију из интерне медицине започео је у новембру 2021. године. Докторске академске студије уписао је у октобру 2018. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у оквиру изборног подручја Имунологија, инфекција и инфламација, а усмени део докторског испита положио је у септембру 2023. године. Током студија био је ангажован као локални координатор за медицинску едукацију у оквиру Комитета за међународну сарадњу студената медицине Србије, као и као студент продекан на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Међународно искуство стекао је једномесечним боравком на Универзитету у Коимбри, у Португалу. За посебан допринос у борби против COVID-19 инфекције, Лекарска комора Србије доделила му је признање. Члан је Лекарске коморе Србије, Удружења гастроентеролога Србије, Удружења гастроентеролога Европе и Друштва имунолога Србије. Учесник је бројних националних и међународних научних скупова и аутор или коаутор више од 15 научних радова. Течно говори енглески језик.

1. **Ćorović I**, Ćorović Ličina E, Simović Marković B, Habibović S, Habibović A, Vučelj S, Ćeranić L. Co-infection of primary varicella and COVID-19: A case report. **Acta Facultatis Medicae Naisensis**. 2024; doi: 10.5937/afmnai41-43726. **M23 (IF2)**.
2. **Corovic IF**, Pantic JM, Stanisavljevic IA, Pavlovic SM, Jovicic NU, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Markovic BJS. T Helper and Cytotoxic T Cells Play an Important Role in Acute Gastric Injury. **Diseases**. 2025;13(11):374. doi: 10.3390/diseases13110374. **M22 (IF2)**.
3. Stanisavljevic I, Pavlovic S, Simovic Markovic B, Jurisevic M, Krajnovic T, Mijatovic S, Spasojevic M, Mitrovic S, **Corovic I**, Jovanovic I. Semaglutide decelerates the growth and progression of breast cancer by enhancing the acquired antitumor immunity. **Biomed Pharmacother**. 2024;181:117668. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117668. **M21a (IF2)**.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Улога осовине П-33/ST2 у имунопатогенези експерименталног акутног оштећења
желуца

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког
рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 08.01.2026. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:
Улога осовине IL-33/ST2 у имунопатогенези експерименталног акутног оштећења
желуца

истоветне.

У Крагујевцу, 08.01.2026. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ирфан Торовић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Улога осовине PL-33/ST2 у имунопатогенези експерименталног акутног оштећења желуца

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

1) Ауторство

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

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

У Крагујевцу, 08.01.2026. године,



потпис аутора

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