



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ
ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ**

ΕΥΔΟΞΙΑ ΣΙΝΤΟΥ-ΜΑΝΤΕΛΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΟΣ
Επιμελήτρια Α ΕΣΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2014



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ
ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ**

ΕΥΔΟΞΙΑ ΣΙΝΤΟΥ-ΜΑΝΤΕΛΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΟΣ
Επιμελήτρια Α ΕΣΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2014

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα»

Ν. 5343/32 άρθρο 202, παράγραφος 2

Ημερομηνία αίτησης της κ. Σίντου-Μαντέλα Ευδοξίας: 20-3-1995

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 284^α/27-6-1995

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη

Τσιάνος Επαμεινώνδας Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας

Μπάη Μαρία Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: αριθμ συνεδρ. 327^α/7-6-1997

Επιβλέπων

Μαλάμου-Μήτση Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη

Τσιάνος Επαμεινώνδας Καθηγητής Παθολογίας

Μπάη Μαρία Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 13-3-1996

«Συσχέτιση ογκογονιδίων και αντιογκογονιδίων σε καρκινώματα στομάχου».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 742^α/25-9-2012

1. Μπάη Μαρία Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μαλάμου-Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μπαλτογιάννης Γεώργιος Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Τσιάνος Επαμεινώνδας Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Μπατιστάτου Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Γούσια Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Μπαλή Χριστίνα Λέκτορα Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 6-5-2014

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Φωτόπουλος Ανδρέας

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής

Η Γραμματέας του Τμήματος

ΚΑΠΠΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ



Στους γονείς μου

Στο σύζυγό μου Αντώνη

και τα παιδιά μου Μαριάμ και Σωτήρη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς τη συμβολή σημαντικών ανθρώπων και συνεργατών, οι οποίοι με καθοδήγησαν και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Πάνω από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού-Κυτταρολογικού Εργαστηρίου Κα Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, τις εποικοδομητικές της συμβουλές, τη στήριξη και συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της διατριβής. Με την επιστημονική της γνώση, την ευρυμάθεια, την πλατύτητα σκέψης που τη διακρίνει υπήρξε για μένα ένα μοναδικό πρότυπο Ακαδημαϊκού Δασκάλου και Ανθρώπου. Θα συνεχίζει πάντα να με διδάσκει.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Κα Μαρία Μπάη, η οποία υπέδειξε το θέμα της διδακτορικής μου διατριβής και κατηύθυνε σημαντικά την ερευνητική μου προσπάθεια.

Επιπλέον, ευχαριστίες απευθύνω στον Καθηγητή Παθολογίας κ. Επαμεινώνδα Τσιάνο, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τη στήριξη αυτής μου της προσπάθειας.

Η ευγνωμοσύνη μου εκφράζεται και προς τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για τη συμμετοχή τους στη διαδικασία βελτίωσης και κρίσης της διατριβής. Θα ήθελα από καρδιάς να απευθύνω ευχαριστίες στη αγαπητή συνάδελφο και φίλη Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Κα Άννα Γούσια, για την αμέριστη συμπαράσταση, τον χρόνο που διέθεσε κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και για τις εποικοδομητικές της υποδείξεις. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της θα ήταν αδύνατη η διεκπεραίωση της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας Κο Παναγιώτη Καναβάρο για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και για τη στήριξη αυτής μου της προσπάθειας.

Επίσης ευχαριστώ την Παρασκευάστρια του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Κα Αντιγόνη Χριστοδούλου για τη σημαντική τεχνική της υποστήριξη.

Δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Γεώργιο Παπανικολάου που ανέλαβε την επιμέλεια και την άψογη εμφάνιση του κειμένου.

Αφήνω για το τέλος τους πιο σημαντικούς ανθρώπους για εμένα, τους γονείς μου Σωτήριο και Ματούλα, το σύζυγό μου Αντώνιο και τα αγαπημένα μου παιδιά Μαριάμ και Σωτήρη. Χωρίς την πολύτιμη και διαρκή συμπαράστασή τους, τη στήριξη και υπομονή τους δεν θα πετύχαινα τους στόχους μου. Τη διδακτορική μου διατριβή, την αφιερώνω σε αυτούς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γ Ε Ν Ι Κ Ο Μ Ε Ρ Ο Σ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ	7
2. ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ	7
2.1. Εντόπιση	7
2.2. Επιδημιολογία	8
2.3. Παράγοντες κινδύνου	8
2.3.1. Φυλή / εθνικότητα.....	8
2.3.2. Φύλο	8
2.3.3. Διατροφή.....	9
2.3.4. Κάπνισμα και αλκοόλ	9
2.3.5. Δράση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού	9
2.3.6. Γενετικοί παράγοντες	10
2.3.7. Πρόδρομες βλάβες του γαστρικού βλεννογόνου σχετιζόμενες με την καρκινογένεση	11
2.3.7.1. Γαστρίτιδα και εντερική μετάπλαση.....	11
2.3.7.2. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία	11
2.3.7.3. Αδενωματώδεις πολύποδες.....	12
2.4. Τύποι αδenoκαρκινώματος στομάχου	12
2.4.1. Μακροσκοπικοί τύποι.....	12
2.4.2. Ιστολογικοί τύποι.....	13
2.4.2.1. Ταξινόμηση κατά Lauren	13
2.4.2.2. Ταξινόμηση Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO).....	13
2.5. Βαθμός διαφοροποίησης (Grade) αδenoκαρκινώματος στομάχου	14
2.6. Επέκταση και σταδιοποίηση του αδenoκαρκινώματος στομάχου	15
2.7. Κυριότεροι προγνωστικοί παράγοντες του αδenoκαρκινώματος του στομάχου	17
2.7.1. Εντόπιση όγκου	17
2.7.2. Μέγεθος όγκου.....	17
2.7.3. Μακροσκοπικός τύπος του όγκου	17
2.7.4. Ιστολογικός τύπος.....	17
2.7.5. Βαθμός διαφοροποίησης (grade)	18
2.7.6. Βάθος διήθησης	18
2.7.7. Διήθηση αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων	18
2.7.8. Φλεγμονώδης αντίδραση του πρωτοπαθούς όγκου	19
2.7.9. Λεμφαδενικές μεταστάσεις	19
2.7.10. Απομακρυσμένες μεταστάσεις	19

3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΧΟΥ	19
3.1. Γενετική αστάθεια	21
3.2. Δραστικότητα τελομεράσης.....	21
3.3. Γονίδια.....	22
3.3.1. Ογκογονίδια	22
3.3.1.1. Γονίδιο c-erbB2.....	23
3.3.1.2. Γονίδια ras.....	24
3.3.1.3. Γονίδιο c-met	24
3.3.2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια	25
3.3.2.1. Γονίδιο P53.....	25
3.3.2.2. Γονίδιο APC.....	26
3.3.2.3. Γονίδιο Rb	26
3.4. Αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς τους	27
3.4.1. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας	28
3.4.2. Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα	28
3.4.3. Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας	28
3.4.4. Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού	29
3.4.4.1. ΠΛΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΛΑΣΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΦΑΣΗ S (SPF)	29
3.5. Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης.....	30
3.6. Ρυθμιστικά μόρια κυτταρικού κύκλου	31
3.6.1. Εισαγωγή	31
3.6.2. Κυκλίνες, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και αναστολείς τους	33
3.6.2.1. ΚΥΚΛΙΝΕΣ.....	33
3.6.2.2. ΚΥΚΛΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ	35
3.6.2.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	36
3.6.2.3.1. Πρωτεΐνη p21 ^{WAF1/CIP1}	38
3.6.2.3.2. Πρωτεΐνη p27 ^{KIP1}	38
3.6.2.3.3. Πρωτεΐνη p16 ^{INK4}	39
3.6.3. Άλλα ρυθμιστικά μόρια του κυτταρικού κύκλου	40
3.6.3.1. Πρωτεΐνη p53	40
3.6.3.2. Πρωτεΐνη pRb.....	41
3.6.3.3. Πρωτεΐνη Ki67	43
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	44
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45
1.1 Υλικό	46
1.2. Μέθοδοι.....	48
1.2.1. Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.....	49
1.2.3. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.	50

2.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb, p16, p27.	51
2.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας των κυκλινών και της πρωτεΐνης Ki67.	54
2.3. Προσδιορισμός των ανοσοϊστοχημικά θετικών περιπτώσεων ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν.	58
2.4. Συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.....	60
2.5. Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb, p16, p27, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και Ki67, της ηλικίας και του φύλου με την επιβίωση των ασθενών.	62
2.6. Συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ανά ζεύγη.	63
2.7. Συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, pRb, p16, p27 και κυκλίνης E.	66
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	74
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	75
SUMMARY.....	77
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το καρκίνωμα του στομάχου αποτελεί σημαντικό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως. Αν και η συχνότητα της νόσου έχει ελαττωθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες σε παγκόσμια κλίμακα, ο καρκίνος αυτός συνεχίζει να αποτελεί μια από τις συχνές αιτίες θανάτου.

Το φαινόμενο της καρκινογένεσης του στομάχου είναι μια πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία κατά την οποία ποικίλες γονιδιακές διαταραχές επισυμβαίνουν σε διαφορετικά στάδιά της. Οι γονιδιακές αυτές διαταραχές οφείλονται κυρίως σε μεταβολές της δομής ή/και της λειτουργίας διαφόρων ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αυξητικών παραγόντων, γονιδίων που συμβάλλουν στις κυτταρικές διασυνδέσεις και γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, τόσο στη διαδικασία της καρκινογένεσης όσο και στη διαδικασία της εξέλιξης και επέκτασης του καρκινώματος του στομάχου, φαίνεται να διαδραματίζουν τα γονίδια τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο.

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον πολλών μελετών έχει εστιαστεί αφενός μεν στη διερεύνηση των μηχανισμών που ελέγχουν τη μετάβαση ενός κυττάρου στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και αφετέρου στην αποσαφήνιση του ρόλου ειδικών πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, που ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε νεοπλασματικούς ιστούς. Σε ότι αφορά τα κακοήγη νεοπλάσματα, μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες, καλλιέργειες ιστών και σε πειραματόζωα εισηγούνται την παρουσία και βιολογική σημασία συγκεκριμένων ρυθμιστικών μορίων του κυτταρικού κύκλου, τα οποία περιλαμβάνουν γονίδια, όπως το *P53* και το *Rb*, κυκλίνες, κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Αναφορικά με το καρκίνωμα του στομάχου, τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα υποδηλώνουν τον καθοριστικό ρόλο των γονιδίων *P53* και *Rb* στη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλάσματος, ενώ οι πληροφορίες αναφορικά με τον ρόλο των άλλων ρυθμιστικών μορίων είναι αντιφατικές.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε συστηματική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης διαφόρων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου σε 130 περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων στομάχου. Τα ευρήματα συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και με την κλινική πορεία των ασθενών. Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθούν αφενός μεν περαιτέρω οι παθογενετικοί μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκονται οι πρωτεΐνες αυτές και αφετέρου η προγνωστική αξία της έκφρασής τους.

1. ANATOMIA – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ

Ο στόμαχος, το περισσότερο διατεταμένο τμήμα του πεπτικού σωλήνα, είναι ένας διευρυμένος ινομυώδης σάκος που συνδέει τον οισοφάγο με το λεπτό έντερο. Ο στόμαχος έχει τέσσερις ανατομικές περιοχές: την **καρδία**, τον **θόλο**, το **σώμα** και τον **πυλωρό**. Το τοίχωμά του αποτελείται από ομόκεντρους χιτώνες: τον **βλεννογόνο**, την **βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα**, τον **υποβλεννογόνο**, τον **μυϊκό** και τον **ορογόνο χιτώνα**. Η επιφάνεια του βλεννογόνου εμφανίζει ανώμαλες επιμήκεις αναδιπλώσεις γνωστές ως **πτυχές**. Μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο από επιφανειακά **βλεννοεκκριτικά κύτταρα** επενδύει την κοιλότητα του στομάχου. Το επιθήλιο αυτό καταδύεται στο χόριο σχηματίζοντας τα **γαστρικά βοθρία**, στα οποία εκβάλλουν επιμήκεις σωληνοειδείς **γαστρικοί αδένες**. Τα γαστρικά βοθρία και οι αδένες εξασφαλίζουν περίπου πάνω από 800 m² συνολικής επιφάνειας για έκκριση βλέννης, οξέος και πεπτικών ενζύμων. Οι διάφοροι τύποι αδένων έχουν την ίδια γενική δομή, με τοπικές όμως ιστολογικές διαφορές. Οι **καρδιακοί αδένες** στη μικρή περιοχή γύρω από το οισοφαγικό (καρδιακό) στόμιο, είναι βραχύτεροι, λιγότεροι αριθμητικά και καταλαμβάνουν λιγότερο από το 10% του βλεννογόνου. Στο σώμα και στο θόλο, οι **κύριοι γαστρικοί αδένες**, είναι μεγαλύτεροι και περισσότεροι και χαρακτηρίζουν το 75% περίπου του βλεννογόνου. Η περιοχή του πυλωρού κοντά στο δωδεκαδάκτυλο περιέχει μικρούς **πυλωρικούς αδένες** που αποτελούν το 15% περίπου του βλεννογόνου και ομοιάζουν με τους καρδιακούς αδένες.

2. ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ

Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο συχνότερος κακοήθης όγκος του στομάχου. Αποτελεί τον τέταρτο συχνότερο καρκίνο παγκοσμίως μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού και του παχέος εντέρου και τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο στον κόσμο μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Η χειρουργική αφαίρεση παραμένει η μόνη επιλογή με στόχο την ίαση, αν και ένα ικανό ποσοστό των ασθενών τη στιγμή της διάγνωσης έχει πλέον αρκετά προχωρημένη νόσο. Η πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια όσον αφορά στις επικουρικές θεραπείες, έχει βελτιώσει τα ποσοστά επιβίωσης στους ασθενείς. Ωστόσο, οι επικουρικές θεραπείες προσφέρουν μόνο παρηγορητική θεραπεία στους ασθενείς εκείνους που έχουν προχωρημένη νόσο.

2.1. Εντόπιση

Το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου αναπτύσσεται σε όλο το μήκος του στομάχου, από την καρδία έως τον πυλωρό και προσβάλλει κατά σειρά συχνότητας το άντρο και τον πυλωρό (47%), το σώμα (23%), την καρδιακή μοίρα (21%) και το θόλο (2%). Το έλασσον

τόξο προσβάλλεται περίπου στο 40% των περιπτώσεων και το μείζον τόξο στο 12% των περιπτώσεων.

2.2. Επιδημιολογία

Η επίπτωση του αδενοκαρκινώματος του στομάχου έχει μεγάλη γεωγραφική διακύμανση, με τη μεγαλύτερη επίπτωση στην Ιαπωνία, στην Κορέα, την Ανατολική Ευρώπη και σε ορισμένες περιοχές της Νοτίου Αμερικής και τη μικρότερη επίπτωση στη Βόρειο Αμερική και σε περιοχές της Αφρικής. Πάνω από το 70% των αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου εμφανίζονται σε αναπτυσσόμενες χώρες.

Παγκοσμίως διαγιγνώσκονται 870.000 νέες περιπτώσεις το χρόνο και σημειώνονται 650.000 θάνατοι ετησίως από τη νόσο. Η μέση ηλικία εμφάνισης του αδενοκαρκινώματος είναι τα 70 έτη στον άνδρα και τα 74 έτη στη γυναίκα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί μια σταθερή μείωση των ποσοστών επίπτωσης και θνησιμότητας του αδενοκαρκινώματος του στομάχου, αλλά ο απόλυτος αριθμός των νέων περιπτώσεων ανά έτος αυξάνεται, κυρίως εξαιτίας της αύξησης του μέσου όρου ηλικίας του πληθυσμού. Στις δυτικές χώρες, η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται από 8% έως 26%. Τα χαμηλά επίπεδα επιβίωσης οφείλονται τόσο στην καθυστερημένη διάγνωση, αφού η πλειονότητα των περιπτώσεων διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, όσο και στις συχνές τοπικές υποτροπές της νόσου.

2.3. Παράγοντες κινδύνου

2.3.1. Φυλή / εθνικότητα

Η φυλή έχει θεωρηθεί από πολλούς ερευνητές ως δυνητικός παράγοντας κινδύνου και το NCI (National Cancer Institute) έχει κατηγοριοποιήσει την καταγωγή ως προς την εθνικότητα σε τρεις ομάδες σχετικά με το βαθμό κινδύνου. Έτσι, οι Ιάπωνες, οι Κορεάτες, οι Βιετναμέζοι, οι γηγενείς Αμερικανοί και Χαβανέζοι αποτελούν την ομάδα υψηλού κινδύνου. Τα άτομα Λατινικής καταγωγής, οι Κινέζοι και η μαύρη φυλή αποτελούν την ομάδα μέσου κινδύνου, ενώ οι Φιλιππινέζοι και τα άτομα της λευκής φυλής ανήκουν στην ομάδα χαμηλού κινδύνου.

2.3.2. Φύλο

Το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου είναι συχνότερο στους άνδρες.

2.3.3. Διατροφή

Διάφοροι διατροφικοί παράγοντες έχουν βρεθεί να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος του στομάχου, όπως η διατροφή με παστές και καπνιστές τροφές καθώς και με τροφές υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι, νιτρικά και νιτρώδη άλατα. Αντίθετα, οι δίαιτες με φρούτα, λαχανικά και αντιοξειδωτικά, καθώς και οι βιταμίνες A και C και το ασβέστιο έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος.

2.3.4. Κάπνισμα και αλκοόλ

Το κάπνισμα φαίνεται να είναι παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου, ενώ ο ρόλος του αλκοόλ είναι λιγότερο σαφής.

2.3.5. Δράση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού

Ισχυρές ενδείξεις από ανεξάρτητες μελέτες συνδέουν τη λοίμωξη από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (ΕΠ) με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος του στομάχου. Σε ιστολογικό επίπεδο, το ΕΠ ενοχοποιείται για φαινοτυπικές αλλοιώσεις του γαστρικού βλεννογόνου, όπως φλεγμονή, ατροφία, εντερική μετάπλαση και δυσπλασία. Η γαστρίτιδα και η ατροφία μεταβάλλουν την έκκριση του γαστρικού υγρού, αυξάνουν το pH, αλλοιώνουν τη γαστρική χλωρίδα και επιτρέπουν σε αναερόβια μικρόβια να αποικίσουν το βλεννογόνο. Μέσω ενζύμων (εντερικών ρεντουκτασών) μετατρέπονται τα νιτρικά των τροφών σε νιτρίδια, ενεργά μόρια ικανά να αντιδρούν με αμίνες, παράγοντας καρκινογόνα σύμπλοκα νιτροζαμινών.

Όλα τα στελέχη του ελικοβακτηριδίου μπορεί να μην παίζουν τον ίδιο ρόλο στην ανάπτυξη της κακοήθειας. Στελέχη που περιέχουν μία ομάδα γονιδίων, η οποία καλείται “cag pathogenicity island”, προκαλούν σοβαρότερου βαθμού φλεγμονή. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την παραγωγή από τα επιθηλιακά κύτταρα της ιντερλευκίνης 8, μέσω ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NFκΒ). Έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από cag-θετικά στελέχη του ΕΠ και ανάπτυξης του αδενοκαρκινώματος. Το ΕΠ μπορεί επίσης να παράγει μια κυτταροτοξίνη, υπεύθυνη για την καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων και την καρκινογένεση^{1,2}. Επιπλέον, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός του επιθηλίου είναι υψηλότερος όταν υπάρχει λοίμωξη από το ΕΠ και μειώνεται σημαντικά μετά από την εξάλειψή της, υποστηρίζοντας τη μιτογόνο δράση του ΕΠ στο γαστρικό επιθήλιο. Τέλος, η αμμωνία, μια ουσία που διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, απελευθερώνεται σε αφθονία από τη δράση της ουρεάσης του ΕΠ στο γαστρικό επιθήλιο.

2.3.6. Γενετικοί παράγοντες

Το 10% των αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου θωρείται ότι κληρονομείται, ενώ το υπόλοιπο 90% εμφανίζεται σποραδικά. Μελέτες δείχνουν αυξανόμενο κίνδυνο σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του στομάχου.

Ο κληρονομικός καρκίνος του στομάχου ταξινομείται ως:

1. Κληρονομικό/οικογενές διαχύτου τύπου καρκίνωμα του στομάχου χαρακτηριζόμενο από μεταλλάξεις της πρωτεΐνης προσκόλλησης E-cadherin (CDH1).
2. Οικογενές καρκίνωμα εντερικού τύπου.
3. Λοιπά σύνδρομα κληρονομικού καρκινώματος: FAP, Li-Fraumeni, κληρονομικό καρκίνωμα παχέος εντέρου χωρίς πολυποδίαση (hereditary nonpolyposis colon cancer, HNPCC), κληρονομικό καρκίνωμα γονιδιακής γραμμής BRCA1/2, σύνδρομα Peutz-Jeghers και Cauden (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Σύνδρομα κληρονομικού καρκινώματος

Σύνδρομα κληρονομικού καρκινώματος		Γενετικές αλλοιώσεις
FAP	Οικογενής πολυποδίαση	APC
Li-Fraumeni		P53
HNPCC	Κληρονομικό καρκίνωμα χωρίς πολυποδίαση	MSI
Κληρονομικό καρκίνωμα		BRCA1/2
Peutz – Jeghers		
Cauden		

Στα σύνδρομα κληρονομικού καρκινώματος, εκτός από τις γενετικές αλλοιώσεις, καθοριστικό ρόλο παίζουν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες. Επίσης, οι γενετικές αλλαγές δεν χαρακτηρίζουν μόνο κληρονομικά καρκινώματα αλλά παρατηρούνται και σε σποραδικές περιπτώσεις. Οι γενετικές αυτές αλλαγές μπορεί να αφορούν: 1) ενεργοποίηση ογκογονιδίων και αυξητικών παραγόντων, 2) απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, επιδιορθωτικών γονιδίων και μορίων προσκόλλησης, και 3) αλλαγές γονιδίων ρυθμιστικών του κυτταρικού κύκλου. Οι αναφερόμενες αυτές γενετικές αλλαγές προκαλούνται από μεταλλάξεις γονιδίων, απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH), ενίσχυση / υπερέκφραση γονιδίων, υπερμεθυλίωση, μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), γενετικό πολυμορφισμό και ενεργοποίηση τελομεράσης.

Σημαντικοί γενετικοί παράγοντες εμπλεκόμενοι στο καρκίνωμα του στομάχου περιλαμβάνονται στον Πίνακα 2^{1,2,3,4}.

Πίνακας 2. Σημαντικοί γενετικοί παράγοντες.

APC (μεταλλάξεις)
TP53 (μεταλλάξεις)
P16 (απώλεια έκφρασης)
P21 ras (υπερέκφραση)
Απώλεια γονιδίου DCC
20 q
Bcl-2 (υπερέκφραση)
11P15 LOH
RB (απώλεια έκφρασης)
18 q
Φαινότυπο μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI Βλάβες επιδιορθωτικών) γονιδίων
Cyclin D1 (υπερέκφραση)
Αυξητικοί παράγοντες: EGFR, TGF, VEGF, C-MET, C-ERBB2 (υπερέκφραση)
Μόρια προσκόλλησης E-Cadherin (απώλεια έκφρασης)

2.3.7. Πρόδρομες βλάβες του γαστρικού βλεννογόνου σχετιζόμενες με την καρκινογένεση**2.3.7.1. Γαστρίτιδα και εντερική μετάπλαση**

Η χρόνια γαστρίτιδα, η γαστρική ατροφία και η εντερική μετάπλαση συνήθως προηγούνται του αδενοκαρκινώματος του στομάχου. Η αυτοάνοση γαστρίτιδα έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος.

2.3.7.2. Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία

Η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (δυσπλασία) αναπτύσσεται σε αμιγώς γαστρικό επιθήλιο ή σε γαστρικό επιθήλιο με εντερική μετάπλαση. Ιστολογικά, χαρακτηρίζεται από αρχιτεκτονικές και κυτταρολογικές αλλοιώσεις του επιθηλίου, όπως διαταραχή της κυτταρικής πολικότητας, αυξημένη κυτταροπλασματική αναλογία, πυρηνική στιβαδοποίηση και ποικίλου βαθμού μιτωτική δραστηριότητα. Ανάλογα με τη βαρύτητα των αρχιτεκτονικών και κυτταρολογικών αλλοιώσεων, η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία διακρίνεται σε χαμηλόβαθμη (low grade) και υψηλόβαθμη (high grade). Ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των περιπτώσεων

υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας αναφέρεται ότι δυνητικά θα εξελιχθεί σε διηθητικό καρκίνωμα.

2.3.7.3. Αδενωματώδεις πολύποδες

Πρόκειται για προβάλλουσες, περιγράπττες βλάβες αποτελούμενες από σωληνώδεις ή/και λαχνωτές επιθηλιακές δομές με δυσπλαστικές αλλοιώσεις των κυττάρων. Η συχνότητα κακοήθους εξαλλαγής εξαρτάται από το μέγεθος της βλάβης και το βαθμό επιθηλιακής δυσπλασίας. Κακοήθης εξαλλαγή έχει περιγραφεί σε ποσοστό 2% των αδενωματοδών πολυπόδων μεγαλύτερης διαμέτρου <2 εκ. και σε ποσοστό 40-50% των περιπτώσεων μεγαλύτερης διαμέτρου >2 εκ. Οι άμισχοι πολύποδες φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο κακοήθους εξαλλαγής.

2.4. Τύποι αδενοκαρκινώματος στομάχου

Το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου διακρίνεται σε **πρώιμο (αρχόμενο – early)** και σε **προχωρημένο**. Πρώιμο αδενοκαρκίνωμα θεωρείται το καρκίνωμα, το οποίο αναπτύσσεται στο βλεννογόνο ή και στον υποβλεννογόνο χιτώνα, ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες. Έχει εξαιρετική πρόγνωση και η πενταετής επιβίωση ανέρχεται σε ποσοστό 95%.

2.4.1. Μακροσκοπικοί τύποι

Οι μακροσκοπικοί τύποι του **πρώιμου αδενοκαρκινώματος του στομάχου** είναι οι ακόλουθοι:

- Τύπος I πολυποειδές
- Τύπος II επιφανειακό
- Τύπος IIα επηρμένο
- Τύπος IIβ επίπεδο
- Τύπος IIγ επιφανειακά εσκαμμένο
- Τύπος III εσκαμμένο

Οι μακροσκοπικοί τύποι του **προχωρημένου αδενοκαρκινώματος του στομάχου** είναι (ταξινόμηση κατά Borrmann):

- Τύπος I: πολυποειδές, προβάλλον ή μυκητοειδές που εμφανίζεται ως προβάλλουσα μάζα μέσα στον αυλό του στομάχου

- Τύπος II: ελκωτικό, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία κρατήρα στο τοίχωμα του στομάχου
- Τύπος III: ελκωτικό με διήθηση του τοιχώματος του στομάχου
- Τύπος IV: διηθητικό
- Τύπος V: αταξινόμητο

2.4.2. Ιστολογικοί τύποι

Υπάρχουν διάφορες ιστολογικές ταξινομήσεις των καρκινωμάτων του στομάχου, όπως των Ming⁵, Carniero και Goseki⁶, της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO) και η ταξινόμηση κατά Lauren, η οποία και χρησιμοποιείται συχνότερα.

2.4.2.1. Ταξινόμηση κατά Lauren

Τα αδενοκαρκινώματα του στομάχου ταξινομούνται σε ένα από τους δύο τύπους: εντερικό ή διάχυτο. Όγκοι αποτελούμενοι από εντερικού και διάχυτου τύπου καρκινώματα σε ίση αναλογία ταξινομούνται ως **μικτά καρκινώματα**. Τα πολύ αποδιαφοροποιημένα καρκινώματα εντάσσονται στην κατηγορία των «ακαθόριστων» καρκινωμάτων.

A. ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

Τα αδενοκαρκινώματα εντερικού τύπου σχηματίζουν αδενικές δομές και διακρίνονται σε καλά, μέτρια και φτωχά διαφοροποιημένα. Αναπτύσσονται συνήθως σε έδαφος εντερικής μετάπλασης.

B. ΔΙΑΧΥΤΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

Τα διαχύτου τύπου αδενοκαρκινώματα αποτελούνται από νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία διηθούν διάχυτα το γαστρικό τοίχωμα, αναπτυσσόμενα μεμονωμένα ή σχηματίζοντας μικρές αθροίσεις. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μικρού μεγέθους και περιέχουν ενδοκυττάρια βλέννη, η οποία απωθεί τον πυρήνα στην περιφέρεια του κυττάρου (κύτταρα δίκην «σφραγιστήρος δακτυλίου»). Μικρή ποσότητα βλέννης στο διάμεσο υπόστρωμα μπορεί να είναι παρούσα.

2.4.2.2. Ταξινόμηση Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO)

Το καρκίνωμα του στομάχου ταξινομείται σε: αδενοκαρκίνωμα καλής, μέσης και χαμηλής διαφοροποίησης με υποτύπους: σωληνώδες, θηλώδες, βλεννώδες, δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, αδιαφοροποίητο, μικροκυτταρικό και σε σπάνιους τύπους όπως αδενοπλακώδες, πλακώδες, μυελοειδές, ηπατοκυτταροειδές, εμβρυϊκό (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Ιστολογική ταξινόμηση γαστρικού καρκινώματος σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO (WHO histological classification of gastric tumours).

Epithelial tumours	
Intraepithelial neoplasia – Adenoma	8140/0
Carcinoma	
Adenocarcinoma	8140/3
Intestinal type	8144/3
Diffuse type	8145/3
Papillary adenocarcinoma	8260/3
Tubular adenocarcinoma	8211/3
Mucinous adenocarcinoma	8480/3
Signet-ring cell carcinoma	8490/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Squamous cell carcinoma	8070/3
Small cell carcinoma	8041/3
Undifferentiated carcinoma	8020/3
Others	
Carcinoid (well differentiated endocrine neoplasm)	8240/3

2.5. Βαθμός διαφοροποίησης (Grade) αδενοκαρκινώματος στομάχου

Ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας των αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου βασίζεται στην έκταση της αδενικής διαφοροποίησης και διακρίνεται σε:

- *Καλά διαφοροποιημένο (Grade 1) αδενοκαρκίνωμα:* >95% του όγκου αποτελείται από καλά σχηματισμένες αδενικές δομές.
- *Μέτρια διαφοροποιημένο (Grade 2) αδενοκαρκίνωμα:* 50% έως 95% του όγκου αποτελείται από αδενικές δομές.
- *Φτωχά διαφοροποιημένο (Grade 3) αδενοκαρκίνωμα:* ≤49% του όγκου αποτελείται από αδενικές δομές.

Τα σωληνώδη αδενοκαρκινώματα τυπικά δεν διαβαθμίζονται ιστολογικά, θεωρούνται καλά διαφοροποιημένοι όγκοι και αντιστοιχούν σε grade 1 καρκινώματα. Τα καρκινώματα τύπου σφραγιστήρος δακτυλίου (στα οποία >50% των κυττάρων έχουν χαρακτηρισ «σφραγιστήρος δακτυλίου») θεωρούνται καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας και ταξινομούνται ως grade 3. Τα μικροκυτταρικά και τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα ταξινομούνται ως grade 4. Τα πολύ σπάνια πλακώδη καρκινώματα ταξινομούνται ως καλά, μέτρια και φτωχά διαφοροποιημένα⁷.

2.6. Επέκταση και σταδιοποίηση του αδενοκαρκινώματος στομάχου

Το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου επεκτείνεται κατά συνέχεια ιστού σε γειτονικές ανατομικές δομές ή διασπείρεται περιτοναϊκά ή μεθίσταται σε απομακρυσμένα όργανα. Στη διατοιχωματική επέκταση στο δωδεκαδάκτυλο ή στον οισοφάγο σημασία έχει το βάθος της διήθησης. Οι όγκοι που διηθούν το δωδεκαδάκτυλο είναι συνήθως διαχύτου τύπου καρκινώματα, με πρώιμες λεμφαδενικές μεταστάσεις. Τα εντερικού τύπου καρκινώματα μεθίστανται αιματογενώς στο ήπαρ, ενώ τα διαχύτου τύπου καρκινώματα μεθίστανται κυρίως σε περιτοναϊκές επιφάνειες. Όταν το καρκίνωμα διηθεί τον ορογόνο χιτώνα, οι περιτοναϊκές εμφυτεύσεις είναι πολλαπλές. Η αμφοτερόπλευρη μαζική διήθηση των ωοθηκών (όγκος Krukenberg) μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαπεριτοναϊκής ή αιματογενούς διασποράς^{1,7}.

Η TNM σταδιοποίηση του καρκινώματος του στομάχου των American Joint Cancer Committee / Union Internationale Centre le Cancer (AJCC / UICC, 7^η έκδοση) είναι η ακόλουθη¹⁰:

T ορίζεται ο πρωτοπαθής όγκος:

pTis: ενδοεπιθηλιακός όγκος χωρίς διηθητική ανάπτυξη – Καρκίνωμα in situ

pT1: όγκος που διηθεί το χόριο, τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα ή και τον υποβλεννογόνο χιτώνα.

__**pT1a:** όγκος που διηθεί το χόριο ή και τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα

__**pT1b:** όγκος που διηθεί τον υποβλεννογόνο χιτώνα

pT2: όγκος που διηθεί το μυϊκό χιτώνα

pT3: όγκος που διηθεί τον υποορογόνο συνδετικό ιστό, όχι όμως το σπλαχνικό περιτόναιο ή γειτονικές δομές

pT4: όγκος που διηθεί τον ορογόνο (σπλαχνικό περιτόναιο) ή και γειτονικές δομές

__**pT4a:** όγκος που διηθεί τον ορογόνο (σπλαχνικό περιτόναιο)

__**pT4b:** όγκος που διηθεί γειτονικές δομές.

N περιγράφεται η κατάσταση των λεμφαδένων:

pN0: απουσία διήθησης επιχώριων λεμφαδένων

pN1: διήθηση 1 έως 2 περιγαστρικών λεμφαδένων

pN2: διήθηση 3 έως 6 περιγαστρικών λεμφαδένων

pN3: διήθηση περισσότερων των 6 περιγαστρικών λεμφαδένων

__**pN3a:** διήθηση 7 έως 15 περιγαστρικών λεμφαδένων

__**pN3b:** διήθηση 16 ή περισσότερων περιγαστρικών λεμφαδένων

M προσδιορίζονται οι απομακρυσμένες μεταστάσεις:

M0: απουσία μεταστάσεων

M1: παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (π.χ. ήπαρ).

Με βάση τα ανωτέρω, τα γαστρικά καρκινώματα ταξινομούνται σε τέσσερα στάδια (0 – IV) (Πίνακας 4)⁷.

Πίνακας 4. Στάδια γαστρικού καρκινώματος

Stage grouping			
Στάδιο 0	Tis	N0	M0
Στάδιο IA	T1	N0	M0
Στάδιο IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Στάδιο IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Στάδιο IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
Στάδιο IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Στάδιο IIIB	T4b	N0 ή N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Στάδιο IIIC	T4b	N2 ή N3	M0
	T4a	N3	M0
Στάδιο IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

2.7. Κυριότεροι προγνωστικοί παράγοντες του αδενοκαρκινώματος του στομάχου

2.7.1. Εντόπιση όγκου

Την καλύτερη πρόγνωση έχουν τα αδενοκαρκινώματα του άντρου⁸. Η πρόγνωση είναι επίσης καλή και για τα καρκινώματα του μέσου τριτημορίου του στομάχου, αλλά είναι σημαντικά χειρότερη για τα καρκινώματα που εντοπίζονται στο άνω τριτημόριο του στομάχου⁹⁻¹². Σε μελέτες πολυπαραγοντικής ανάλυσης, βρέθηκε ότι η εντόπιση του όγκου έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία και σχετίζεται με την επιβίωση^{9,10}. Σε άλλες μελέτες, η εντόπιση δε φαίνεται να επηρεάζει την επιβίωση^{13,14}.

2.7.2. Μέγεθος όγκου

Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας φαίνεται ότι υπάρχει ασυμφωνία των αποτελεσμάτων όσον αφορά τη συσχέτιση του μεγέθους του γαστρικού καρκινώματος με την πρόγνωση των ασθενών. Σε ορισμένες μελέτες με μονοπαραγοντική ανάλυση, βρέθηκε μια αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση του μεγέθους του όγκου με την επιβίωση^{9,10,12,14}, ενώ σε άλλες μελέτες δεν διαπιστώθηκε παρόμοια συσχέτιση¹⁵. Αντιφατικά είναι επίσης και τα αποτελέσματα μελετών πολυπαραγοντικής ανάλυσης^{9,10,12,14,16}. Πάντως, στον πρώιμο γαστρικό καρκίνο, η μεγαλύτερη των 5 εκ. διάμετρος του όγκου φαίνεται να αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα¹⁷.

2.7.3. Μακροσκοπικός τύπος του όγκου

Οι αρχικές προσπάθειες για την ανεύρεση προγνωστικών παραμέτρων στο καρκίνωμα του στομάχου βασίστηκαν στον μακροσκοπικό τύπο του όγκου (ταξινόμηση κατά Borrmann)¹⁸. Οι Hawley και συν.¹², βρήκαν ότι η ταξινόμηση κατά Borrmann δεν είχε καμία προγνωστική σημασία με εξαίρεση τον τύπο IV, στον οποίο δεν υπήρχαν ασθενείς με πενταετή επιβίωση. Στη συνέχεια και άλλοι συγγραφείς επιβεβαίωσαν αυτές τις παρατηρήσεις^{14,15}. Στη μελέτη των Baba και συν.¹³ διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με όγκους τύπου Borrmann III ή IV, είχαν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση από τους ασθενείς με όγκους τύπου Borrmann I ή II. Όμως, στην πολυπαραγοντική ανάλυση αυτής της μελέτης, ο μακροσκοπικός τύπος κατά Borrmann δεν βρέθηκε να έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία.

2.7.4. Ιστολογικός τύπος

Σε αρκετές μελέτες μονοπαραγοντικής ανάλυσης φαίνεται ότι οι ασθενείς με εντερικού τύπου αδενοκαρκινώματα έχουν σημαντικά καλύτερη πρόγνωση από εκείνους με διαχύτου τύπου νεοπλάσματα^{10,15,20,21}, ενώ σε άλλες μελέτες δεν διαφαίνονται παρόμοιες

συσχετίσεις^{14,22}. Στις μελέτες πολυπαραγοντικής ανάλυσης, η συσχέτιση του ιστολογικού τύπου με την επιβίωση έχει δώσει αντιφατικά αποτελέσματα^{10,15,20,23}.

2.7.5. Βαθμός διαφοροποίησης (grade)

Ο βαθμός διαφοροποίησης του αδενοκαρκινώματος του στομάχου δεν θεωρείται απόλυτα συνδεδεμένος με τη βιολογική του συμπεριφορά²⁴. Σε μερικές σειρές διαφαίνεται ότι ασθενείς με φτωχής διαφοροποίησης όγκους έχουν χειρότερη πρόγνωση^{10,25-27} μολονότι στην πολυπαραγοντική ανάλυση ο βαθμός διαφοροποίησης δεν αποδεικνύεται σημαντικής προγνωστικής αξίας¹⁰.

2.7.6. Βάθος διήθησης

Το βάθος της διήθησης αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό, ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα, δεδομένου ότι σχετίζεται απόλυτα με την πενταετή επιβίωση^{9,13,15,22}. Όσο αυξάνεται το βάθος διήθησης, τόσο μειώνεται η πενταετής επιβίωση (από 94% στους ασθενείς με πρώιμο γαστρικό καρκίνο σε 10% στους ασθενείς με διήθηση του ορογόνου και των γύρω ιστών)⁹. Οι διαφορές αυτές στην επιβίωση επιβεβαιώνονται από διάφορες μελέτες, στις οποίες διαπιστώθηκε εκτεταμένη διασπορά των καρκινικών κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα σε περιπτώσεις διήθησης και του ορογόνου χιτώνα¹³.

2.7.7. Διήθηση αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων

Τα αποτελέσματα σχετικά με την προγνωστική αξία της διήθησης αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων είναι αντιφατικά. Η διήθηση των αιμοφόρων αγγείων έχει σχετισθεί σημαντικά με την ανάπτυξη ηπατικών μεταστάσεων²⁸. Στη σειρά των Gabbert και συν²⁹ βρέθηκε ότι η διήθηση των αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων παρατηρείται συχνότερα σε όγκους μεγάλου μεγέθους, με μεγάλο βάθος τοιχωματικής διήθησης, χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης και λεμφαδενικές μεταστάσεις. Επιπλέον, η διήθηση των αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων έχει σχετισθεί με πτωχή πρόγνωση και στην πολυπαραγοντική ανάλυση αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα²⁹. Στην μελέτη των Baba και συν¹³, βρέθηκε ότι μόνο η διήθηση των λεμφικών και όχι των αιμοφόρων αγγείων σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Σε άλλες μελέτες όμως, δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της διήθησης των αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων με την πρόγνωση⁹.

2.7.8. Φλεγμονώδης αντίδραση του πρωτοπαθούς όγκου

Οι Davessar και συν²¹ βρήκαν ότι, οι ασθενείς των οποίων οι όγκοι χαρακτηρίζονταν από φλεγμονώδη αντίδραση στο νεοπλασματικό τους στρώμα είχαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης συγκριτικά με εκείνους τους ασθενείς των οποίων οι όγκοι δεν συνοδεύονταν από φλεγμονώδη αντίδραση. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η φλεγμονώδης αντίδραση παρατηρείται συχνότερα στα εντερικού τύπου αδενοκαρκινώματα^{21,30}. Η παρουσία μέτριας/έντονης ηωσινοφιλικής διήθησης και έντονης λεμφοκυτταρικής διήθησης του νεοπλασματικού στρώματος έχει συσχετισθεί με καλύτερη πρόγνωση³¹⁻³³. Στις μελέτες με πολυπαραγοντική ανάλυση, μόνον η έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα, επηρεάζοντας θετικά τη συνολική και την ελεύθερη νόσου επιβίωση³².

2.7.9. Λεμφαδενικές μεταστάσεις

Η διήθηση των λεμφαδένων θεωρείται ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας δεδομένου ότι έχει συσχετισθεί αρνητικά με την επιβίωση^{9,11,13,15,22,34}. Επιπλέον, ιδιαίτερης προγνωστικής αξίας θεωρούνται αφενός μεν ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων (τρεις ή περισσότεροι διηθημένοι λεμφαδένες) και αφετέρου η αναλογία του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων προς το συνολικό αριθμό των εξαιρεθέντων λεμφαδένων (lymph node ratio)^{10,35}.

2.7.10. Απομακρυσμένες μεταστάσεις

Η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων συμπεριλαμβανομένης και της περιτοναϊκής νεοπλασματικής διασποράς, αποτελεί την πιο σημαντική ανεξάρτητη προγνωστική παράμετρο^{9,13,22}. Η πενταετής επιβίωση ανέρχεται σε 3% και 63% στους ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις (M1) ή χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις (M0), αντίστοιχα⁹.

3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΧΟΥ

Κατά την τελευταία δεκαετία, με την αλματώδη πρόοδο της μοριακής βιολογίας, έχει περιγραφεί η γενετική βάση αρκετών νεοπλασματικών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Μελέτες του γαστρικού καρκίνου ανέδειξαν έναν σημαντικό αριθμό γενετικών αλλαγών, οι οποίες αφορούν διαταραχές στη δομή και λειτουργία πολλών γονιδίων, όπως ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αυξητικών παραγόντων, υποδοχέων αυξητικών

παραγόντων, γονιδίων που συμβάλλουν στις κυτταρικές διασυνδέσεις (γονίδια κυτταρικής προσκόλλησης) και γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο^{36,37} (Πίνακας 5). Οι γονιδιακές αυτές διαταραχές, σε συνδυασμό με τη γενετική αστάθεια, φαίνεται να εμπλέκονται τόσο στη διαδικασία της καρκινογένεσης του στομάχου όσο και στη διαφοροποίηση και εξέλιξη του γαστρικού καρκινώματος.

Πίνακας 5. Συχνότερες γενετικές διαταραχές στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου.

Γονίδια (μεταβολές)	Βαθμός διαφοροποίησης	
	Καλής (%)	Πτωχής (%)
Γενετική αστάθεια	33	18
Δραστικότητα τελομεράσης	100	90
K-ras (μετάλλαξη)	9	--
c-met (ενίσχυση)	19	19
K-sam (ενίσχυση)	--	33
c-erbB-2 (ενίσχυση)	20	--
bcl-2 (απώλεια ετεροζυγωτίας)	43	--
Cyclin E (ενίσχυση)	33	7
p53 (απώλεια ετεροζυγωτίας, μετάλλαξη)	60	76
APC (απώλεια ετεροζυγωτίας, μετάλλαξη)	40-60	--
DCC (απώλεια ετεροζυγωτίας)	50	--
E-cadherin (μετάλλαξη)	--	50
CD44 (μη φυσιολογικά μεταγράφα)	100	100
Απώλεια ετεροζυγωτίας του 1p	25	38
Απώλεια ετεροζυγωτίας του 1q	44	--
Απώλεια ετεροζυγωτίας του 7q	53	33

Οι διαφορετικοί ιστολογικοί τύποι του αδενοκαρκινώματος (εντερικός και διάχυτος τύπος) χαρακτηρίζονται μάλλον από διακριτές γενετικές διαταραχές, ωστόσο έχουν περιγραφεί και κοινά γενετικά γεγονότα. Αυτά περιλαμβάνουν τη γενετική αστάθεια, μεταλλάξεις του γονιδίου *P53*, την επανενεργοποίηση της τελομεράσης και την υπερέκφραση των μη φυσιολογικών μεταγράφων του γονιδίου *CD44*, που πιστεύεται ότι εμπλέκονται στα πρώιμα κυρίως στάδια της καρκινογένεσης του στομάχου. Αντίθετα, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων φαίνεται να ευνοούν την εξέλιξη

και τη διηθητική επέκταση του καρκινώματος. Για την ανάπτυξη των μεταστάσεων, πιστεύεται ότι επισυμβαίνουν επιπρόσθετες γενετικές μεταβολές.

3.1. Γενετική αστάθεια

Οι μεταλλάξεις σε αλληλουχίες που ανήκουν στο μικροδορυφόρο DNA (microsatellite sequences), οφείλονται σε σφάλματα αντιγραφής του DNA (replication errors, RER) και εκφράζουν τη γενετική αστάθεια (genetic instability). Μολονότι η συχνότητα της μικροδορυφορικής αστάθειας (microsatellite instability) στον καρκίνο του στομάχου διαφέρει σημαντικά εξαρτώμενη από τον αριθμό των μικροδορυφόρων θέσεων (microsatellite loci) που μελετώνται³⁸⁻⁴¹, αυτή ανέρχεται στο 30% περίπου των αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου. Οι Han και συν⁴⁰, ανίχνευσαν μικροδορυφορική αστάθεια σε ποσοστό 17% και 64% καλής και πτωχής διαφοροποίησης αντίστοιχα. Αντίθετα, οι Shemba και συν⁴², βρήκαν μικροδορυφορική αστάθεια σε ποσοστό 33% και 18% των καρκινωμάτων καλής και πτωχής διαφοροποίησης αντίστοιχα (Πίνακας 5). Σε άλλες μελέτες, η μικροδορυφορική αστάθεια δεν σχετίστηκε με τον ιστολογικό τύπο⁴³⁻⁴⁵.

Τα σφάλματα αντιγραφής σε πολλαπλές θέσεις – αλληλουχίες του μικροδορυφόρου DNA συχνά παρατηρούνται σε ασθενείς με πολλαπλούς πρωτοπαθείς όγκους, όπως νεοπλάσματα στομάχου και παχέος εντέρου ή νεοπλάσματα χοληδόχου κύστης και στομάχου⁴⁶. Τα ανωτέρω ευρήματα υποδηλώνουν ότι υπάρχει μια άλλη κατηγορία γονιδίων που συμμετέχει στην καρκινογένεση του στομάχου και είναι τα γονίδια τα σχετιζόμενα με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (mismatch-repair genes). Σε αυτά, περιλαμβάνονται τα γονίδια *HMSH3* και *HMLH1*, τα οποία εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 2 και 3 αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις των *HMSH3* και *HMLH1* γονιδίων είναι υπεύθυνες για τα σφάλματα αντιγραφής που συμβαίνουν στο γονιδίωμα (genome) και έχουν ως συνέπεια τη γενετική αστάθεια⁴⁷.

3.2. Δραστικότητα τελομεράσης

Τα τελομερή είναι ειδικές δομές που βρίσκονται στα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων. Αποτελούνται από πρωτεΐνες και από απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA με τη μορφή TTAGGG^{48,49}. Η τελομεράση είναι μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη η οποία εμποδίζει την προοδευτική ελάττωση του μήκους των χρωμοσωμάτων, αφού συνθέτει το DNA των τελομερών στα χρωμοσωμικά άκρα χρησιμοποιώντας ένα τμήμα του συστατικού του RNA στα πρότυπο (template)⁴⁹. Τα τελομερή προστατεύουν τα χρωμοσωμικά άκρα από φαινόμενα εκφυλισμού ή επιβλαβούς ανασυνδυασμού⁵⁰.

Η τελομεράση συνθέτει το DNA των τελομερών στα γαμετοκύτταρα και στα αθανατοποιημένα καρκινικά κύτταρα. Η δράση της καταστέλλεται στα φυσιολογικά σωματικά

κύτταρα. Η επανενεργοποίηση της τελομεράσης στα σωματικά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των τελομερών, με συνέπεια αυτά τα κύτταρα να αποκτούν την ιδιότητα της αθανασίας (immortal cells)⁵¹. Η παράταση του χρόνου ζωής των σωματικών κυττάρων επιτρέπει τη συσσώρευση βλαβών στο μόριο του DNA κατά τη διάρκεια των αλληπάλληλων κύκλων αντιγραφής, οδηγώντας σταδιακά σε καρκινικό μετασχηματισμό^{49,52,53}. Δραστικότητα τελομεράσης έχει ανιχνευθεί τόσο σε καρκινικές σειρές στομάχου όσο και σε ιστούς ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, στις πρωτοπαθείς και μεταστατικές εστίες⁵⁴. Δραστικότητα τελομεράσης δεν έχει περιγραφεί στον φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο. Ενδιαφέρον ήταν το εύρημα ανίχνευσης τελομεράσης σε περιπτώσεις εντερικής μετάπλασης και αδενωμάτων στομάχου (ποσοστά 23% και 50%, αντίστοιχα), γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η επανενεργοποίηση της τελομεράσης μπορεί να παρατηρηθεί από τα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης.

3.3. Γονίδια

Τα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης και εξέλιξης του γαστρικού καρκινώματος κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες:

1. *ογκογονίδια (oncogenes)*
2. *ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor-suppressor genes)*

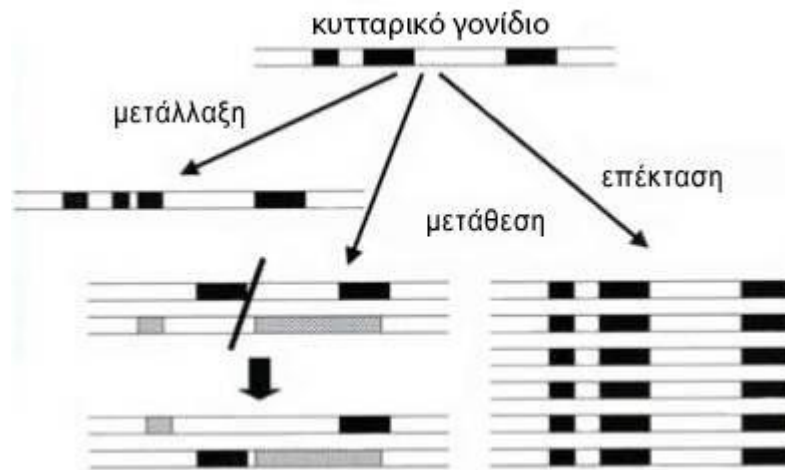
3.3.1. Ογκογονίδια

Στο φυσιολογικό γενετικό υλικό του κυττάρου υπάρχουν γονίδια, καλούμενα πρωτο-ογκογονίδια, που με αυστηρό μηχανισμό ελέγχουν τη φυσιολογική αύξηση, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Κύριος ρόλος τους είναι η μεταφορά σημάτων από το εξωτερικό περιβάλλον στον πυρήνα του κυττάρου.

Τα φυσιολογικά πρωτο-ογκογονίδια, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όπως π.χ. μετάλλαξη, απώλεια αλληλουχίας, ιογενή λοίμωξη, χρωμοσωμική μετάθεση, κ.ά., μετατρέπονται σε ογκογονίδια που δύνανται να επάγουν την καρκινογένεση.

Η ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια μπορεί να είναι:

- 1) *ποιοτική*: αλλαγές σε κωδικοποιημένες περιοχές (code regions) (σημειακές μεταλλάξεις – point mutations).
- 2) *ποσοτική*: γονιδιακή υπερέκφραση (gene amplification) λόγω: α) αύξηση του αριθμού των αντιγράφων ενός δεδομένου γονιδίου με συνέπεια την υπερέκφρασή του, β) χρωμοσωμικής μετάθεσης (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Τρόποι ενεργοποίησης ογκογονιδίων.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 100 περίπου ογκογονίδια, κυτταρικής και ιικής προέλευσης. Η δράση τους εκδηλώνεται μέσω κυτταρικών διαμεσολαβητικών μονοπατιών, με τα οποία τα κύτταρα λαμβάνουν και επεξεργάζονται πληροφορίες με αποτέλεσμα τη βιολογική απόκριση. Στα διαμεσολαβητικά μονοπάτια συμμετέχουν εξωγενή ερεθίσματα, υποδοχείς, μεταγραφικοί παράγοντες, ενδογενείς ενεργοποιητές, κ.τ.λ. Όπως έχει αναφερθεί, μεταβολές στη δομή και λειτουργία ποικίλων ογκογονιδίων πυροδοτούν την ανάπτυξη και την πρόοδο του γαστρικού καρκίνου. Βασικά ογκογονίδια αυτής της κατηγορίας είναι το *c-met*, το *c-erbB2* και το *ras*.

3.3.1.1. Γονίδιο *c-erbB2*

Το γονίδιο *c-erbB-2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17, στη θέση 21 (17q21) και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική φωσφογλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 185 kDa (p185). Η πρωτεΐνη αποτελείται από ένα ενδοκυττάριο τμήμα με δράση τυροσινικής κινάσης και ένα εξωκυττάριο τμήμα με ρόλο υποδοχέα αυξητικού παράγοντα. Η δομή της είναι παρόμοια με τη δομή του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF-R)⁵⁵.

Η συχνότητα των διαταραχών του γονιδίου (οι οποίες οφείλονται σχεδόν αποκλειστικά σε γονιδιακή ενίσχυση) ποικίλει στις διάφορες σειρές και κυμαίνεται από 10-55% των περιπτώσεων αδενοκαρκινωμάτων στομάχου⁵⁶⁻⁶¹. Υπερέκφραση της *c-erbB2* πρωτεΐνης έχει παρατηρηθεί συχνότερα στα εντερικού τύπου καρκινώματα και σχετίσθηκε θετικά με το μέγεθος του όγκου, το στάδιο και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων⁶²⁻⁶⁵. Τα αποτελέσματα μελετών της ανοσοϊστοχημικής πρωτεϊνικής έκφρασης σε σχέση με την πρόγνωση, είναι αντιφατικά. Σε ορισμένες σειρές η υπερέκφραση της

πρωτεΐνης σχετίζεται με καλή πρόγνωση^{59,66} ενώ σε άλλες με κακή πρόγνωση^{62,65,67}. Υπάρχουν όμως και μελέτες στις οποίες δεν τεκμηριώνεται η προγνωστική της αξία⁶⁸.

3.3.1.2. Γονίδια *ras*

Η οικογένεια των γονιδίων *ras* περιλαμβάνει τρία γονίδια: *H-ras*, *K-ras* και *N-ras*. Τα γονίδια *ras* κωδικοποιούν ομόλογες πρωτεΐνες με μοριακό βάρος περίπου 21 kDa (p21), οι οποίες εντοπίζονται στο εσωτερικό μέρος της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύονται με 5' διφωσφορική γουανοσίνη (GDP) και 5' τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) και έχουν δραστικότητα GTPασης⁶⁹. Έχει βρεθεί ότι οι *ras* πρωτεΐνες εμπλέκονται στην κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό καθώς και ότι λειτουργούν ως μεταδότες (transducers) σηματοδοτικών μηνυμάτων στον πυρήνα του κυττάρου⁷⁰⁻⁷².

Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των γονιδίων *ras* περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις (ιδιαίτερα στα κωδικόνια 12, 13 και 61) και ενίσχυση⁷³⁻⁷⁵. Στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου, η παρουσία μεταλλάξεων ή ενίσχυσης των γονιδίων έχει συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα απομακρυσμένων μεταστάσεων και με μικρή επιβίωση^{61,74,77}. Σε μια μεγάλη σειρά 171 περιπτώσεων καρκινωμάτων, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p21 βρέθηκε να σχετίζεται με εκτεταμένο βάθος διήθησης, λεμφαδενικές μεταστάσεις και με κακή πρόγνωση⁷⁸. Τα ευρήματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν όμως σε σειρές με μικρότερο αριθμό ασθενών⁷⁹. Υπερέκφραση των ογκοπρωτεϊνών παρατηρήθηκε σε δυσπλασίες, εντερική μετάπλαση και στο φυσιολογικό βλεννογόνο πλησίον καρκινικών βλαβών⁷⁹.

3.3.1.3. Γονίδιο *c-met*

Το γονίδιο *c-met* κωδικοποιεί τον υποδοχέα του ηπατοκυτταρικού αυξητικού παράγοντα (hepatocyte growth factor, HGF) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7q31^{80,81}. Απώλεια ετεροζυγωτίας του γονιδίου έχει παρατηρηθεί στο 50% των περιπτώσεων αδενοκαρκινωμάτων, στομάχου, καλής κυρίως διαφοροποίησης³⁶. Ενίσχυση του γονιδίου έχει διαπιστωθεί συχνότερα στα καρκινώματα προχωρημένων σταδίων και έχει συσχετισθεί με την πρόγνωση των ασθενών. Η πλειονότητα των γαστρικών καρκινωμάτων υπερεκφράζει δύο μεταγραφικά παράγωγα (transcripts) των 7.0 kb και 6.0 kb του γονιδίου *c-met*. Το μετάγραφο των 6.0 kb εκφράζεται σε κυτταρικές σειρές και σε ιστούς καρκινωμάτων, αλλά δεν εκφράζεται στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο⁸²⁻⁸⁴. Η έκφραση του μετάγραφου των 6.0 kb έχει σχετισθεί με το βάθος διήθησης, την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και το στάδιο.

3.3.2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

3.3.2.1. Γονίδιο P53

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *P53* εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17, στη θέση 13 (17p13) και κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 53 kDa, η οποία αποτελείται από 393 αμινοξέα. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης αυτής λειτουργεί ως ενεργοποιητής της γονιδιακής μεταγραφής. Το καρβοξυλικό τμήμα της πρωτεΐνης περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης (nuclear localization signals) και προάγει το σχηματισμό τετραμερών ολιγομερών σε διάλυμα. Το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης *P53* περιέχει θέσεις σύνδεσης με το DNA, οι οποίες αναγνωρίζουν ειδικές DNA αλληλουχίες. Μετά τη σύνδεση της πρωτεΐνης με το DNA, αυτή δρα ως θετικός ή αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφής άλλων γονιδίων.

Το φυσικό στέλεχος (wild type) του γονιδίου *P53* παίζει σημαντικό ρόλο (α) στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλοντας τη μετάβαση από την G1 στην S φάση, επί βλάβης του DNA, μέσω ενεργοποίησης των επαγόμενων γονιδίων *Waf-1/p21* και *Gadd-45*, (β) στην έναρξη της επιδιόρθωσης και στην αντιγραφή του DNA, (γ) στην επαγωγή της απόπτωσης κάτω από ορισμένες συνθήκες, όπως επί αδυναμίας επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA και (δ) στην προαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης^{85,86}.

Η αδρανοποίηση του γονιδίου *P53* αποτελεί τη συχνότερη γενετική μεταβολή στα κακοήθη νεοπλάσματα και μπορεί να οφείλεται: (α) σε μετάλλαξη (με ή χωρίς απώλεια του άλλου αλληλίου), (β) σε σταθεροποίηση του πρωτεϊνικού παραγώγου λόγω σύνδεσής του με πρωτεΐνες ιών, όπως την E1B του αδενοϊού, την E6 του HPV και του ιού SV-40, ή με κυτταρικές πρωτεΐνες όπως την πρωτεΐνη του γονιδίου *mdm-2*, που επάγεται από το φυσικό στέλεχος του *P53*⁸⁶. Οι μεταλλάξεις του *P53* στα περισσότερα κακοήθη νεοπλάσματα, παρατηρούνται συχνότερα στα εξόνια 5-8, στην πλειονότητά τους είναι μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations) και καταλήγουν στην παραγωγή τροποποιημένης πρωτεΐνης ως προς τη δομή και τη λειτουργία⁸⁷. Η τελευταία, όχι μόνο δεν διαθέτει ογκοκατασταλτική δράση, αλλά δρα ως κυρίαρχο ογκογονίδιο, εξαλείφοντας τη δράση της πρωτεΐνης του φυσικού p53 στελέχους^{86,87}. Η μεγαλύτερη δομική σταθερότητα της μεταλλαγμένης (mutant type) πρωτεΐνης p53 αυξάνει το χρόνο ημίσειας ζωής της με αποτέλεσμα την ανοσοϊσοχημική τους ανίχνευση⁸⁸.

Αν και η ευαισθησία της ανοσοϊστοχημικής ανάδειξης της πρωτεΐνης p53, ως δείκτη υποκείμενης μετάλλαξης είναι 80,% πρέπει πάντοτε να λαμβάνονται υπόψη οι μεθοδολογικοί παράγοντες για την ερμηνεία των παρατηρούμενων διαφορών στη συχνότητα ανίχνευσης μεταξύ των διαφόρων σειρών, καθώς και τα προαναφερθέντα λοιπά αίτια αδρανοποίησης ή σταθεροποίησης της πρωτεΐνης του φυσικού στελέχους^{86,87}.

Η πρωτεΐνη p53 ανιχνεύεται συχνότερα στα εντερικού τύπου κατά Lauren αδενοκαρκινώματα του στομάχου παρά στα διαχύτου τύπου⁸⁸⁻⁹⁰. Η έκφρασή της έχει συσχετισθεί με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων^{91,92}, και αγγειακής διήθησης^{89,91}. Τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών, σχετικά με την προγνωστική σημασία της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης P53 είναι αντιφατικά. Σε ορισμένες σειρές, οι γενετικές μεταβολές του P53 σχετίζονται με κακή πρόγνωση, επηρεάζοντας αρνητικά τη συνολική επιβίωση και αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη^{93,97}, σε άλλες σχετίζονται με κακή πρόγνωση αλλά μόνο στην μονοπαραγοντική ανάλυση^{92,95} ενώ σε άλλες σειρές δεν φαίνεται να σχετίζονται με την πρόγνωση^{89,90}.

3.3.2.2. Γονίδιο APC

Απώλεια της ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 5q όπου βρίσκεται το γονίδιο της αδενωματούδους πολυποδίασης του παχέος εντέρου (*Adenomatous Polyposis Coli, APC*) ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 60% των πρώιμων και των καλά διαφοροποιημένων αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου, αλλά δεν ανιχνεύθηκε στα πτωχής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα του στομάχου^{96,3}. Επίσης, μεταλλάξεις του γονιδίου APC έχουν περιγραφεί σε ποσοστό 30% των καρκινωμάτων του στομάχου από κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου⁹⁷. Το φάσμα των μεταλλάξεων του γονιδίου APC είναι διαφορετικό από εκείνο της οικογενούς αδενωματούδους πολυποδίασης του παχέος εντέρου και των σποραδικών καρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Έχει διατυπωθεί η άποψη, ότι στο καρκίνωμα του στομάχου το γονίδιο APC υφίσταται κυρίως μεταλλάξεις με λάθος νόημα, ενώ στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου το γονίδιο APC υφίσταται συχνά μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense mutation)⁹⁸.

Ορισμένες μελέτες εισηγούνται την παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου APC σε ποσοστό 42% των γαστρικών αδενωμάτων και σε ποσοστό 60% των περιπτώσεων εντερικής μετάπλασης⁹⁹. Επιπλέον, έχει περιγραφεί κοινή μετάλλαξη τόσο σε περιπτώσεις εντερικής μετάπλασης όσο και στο αδενοκαρκίνωμα, γεγονός το οποίο υποδηλώνει μια πιθανή κοινή κλωνική προέλευση των δύο αυτών αλλοιώσεων^{100,101}. Από τα δεδομένα που καταγράφονται στη βιβλιογραφία, πιθανολογείται ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου APC ενδέχεται να παίζουν κάποιο ρόλο από τα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης του στομάχου^{102,103}.

3.3.2.3. Γονίδιο Rb

Στην οικογένεια των γονιδίων Rb ανήκουν τα μέλη *pRb/p105*, *pRb2/p130*, *p107*, τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα 13q14.2, 16q12.2 και 20q11.2, αντίστοιχα. Το γονίδιο

pRB/p105 (επίσης γνωστό ως *Rb1* ή *Rb*) ονομάζεται και γονίδιο του ρετινοβλαστώματος, λόγω της ενοχοποίησής του για την ανάπτυξη του ρετινοβλαστώματος στον αμφιβληστροειδή χιτώνα παιδιών.

Μεταλλάξεις του *pRb/p105* έχουν περιγραφεί σε διάφορα κακοήθη νεοπλάσματα ως αποτέλεσμα ποικίλων μηχανισμών που δρουν άμεσα ή έμμεσα. Συγκεκριμένα, η αδρανοποίηση του γονιδίου *Rb* στα κακοήθη νεοπλάσματα μπορεί να οφείλεται εν μέρει σε σύνδεση του πρωτεϊνικού παραγώγου με πρωτεΐνες ιών όπως την E1A του αδενοϊού, των E7 του HPV και του T αντιγόνου του ιού SV-40 (Simian virus). Εκτός από τις μεταλλάξεις, άλλες γονιδιακές διαταραχές που έχουν περιγραφεί είναι η μεθυλίωση και η υπερφωσφορυλίωση.

Σε ό,τι αφορά το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου, υπάρχουν πληροφορίες έως τώρα μόνο για την εμπλοκή του *pRb/p105*, ενώ ο ρόλος των υπολοίπων μελών της *Rb* οικογένειας είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Ανοσοϊστοχημικές και μοριακές μελέτες του *pRb/p105* στα καρκινώματα του στομάχου έχουν δείξει αντιφατικά αποτελέσματα. Οι Songun και συν^{104,105,242} βρήκαν θετική συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης και της παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων. Άλλοι συγγραφείς έχουν περιγράψει μια σταδιακή ελάττωση της έκφρασης της πρωτεΐνης από το φυσιολογικό, μεταπλαστικό, δυσπλαστικό και καρκινωμάτωδες επιθήλιο²⁴². Οι Chen και συν^{106,241} διαπίστωσαν ελαττωμένα *pRb* mRNA επίπεδα στα αδενοκαρκινώματα συγκριτικά με εκείνα των φυσιολογικών γαστρικών ιστών. Αντίθετα, στη μελέτη του Lan και συν¹⁰⁷ βρέθηκαν αυξημένα *pRb* mRNA επίπεδα στα αδενοκαρκινώματα συγκριτικά με εκείνα που παρατηρήθηκαν σε ιστούς με γαστρίτιδα, εντερική μετάπλαση ή δυσπλασία. Ενδιαφέρον ήταν το εύρημα των υψηλότερων *pRb* mRNA επιπέδων σε ασθενείς με καρκίνωμα στομάχου και ταυτόχρονη λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (ΕΠ)^{229,243}. Έχει υποστηριχθεί, ότι η παρουσία των *CagA* και *HspB* πρωτεϊνών που παράγονται από το ΕΠ ευθύνεται για την υπερφωσφορυλίωση της *pRb/p105*.

3.4. Αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς τους

Πειραματικές και ερευνητικές μελέτες έχουν υποδείξει την εμπλοκή διαφόρων αυξητικών παραγόντων στην ανάπτυξη και εξέλιξη του αδενοκαρκινώματος του στομάχου καθώς επίσης έχουν περιγράψει την παρουσία ειδικών υποδοχέων τους στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Οι σημαντικότεροι αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς τους αναφέρονται στη συνέχεια.

3.4.1. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) είναι ένα πολυπεπίδιο, το οποίο διαμέσου του υποδοχέα του διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τόσο των φυσιολογικών όσο και των νεοπλασματικών κυττάρων¹⁰⁸. Σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες αδενοκαρκινωμάτων στομάχου με την εφαρμογή πολυκλωνικών αντισωμάτων, διαπιστώθηκε εστιακή έκφραση του EGF σε καρκινώματα πρώιμων σταδίων και εκτεταμένη έκφραση σε καρκινώματα προχωρημένων σταδίων¹⁰⁹⁻¹¹¹. Οι περισσότερες από τις θετικές περιπτώσεις αφορούσαν διαχύτου τύπου καρκινώματα. Η ανοσοϊστοχημική θετικότητα του EGF βρέθηκε να σχετίζεται με το βάθος διήθησης και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Επιπλέον, ασθενείς με EGF-θετικά νεοπλάσματα είχαν χειρότερη πρόγνωση¹¹². Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών υποδεικνύουν ότι η έκφραση EGF αποτελεί δείκτη επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς.

3.4.2. Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGFR) είναι μία 170kDa διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, που αποτελείται από τρία τμήματα (domains): (α) ένα γλυκοζυλιωμένο εξωκυττάριο τμήμα υπεύθυνο για τη σύνδεση με τον EGF, (β) ένα διαμεμβρανικό τμήμα και (γ) ένα ενδοκυττάριο τμήμα με δράση τυροσινικής κινάσης^{113,114}.

Υπερέκφραση του EGFR έχει παρατηρηθεί σε ποσοστό 30-46% των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων¹¹⁵⁻¹¹⁸. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης διαπιστώθηκαν συχνότερα στα προχωρημένου σταδίου καρκινώματα συγκριτικά με τα καρκινώματα αρχικών σταδίων (34,4% και 3,8% των περιπτώσεων, αντίστοιχα)¹¹⁹. Επιπλέον, η υπερέκφραση του EGFR σχετίστηκε με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και με κακή πρόγνωση των ασθενών¹²⁰. Σε διάφορες μελέτες, η ταυτόχρονη έκφραση EGFR και του EGF φαίνεται να αποτελεί παράγοντα επιθετικότερης συμπεριφοράς και να προδικάζει δυσμενέστερη επιβίωση¹²¹⁻¹²³. Πράγματι, σε μελέτες κλινικής παρακολούθησης τα ποσοστά της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με EGFR/EGF- θετικούς όγκους ήταν εξαιρετικά χαμηλά¹¹².

3.4.3. Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας

Ο Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας (Transforming Growth Factor, TGF) περιλαμβάνει δύο τάξεις πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων: TGFα και TGFβ. Ο TGFβ διακρίνεται σε τρεις υπότυπους, τους TGFβ₁, TGFβ₂, TGFβ₃. Ο TGFβ₁ εκφράζεται σε επιθηλιακά, ενδοθηλιακά και αιμοποιητικά κύτταρα καθώς και σε κύτταρα συνδετικού ιστού. Ο TGFβ₂ εκφράζεται σε επιθηλιακά και νευρικά κύτταρα, ενώ ο TGFβ₃ εκφράζεται κατ'

εξοχήν σε μεσεγχυματικά κύτταρα. Ο TGFb είναι μια πολυλειτουργική κυτοκίνη η οποία δρα μετά τη σύνδεσή της με κατάλληλους υποδοχείς. Οι υποδοχείς υποδιαιρούνται σε τρεις τύπους, τους I, II, II (TbRI, TbRII και TbRIII).

Έχει διαπιστωθεί, ότι στα αρχικά στάδια του καρκίνου ο TGFb έχει ογκοκατασταλτική λειτουργία, είτε μέσω αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είτε μέσω επαγωγής της κυτταρικής διαφοροποίησης και της απόπτωσης. Μελέτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές στομάχου, έχουν δείξει ότι ο TGFb παράγει την πρωτεΐνη RUNX₃, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί πρωτεΐνες της απόπτωσης (π.χ. πρωτεΐνη Bim). Ενδιαφέροντα είναι τα αποτελέσματα μελετών, τα οποία δείχνουν ότι η απώλεια της έκφρασης της RUNX₃ πρωτεΐνης στα αδενοκαρκινώματα του στομάχου προδικάζει αυξημένη συχνότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων και φτωχή πρόγνωση των ασθενών.

Στα προχωρημένα στάδια του καρκίνου, ο TGFb ευοδώνει τη διήθηση και την μετάσταση ενεργοποιώντας το μηχανισμό της αγγειογένεσης, προάγοντας την κινητικότητα του κυττάρου, αυξάνοντας την αλληλεπίδραση των νεοπλασματικών κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και αναστέλλοντας την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή οργανισμού. Σε ό,τι αφορά την εμπλοκή του TGFb στη διηθητική ικανότητα και στο μεταστατικό δυναμικό των νεοπλασματικών κυττάρων του στομάχου, έχει διαπιστωθεί ότι αυτή διαμεσολαβείται μέσω της SMAD3 πρωτεΐνης. *In vitro* και *in vivo* μελέτες εισηγούνται τον σημαντικό ρόλο της συνεργιστικής δράσης των ERK- και JNK- εξαρτώμενων σηματοδοτικών μονοπατιών στην εξέλιξη του γαστρικού καρκινώματος.

3.4.4. Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ο ρυθμός αύξησης ενός νεοπλάσματος καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. Ο ρυθμός αύξησης ενός νεοπλάσματος θεωρείται ότι σχετίζεται με την επιθετικότητα του νεοπλάσματος. Οι μέθοδοι προσδιορισμού του ρυθμού αύξησης ενός νεοπλάσματος περιλαμβάνουν: (α) τον προσδιορισμό του περιεχομένου στα καρκινικά κύτταρα DNA (DNA content) και του ποσοστού των καρκινικών κυττάρων που βρίσκεται στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου (S-phase fraction, SPF), και (β) την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση πυρηνικών αντιγόνων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως το PCNA και το Ki-67.

3.4.4.1. ΠΛΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΛΑΣΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΦΑΣΗ S (SPF)

Το περιεχόμενο του DNA στα κύτταρα μπορεί να εκτιμηθεί με: (α) την κυτταρομετρία ροής και (β) τη στατική κυτταρομετρία, όπως η ανάλυση εικόνας. Η κυτταρομετρία ροής

επιτυγχάνει τον προσδιορισμό του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα μέσω της μέτρησης του φθορισμού συνδεδεμένων χρωστικών.

Το κυτταρικό περιεχόμενο σε DNA αντιπροσωπεύει τον αριθμό των χρωμοσωμάτων και η πλοειδία καθορίζεται από τη σύγκριση της κατανομής του DNA στα καρκινικά κύτταρα με εκείνη των φυσιολογικών διπλοειδικών κυττάρων. Ο βαθμός απόκλισης από το φυσιολογικό περιεχόμενο σε DNA υπολογίζεται ως δείκτης του DNA (DNA-index, DI). Επιπλέον, η ανάλυση της κατανομής του DNA επιτυγχάνει τον υπολογισμό του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (S-phase fraction, SPF). Ωστόσο, υπάρχει δυσκολία στον προσδιορισμό του SPF στους ανευπλοειδικούς όγκους.

Η συχνότητα της ανευπλοειδίας στο καρκίνωμα του στομάχου κυμαίνεται από 40 έως 70% και αυξάνεται αναλογικά με το στάδιο της νόσου^{121,123,125}. Αnevπλοειδία έχει περιγραφεί συχνότερα στα προχωρημένα καρκινώματα (ποσοστό 53% των περιπτώσεων) και μόλις στο 3% των πρώιμων καρκινωμάτων¹²⁶. Αναφέρεται συσχέτιση της ανευπλοειδίας με το στάδιο της νόσου¹²¹ και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων¹²⁵⁻¹²⁹.

3.5. Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης

Η κυτταρική προσκόλληση είναι μια σημαντική διαδικασία, απαραίτητη για τη δημιουργία και διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής των ιστών καθώς και για την κυτταρική διαφοροποίηση. Στη νεοπλασία, όπου υπάρχει κατάργηση της ιστικής αρχιτεκτονικής και απορρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, διαπιστώθηκαν διαταραχές των αλληλεπιδράσεων τόσο των κυττάρων μεταξύ τους, όσο και των κυττάρων με το εξωκυττάριο στρώμα. Αποτέλεσμα αυτών των διαταραχών είναι η διάσπαση των φυσιολογικών ιστικών φραγμών και η διασπορά των καρκινικών κυττάρων, με επακόλουθα τη διήθηση και τη μετάσταση¹³⁰.

Στη διηθητική και μεταστατική επέκταση του καρκινώματος στομάχου, φαίνεται να συμβάλλουν δύο βασικά είδη μορίων της κυτταρικής προσκόλλησης (cell adhesion molecules), οι πρωτεΐνες CD44 και E-cadherin.

Η **CD44** αποτελεί μια μεγάλη οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης¹³¹⁻¹³⁵. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία ισομορφών (isoforms), οι οποίες προέρχονται από το εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing) του προαγγελιοφόρου mRNA (pre-mRNA). Οι ισομορφές της CD44 (CD44v) διαφέρουν από τη “standard” μορφή (CD44s), διότι περιέχουν σε διάφορους συνδυασμούς αλληλουχίες οι οποίες κωδικοποιούνται από ένα έως δέκα διαφορετικά εξόνια (CD44v1-10)^{124,135}. Τα μόρια αυτά κέντρισαν ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των ερευνητών, αφού διαπιστώθηκε ότι η έκφραση μιας συγκεκριμένης ισομορφής της CD44 ήταν διαφορετική σε μεταστατικές και σε μη μεταστατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές¹³⁶. Η

ενσωμάτωση (transfection) του c-DNA της συγκεκριμένης ισομορφής στο γενετικό υλικό των καρκινικών κυττάρων της μη μεταστατικής καρκινικής κυτταρικής σειράς ήταν ικανή να την μετατρέψει σε μεταστατική¹³⁶. Το γεγονός αυτό, οδήγησε στη υπόθεση ότι η CD44 μάλλον διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταστατική διαδικασία.

Στις διάφορες ανοσοϊστοχημικές μελέτες, δεν έχει περιγραφεί έκφραση της πρωτεΐνης CD44 στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο, σε αντίθεση με την ανίχνευση έκφρασης στο νεοπλασματικό ιστό¹³⁷⁻¹³⁹. Σε μεγάλες σειρές γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων, οι Mayer και συν¹³⁷ βρήκαν ότι η έκφραση της CD44 πρωτεΐνης σχετίζεται σημαντικά με την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Επιπλέον, σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε θεραπευτική γαστρεκτομή, η έκφραση της CD44 σχετίστηκε σημαντικά με την υποτροπή της νόσου και με πτωχή επιβίωση.

Η **E-cadherin** είναι μια ασβεστιο-εξαρτώμενη γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων, MB 120 kDa, η οποία μεσολαβεί σε ομοφιλικές διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και συνδέσεις. Έχει βρεθεί ότι η E-cadherin καταστέλλει τη διηθητική ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων *in vitro*, ενώ η απώλεια της έκφρασής της παίζει σημαντικό ρόλο στη διηθητική ανάπτυξη και το μεταστατικό δυναμικό των επιθηλιακών όγκων *in vivo*¹³⁹.

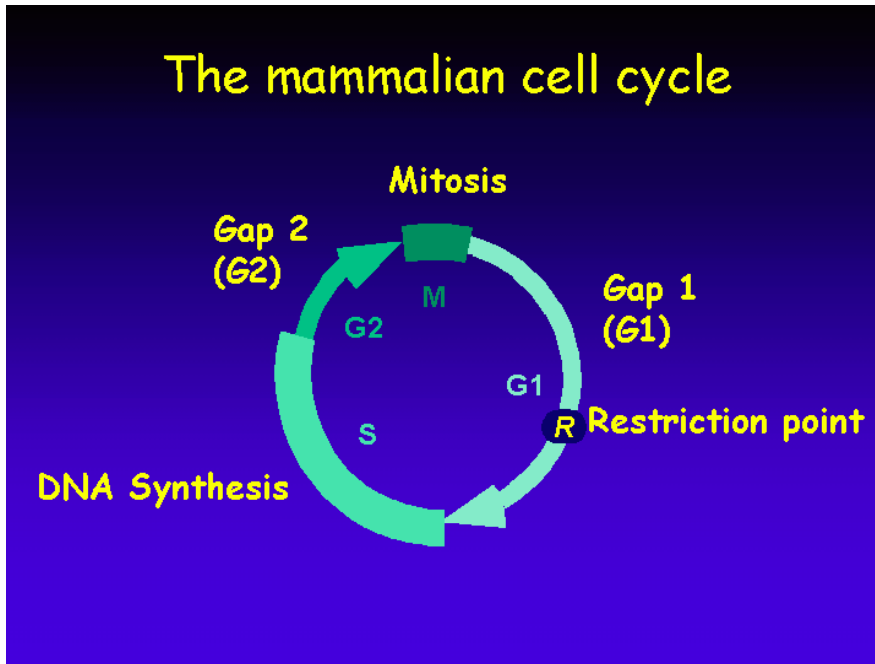
Στο φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο, η έκφραση της E-cadherin είναι έντονη και ομοιογενής, με μεμβρανική εντόπιση και ιδιαίτερη επίταση στην περιοχή των μεσοκυττάρων συνδέσεων^{140,141}. Στα αδενοκαρκινώματα, η έκφραση της E-cadherin μειώνεται αναλογικά με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου^{140,142,143}. Μειωμένη έκφραση ή απώλεια της έκφρασης της E-cadherin έχει παρατηρηθεί συχνότερα στα αδιαφοροποίητα ή στα διαχύτου τύπου καρκινώματα^{144,145}. Επίσης, η ελαττωμένη έκφραση της E-cadherin έχει περιγραφεί κυρίως σε όγκους μεγάλου μεγέθους, με εξωτοιχωματική διήθηση και με λεμφαδενικές ή περιτοναϊκές μεταστάσεις^{140-142,144}.

3.6. Ρυθμιστικά μόρια κυτταρικού κύκλου

3.6.1. Εισαγωγή

Προκειμένου να εξασφαλισθεί η ανάπτυξη του κυττάρου και του ιστού και κατ'επέκταση του οργανισμού καθώς και για να διατηρηθεί η ομοιόσταση, το κύτταρο αναπαράγει ένα πανομοιότυπο αντίγραφο του μέσω μιας διαδικασίας που καλείται κυτταρικός κύκλος.

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται φυσιολογικά από τέσσερις φάσεις (Σχήμα 2):



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

1. **Φάση G_1** (*gap 1, πρώτο χάσμα*): στη διάρκεια της φάσης αυτής, το κύτταρο υπόκειται σε πολύπλοκες βιοχημικές διαδικασίες που το προετοιμάζουν για την είσοδό του στην επόμενη φάση, εκείνη της σύνθεσης του θυγατρικού DNA.
2. **Φάση S** (*DNA synthesis, σύνθεση του DNA*): στη διάρκεια της φάσης αυτής, το DNA αντιγράφει με εξαιρετική ακρίβεια τον εαυτό του δημιουργώντας ένα πανομοιότυπο αντίγραφο του (θυγατρικό DNA).
3. **Φάση G_2** (*gap 2, δεύτερο χάσμα*): στη φάση αυτή, το κύτταρο προετοιμάζεται για την είσοδό του στην επόμενη φάση, εκείνη της μίτωσης.
4. **Φάση M** (*mitosis, μίτωση*): το διπλασιασμένο DNA, διαχωριζόμενο με ακρίβεια σε δύο ίσα μέρη, συμπυκνώνεται σχηματίζοντας χρωμοσώματα ώστε καθένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα να διαθέτει πλήρες αντίγραφο του γενετικού υλικού του μητρικού κυττάρου.

Πλην των τεσσάρων φάσεων που αναφέραμε, υπάρχει και η *φάση G_0* (*φάση ηρεμίας*) όπου το διαιρεμένο κύτταρο που προέκυψε από τη μίτωση που μόλις ολοκληρώθηκε, δύναται αντί της εισόδου του στη φάση G_1 που το προετοιμάζει για άμεση νέα διαίρεση, να εισέλθει σε άλλοτε άλλης διάρκειας φάση ηρεμίας ανάλογα με τις συνθήκες και τις ανάγκες του οργανισμού.

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από σημαντικά ρυθμιστικά μόρια: τις κυκλίνες, τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και τους αναστολείς τους.

3.6.2. Κυκλίνες, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και αναστολείς τους

Η ικανότητα ενός κυττάρου να πολλαπλασιάζεται και να δημιουργεί ακριβή αντίγραφα του αποτελεί μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, η οποία απαιτεί υψηλή «πιστότητα» για κάθε οργανισμό. Οι μοριακοί μηχανισμοί ελέγχου που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για αναδιπλασιασμό, χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ακρίβεια. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει εκδηλωθεί έντονο ενδιαφέρον για τη διερεύνηση αυτών των μηχανισμών, δεδομένου ότι διαταραχή στη ρύθμιση της κυτταρικής αναπαραγωγής μπορεί να οδηγήσει σε γενετική αστάθεια, η οποία ως γνωστόν προδιαθέτει σε νεοπλασματική εξαλλαγή.

Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες, καλλιέργειες ιστών και μελέτες σε πειραματόζωα προσδιόρισαν το ρόλο ποικίλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, απαραίτητων για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Αυτές οι πρωτεΐνες περιλαμβάνουν (α) τις κυκλίνες, (β) τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases, CDKs) και (γ) τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινάσων (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs).

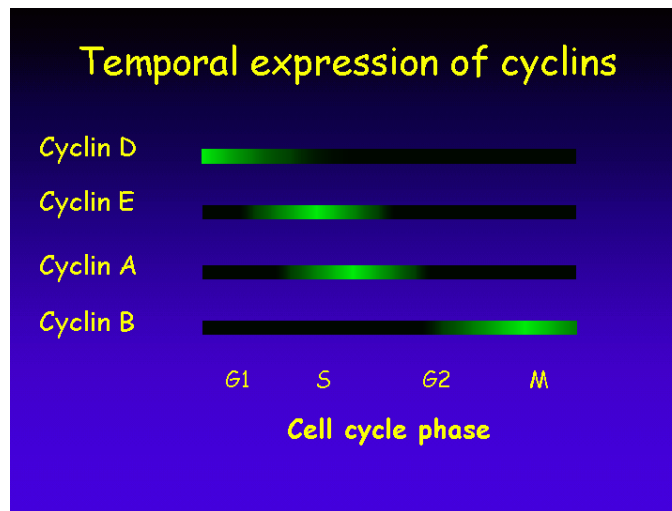
Οι κυκλίνες, οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και οι αναστολείς τους έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν σημαντικά την αύξηση, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και το θάνατο του κυττάρου. Οι διαταραχές τους, έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεση διαφόρων καρκινωμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκινώματος του στομάχου.

3.6.2.1. ΚΥΚΛΙΝΕΣ

Οι κυκλίνες είναι πρωτεΐνες που συντίθενται σε καθορισμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και αποδομούνται γρήγορα. Συνιστούν μια ετερογενή οικογένεια πρωτεϊνών που τα επίπεδά τους ποικίλουν περιοδικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η οικογένεια των κυκλινών περιλαμβάνει τις: κυκλίνες D (D1, D2, D3), την κυκλίνη E, τις κυκλίνες A (A1, A2) και την κυκλίνη B. Πρόσφατα, έχουν περιγραφεί και άλλες κυκλίνες, όπως οι κυκλίνες F, G και H.

Η ενεργοποίηση των κυκλινών έχει ως αποτέλεσμα την ποσοτική τους αύξηση κατά τις διάφορες χρονικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, στη φάση G₁ του κύκλου, έχουμε αρχικά την ενεργοποίηση και αύξηση των επιπέδων των κυκλινών της ομάδας D, και συγκεκριμένα της κυκλίνης D1, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της φάσης αυτής. Η ενεργοποίηση της κυκλίνης D3 τοποθετείται χρονικά αργότερα από της κυκλίνης D1 και της κυκλίνης D2. Ενεργοποίηση της κυκλίνης E παρατηρείται προς το τέλος της φάσης G₁. Η κυκλίνη E επιπλέον επάγει την αντιγραφή του DNA και το διπλασιασμό των κεντροσωμάτων. Οι κυκλίνες A (A1, A2) και B είναι γνωστές ως «μιτωτικές» κυκλίνες, λόγω των λειτουργικών τους ιδιοτήτων κατά τη φάση της μίτωσης. Οι κυκλίνες A πυροδοτούν την έναρξη της αντιγραφής του DNA και ενεργοποιούν μόρια, τα οποία διευκολύνουν τη δίοδο

του κυττάρου στη φάση της μίτωσης. Η κυκλίνη B είναι αυτή που πρωταγωνιστεί στο στάδιο της μίτωσης και ελέγχει τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G2 στη φάση M. Αυξημένα επίπεδα της κυκλίνης B κατά το τέλος της φάσης G2 οδηγούν στην ενεργοποίηση μιας ειδικής κινάσης που ευοδώνει την μετάβαση του κυττάρου στη φάση M. Κατά τη διάρκεια της φάσης M, διαμεσολαβούν ενεργοποιητικοί παράγοντες οι οποίοι μέσω της κινητοποίησης ενζύμων οδηγούν στην αποδόμηση των κυκλινών A και B και της εξόδου του κυττάρου από τη συγκεκριμένη φάση (**Σχήμα 3**).



Σχήμα 3. Έκφραση των κυκλινών στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Διαταραχές στα επίπεδα έκφρασης των κυκλινών D, E, A και B έχουν ενοχοποιηθεί σημαντικά στην ογκογένεση και στην εξέλιξη των διαφόρων καρκινωμάτων. Σε ότι αφορά το καρκίνωμα του στομάχου, υπερέκφραση της κυκλίνης D1 έχει παρατηρηθεί σε ποσοστό που ανέρχεται έως 50% περίπου των περιπτώσεων¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης, η οποία οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά σε γονιδιακή ενίσχυση, χαρακτηρίζει ως επί το πλείστον τα εντερικού τύπου καρκινώματα¹⁴⁷⁻¹⁴⁸. Τα αποτελέσματα μελετών σε ότι αφορά τις συσχετίσεις της υπερέκφρασης με προγνωστικές παθολογοανατομικές παραμέτρους, είναι αντιφατικά. Στις περισσότερες από τις μελέτες, δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις^{149,155}, ενώ σε άλλες περιγράφεται συσχέτιση της υπερέκφρασης με τον υψηλό βαθμό κακοηθείας και την πτωχή επιβίωση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα της σταδιακά αυξανόμενης έκφρασης της κυκλίνης D1 από το φυσιολογικό, μεταπλαστικό, δυσπλαστικό και καρκινωματώδες επιθήλιο, γεγονός που υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο της εν λόγω κυκλίνης από τα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης του στομάχου^{153,155}.

Υπερέκφραση της κυκλίνης D2 έχει βρεθεί σε ποσοστό 25% περίπου των αδενοκαρκινωμάτων στομάχου και έχει συσχετισθεί με την αγγειακή διήθηση, την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, το στάδιο της νόσου και με δυσμενή πρόγνωση^{150,151}.

Υπερέκφραση της κυκλίνης D3 έχει διαπιστωθεί σε ποσοστό 23% περίπου των αδενοκαρκινωμάτων στομάχου. Οι πληροφορίες για την προγνωστική της αξία είναι αρκετά περιορισμένες. Αξίζει να σημειωθεί, ότι έκφραση των κυκλινών D2 και D3 έχει περιγραφεί συχνότερα στις περιπτώσεις καρκινωμάτων με συνύπαρξη ΕΠ¹⁵²⁻¹⁵⁴.

Σε μεγάλο ποσοστό αδενοκαρκινωμάτων στομάχου (περίπου 40%) παρατηρήθηκε υπερέκφραση της κυκλίνης E. Οι περισσότερες περιπτώσεις υπερέκφρασης οφείλονται σε γονιδιακή ενίσχυση. Υπερέκφραση της κυκλίνης E βρέθηκε συχνότερα σε όγκους μεγάλου μεγέθους και εκτεταμένου βάθους διήθησης. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης φαίνεται να έχει προγνωστική αξία, δεδομένης της συσχέτισής της με τη φτωχή επιβίωση των ασθενών^{148,159}.

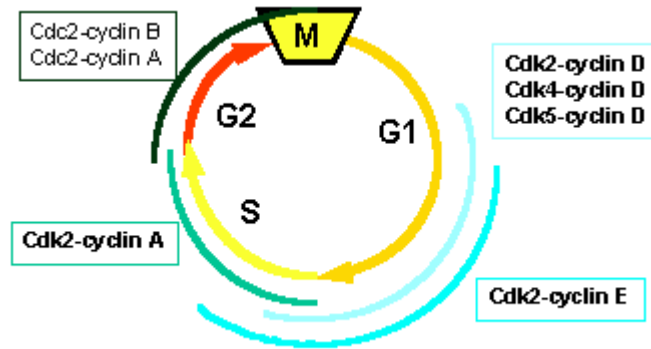
Από τις διάφορες μελέτες προκύπτει, ότι η έκφραση των κυκλινών A και B1 αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα στομάχου, δεδομένου ότι έχει συσχετισθεί με προχωρημένο στάδιο, λεμφαδενική προσβολή και μικρή επιβίωση^{149,156-159}.

3.6.2.2. ΚΥΚΛΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ

Η ενεργοποίηση των κυκλινών της ομάδας D στα αρχικά στάδια του κυτταρικού κύκλου, πυροδοτεί την ενεργοποίηση διαφόρων ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών ενζύμων, που ονομάζονται κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cyclin-dependent kinases, CDKs). Η ενεργοποίηση των CDKs πραγματοποιείται μέσω δομικών αλλαγών στο μόριό τους και επιτυγχάνεται κατόπιν της σύνδεσής τους με μια κυκλίνη, σχηματίζοντας έτσι συμπλέγματα κυκλινών/CDKs. Η δημιουργία αυτών των συμπλεγμάτων είναι απαραίτητα για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 13 CDKs που κωδικοποιούνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι ποικίλοι τύποι CDKs διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη δομή και τη λειτουργία.

Τα σημαντικότερα γνωστά ρυθμιστικά συμπλέγματα κυκλινών-CDKs που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου είναι το σύμπλεγμα κυκλίνη D1- CDK4, το οποίο ελέγχει την πρόοδο του κυττάρου στη φάση G₁, το σύμπλεγμα κυκλίνη E- CDK2, το οποίο καθορίζει την είσοδο του στη φάση S, το σύμπλεγμα κυκλίνη A- CDK2, το οποίο ρυθμίζει τη διέλευση του κυττάρου από τη φάση S και το σύμπλεγμα κυκλίνη B- CDK2 (ή CDK1), το οποίο ελέγχει την είσοδο στη φάση M (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Σχηματική παράσταση των μεταβολών των συμπλεγμάτων κυκλινών/CDKs κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Η δραστηριότητα των συμπλεγμάτων κυκλινών/CDKs ελέγχεται αφενός μεν από τα αυστηρώς ρυθμιζόμενα επίπεδα των κυκλινών και αφετέρου από τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Είναι κατανοητό, ότι διαταραχή οποιουδήποτε από αυτά τα ρυθμιστικά μόρια έχει σημαντικές επιπτώσεις στον κυτταρικό κύκλο και στην κυτταρική διαίρεση με αποτέλεσμα την απορρύθμιση που μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε ογκογένεση.

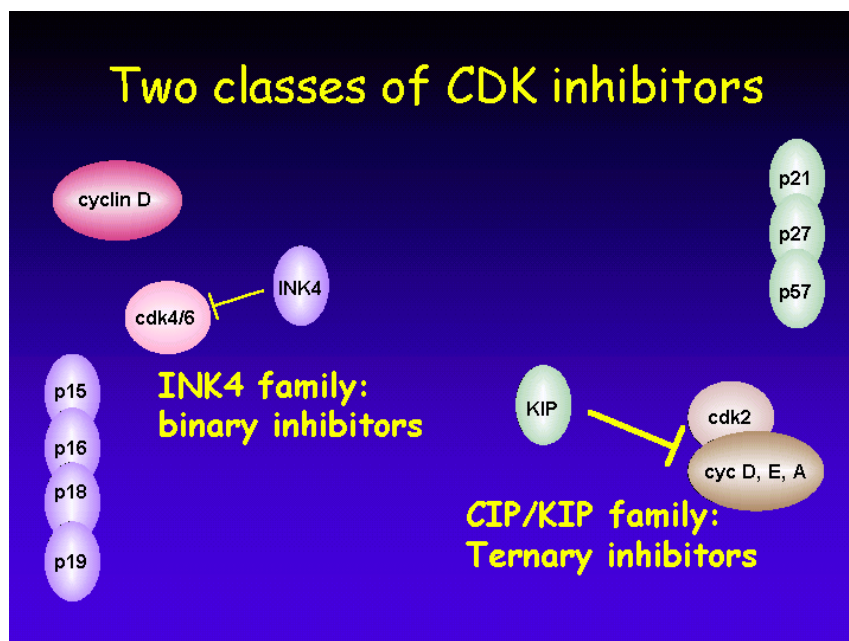
Εκτός από το ρόλο των CDKs στον κυτταρικό κύκλο, τα τελευταία χρόνια αναγνωρίστηκε η σημασία τους και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η απόπτωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και η μεταγραφή.

Από τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών προκύπτει ότι, ενίσχυση των γονιδίων CDKs και υπερέκφραση των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών τους παρατηρείται συχνά σε ποικίλα κακοήγη νεοπλάσματα^{146,159}. Το πλέον καλύτερα μελετημένο μόριο των CDKs είναι το CDK4. Ενίσχυση ή/και υπερέκφραση της CDK4 έχει συσχετισθεί με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καρκινώματα μαστού και παχέος εντέρου¹⁴⁶. Λίγα είναι γνωστά όσον αφορά το ρόλο της CDK4 στο καρκίνωμα του στομάχου. Από τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει ότι η υπερέκφραση της CDK4 φαίνεται να έχει προγνωστική αξία, καθώς βρέθηκε να προδικάζει χειρότερη πρόγνωση των ασθενών με καρκίνωμα στομάχου¹⁴⁶. Η συνδυασμένη υπερέκφραση των CDK4 και κυκλίνης D1 φαίνεται να επιβαρύνει ακόμη περισσότερο την πρόγνωση^{146,191}.

3.6.2.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η δραστηριότητα των συμπλεγμάτων κυκλίνης / CDK ελέγχεται σημαντικά από μία κατηγορία ανασταλτικών πρωτεϊνών, τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs). Έως σήμερα έχουν αναγνωρισθεί δύο οικογένειες CDKIs, η CIP/KIP και η INK4 (Σχήμα 4). Η οικογένεια

CIP/KIP περιλαμβάνει τις $p21^{WAF1/CIP1}$, $p27^{KIP1}$ και $p57^{KIP2}$ πρωτεΐνες ενώ η INK4 οικογένεια περιλαμβάνει τις $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ και $p19^{INK4d}$ πρωτεΐνες.



Σχήμα 4. Αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclindependent kinase inhibitors, CDKIs).

Η CIP/KIP οικογένεια έχει την ιδιότητα να δεσμεύει συμπλέγματα κυκλινών/CDKs που ελέγχουν τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G_1 στην φάση S, ενώ η δεύτερη αναστέλλει εκλεκτικά τη δημιουργία συμπλεγμάτων των κυκλινών D, και ειδικότερα της κυκλίνης D1, με τις κινάσες CDK4 και CDK6¹⁶⁰. Αν και τα μέλη της οικογένειας CIP/KIP δεσμεύουν συμπλέγματα των κυκλινών D, E και A με τις αντίστοιχες CDKs, θεωρείται ότι ο κύριος στόχος αυτής της ομάδας CDKIs είναι το σύμπλεγμα κυκλίνη E-CDK2¹⁶¹. Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες και των δύο οικογενειών, μέσω αυστηρού ελέγχου των επιπέδων τους, συμβάλλουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αδρανοποιώντας τα συμπλέγματα κυκλινών-CDKs, και παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την ανεξέλεγκτη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb και την απελευθέρωση των μεταγραφικών παραγόντων E2F. Είναι γνωστό ότι, η ανεξέλεγκτη φωσφορυλίωση της pRb και η επακόλουθη απελευθέρωση μεταγραφικών παραγόντων οδηγεί στην απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στο ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου.

Από τα μέλη των CDKIs οικογενειών, εκείνα που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι οι $p21^{WAF1/CIP1}$, $p27^{KIP1}$ και $p16^{INK4a}$ πρωτεΐνες.

3.6.2.3.1. Πρωτεΐνη $p21^{WAF1/CIP1}$

Η $p21^{WAF1/CIP1}$ δεσμεύει και αναστέλλει τη δράση των συμπλεγμάτων κυκλίνη D1-CDK4, κυκλίνη E-CDK2, κυκλίνη A-CDK2 καθώς και κυκλίνη B-CDK2. Αποτελεί λοιπόν έναν καθολικό αναστολέα των CDKs¹⁶². Έχει βρεθεί, ότι τα συμπλέγματα κυκλινών/CDKs που περιέχουν ένα μόριο $p21^{WAF1/CIP1}$ είναι ενεργά, ενώ αυτά που περιέχουν πολλαπλά μόρια καθίστανται ανενεργά, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία της στοιχειομετρίας της $p21^{WAF1/CIP1}$ πρωτεΐνης για τη δράση της¹⁶³.

Μεταλλάξεις του γονιδίου $p21^{WAF1/CIP1}$, αν και έχουν αναφερθεί, δεν είναι τόσο συχνές. Ο κύριος μηχανισμός ρύθμισης του $p21^{WAF1/CIP1}$ φαίνεται να είναι σε επίπεδο μεταγραφής. Η μεταγραφή του $p21^{WAF1/CIP1}$ ελέγχεται από την πρωτεΐνη p53, αν και περιγράφεται ότι λειτουργεί και ανεξάρτητος της p53 μηχανισμός επαγωγής της πρωτεΐνης $p21^{WAF1/CIP1}$. Έχει ήδη αναφερθεί, ότι σε περίπτωση βλάβης του DNA η φυσιολογική p53 επάγει την έκφραση της $p21^{WAF1/CIP1}$ με συνέπεια την αναστολή της δράσης των CDKs, παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης της pRb και της επακόλουθης απελευθέρωσης των E2F μεταγραφικών παραγόντων. Ως τελικό αποτέλεσμα, το κύτταρο είτε παραμένει στη φάση G₁ προκειμένου να επιτραπεί η επιδιόρθωση της βλάβης του DNA ή οδηγείται σε απόπτωση⁷⁶.

Πειραματικές μελέτες εισηγούνται την ογκοκατασταλτική δράση του γονιδίου $p21^{WAF1/CIP1}$. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από το εύρημα της χαμηλής έκφρασης ή της απώλειας της έκφρασης της πρωτεΐνης $p21^{WAF1/CIP1}$ στους νεοπλασματικούς ιστούς. Τα αποτελέσματα μελετών σε ποικίλα νεοπλάσματα, συμπεριλαμβανομένου και του αδενοκαρκινώματος στομάχου αναδεικνύουν συσχετίσεις μεταξύ της χαμηλής ή της απώλειας της έκφρασης της πρωτεΐνης $p21^{WAF1/CIP1}$ με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες, όπως προχωρημένο στάδιο, λεμφαδενικές μεταστάσεις, μικρή επιβίωση^{164,165}.

Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα μελετών τα οποία υποδεικνύουν την υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης ως δυσμενή προγνωστικό παράγοντα¹⁶⁶. Το εύρημα αυτό οδηγεί στην άποψη, ότι το γονίδιο $p21^{WAF1/CIP1}$ ενδέχεται να έχει και ογκογόνο δράση. Η απώλεια της ογκοκατασταλτικής του λειτουργίας, πιθανώς λόγω των συνυπαρχουσών διαταραχών του P53 γονιδίου, θα μπορούσε να αποτελέσει μια εξήγηση για το φαινόμενο αυτό.

3.6.2.3.2. Πρωτεΐνη $p27^{KIP1}$

Η $p27^{KIP1}$ πρωτεΐνη εμφανίζει σημαντικού βαθμού ομοιότητα αλληλουχίας με την $p21^{WAF1/CIP1}$. Η πρωτεΐνη αυτή αναστέλλει την ενζυμική δραστηριότητα των συμπλεγμάτων κυκλίνη E-CDK2 και κυκλίνη A-CDK2 με αποτέλεσμα την παραμονή των κυττάρων στη φάση G₁. Επιπρόσθετα, η $p27^{KIP1}$ μπορεί να δεσμεύει το σύμπλεγμα κυκλίνη-D1-CDK4 χωρίς όμως να το αδρανοποιεί. Όπως αναφέρθηκε και για την $p21^{WAF1/CIP1}$, η στοιχειομετρία της $p27^{KIP1}$ καθορίζει σημαντικά, εάν η πρωτεΐνη αυτή θα δράσει ως αναστολέας ή όχι. Η $p27^{KIP1}$ δεν

αναστέλλει απλά τα συμπλέγματα κυκλινών-CDKs αλλά επιπλέον παρεμποδίζει και την ενεργοποίησή τους, μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση των CDKs και συγκεκριμένα της CDK2, στη θέση Thr160^{167,168}. Επίσης, η p27^{KIP1} θεωρείται ότι πιθανώς να συμμετέχει και σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου, όπως η απόπτωση και η διαφοροποίηση, αλλά και σε μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα μερικών νεοπλασμάτων σε θεραπευτικά σχήματα.

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη p27^{KIP1} αποτελεί βασικό στόχο της ενεργοποίησης των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, όπως είναι οι EGFRs, οι οποίοι προκαλούν ελάττωση των επιπέδων της p27^{KIP1} μέσω επαγωγής της αποδόμησής της αλλά και μέσω μετακίνησης αυτής από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα^{169,170}.

Τα αποτελέσματα διάφορων μελετών εισηγούνται ότι κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης η έκφραση της p27^{KIP1} πρωτεΐνης ελαττώνεται, γεγονός που οφείλεται σε απενεργοποιητικούς μηχανισμούς^{171,172}. Η απενεργοποίηση της p27^{KIP1} επιτελείται κυρίως με πρωτεόλυση από το σύστημα ουβικιτίνης στον πυρήνα του κυττάρου. Επίσης έχει διαπιστωθεί, ότι το σύμπλεγμα κυκλίνης E-CDK2 επάγει ακόμη περισσότερο την πρωτεόλυση της p27^{KIP1} μέσω φωσφορυλίωσης¹⁷³. Εναλλακτικά, η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών hKIS και PKB/Akt είναι δυνατόν να οδηγήσει σε φωσφορυλίωση της p27^{KIP1} και εν συνεχεία στην μετακίνησή της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα τη λειτουργική της αδρανοποίηση¹⁷⁴.

Σε ιστικό επίπεδο, η απενεργοποίηση της p27^{KIP1} πρωτεΐνης οδηγεί σε ελαττωμένη έκφραση. Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτουν αρκετά στοιχεία τα οποία εισηγούνται ότι η έκφραση της p27^{KIP1} αποτελεί χρήσιμο προγνωστικό παράγοντα σε ποικιλία νεοπλασμάτων, αν και όλες οι σχετικές μελέτες δε βρίσκονται σε συμφωνία μεταξύ τους^{171,174-182}. Σε ότι αφορά το καρκίνωμα του στομάχου, η χαμηλή έκφραση της p27^{KIP1} πρωτεΐνης έχει σχετισθεί με υψηλό βαθμό κακοηθείας, αγγειακή διήθηση και παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων¹⁸³⁻¹⁸⁸. Η χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης p27^{KIP1} σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση της κυκλίνης E βρέθηκε να αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα πρόγνωσης^{189,190}. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει τη συμμετοχή της κυκλίνης E στο σηματοδοτικό μονοπάτι της p27^{KIP1}.

3.6.2.3.3. Πρωτεΐνη p16^{INK4}

Η πρωτεΐνη p16^{INK4} σχηματίζει ετεροδιμερή σύμπλοκα με τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDK4 και CDK6 και αναστέλλει εκλεκτικά τη δημιουργία συμπλεγμάτων με τις κυκλίνες D. Σημαντικού βαθμού ομοιότητα παρατηρείται μεταξύ της p16^{INK4} και της πρωτεΐνης p15^{INK4b} ενώ μικρότερου βαθμού ομοιότητα παρατηρείται με την p18^{INK4c}.

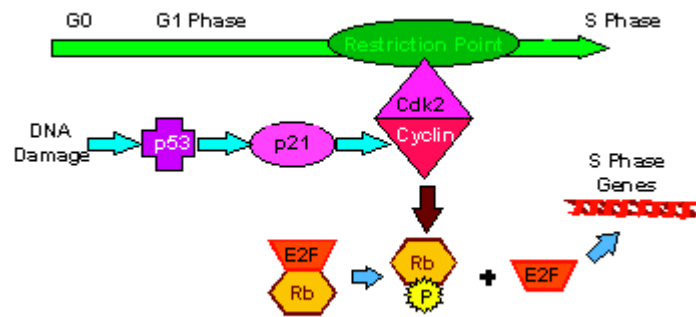
Η απενεργοποίηση του γονιδίου $p16^{INK4}$ αποτελεί μια από τις συχνότερες γενετικές διαταραχές των κακοήθων νεοπλασμάτων. Οι κύριοι μηχανισμοί απενεργοποίησης του γονιδίου περιλαμβάνουν τις σημειακές μεταλλάξεις αλλά κυρίως επιγενετικές διαταραχές, όπως η μεθυλίωση¹⁹¹. Μεταλλάξεις του γονιδίου $p16^{INK4}$ έχουν παρατηρηθεί σε ποικίλα νεοπλάσματα. Στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου, έχει περιγραφεί μεθυλίωση του γονιδίου, σε ποσοστό που κυμαίνεται από 18%-87%. Η μεθυλίωση φαίνεται να αποτελεί πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του στομάχου, καθώς έχει παρατηρηθεί στην πλειονότητα των περιπτώσεων δυσπλαστικού γαστρικού βλεννογόνου¹⁹². Σε ιστικό επίπεδο, το αποτέλεσμα της γονιδιακής μεθυλίωσης είναι η ελάττωση της πρωτεϊνικής έκφρασης. Μοριακές μελέτες αναφέρουν συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου $p16^{INK4}$ με τον υψηλό βαθμό κακοηθείας. Σε ανοσοιστοχημικές μελέτες, η χαμηλή έκφραση της $p16^{INK4}$ πρωτεΐνης σχετίζεται με το βάθος διήθησης και την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων¹⁹³.

Σε ερευνητικές μελέτες διαφαίνεται ότι πολλές περιπτώσεις καρκινωμάτων συνοδεύονται από κάποιου είδους διαταραχή στον οδό $p16^{INK4}$ – κυκλίνη D – pRb .

3.6.3. Άλλα ρυθμιστικά μόρια του κυτταρικού κύκλου

3.6.3.1. Πρωτεΐνη p53

Έχει ήδη αναφερθεί ότι μετά από βλάβη του DNA, η φυσιολογική μορφή της πρωτεΐνης p53 (wild type) διακόπτει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και προκαλεί παραμονή του κυτάρου στη φάση G_1 , εξασφαλίζοντας έτσι το απαιτούμενο χρονικό διάστημα για επιδιόρθωση του γενετικού υλικού πριν τον αναδιπλασιασμό του. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης $p21^{WAF/CIP1}$, η οποία αναστέλλει τη δραστηριότητα συμπλεγμάτων κυκλινών / κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (Σχήμα 5). Εάν η επιδιόρθωση του γενετικού υλικού δεν είναι δυνατή, η p53 κινητοποιεί διαδικασία κυτταρικού θανάτου μέσω αποπτωτικών μηχανισμών^{194,195}. Εκτός από τη σημασία της πρωτεΐνης p53 στην καταστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G_1 , πρόσφατες μελέτες εισηγούνται ανάλογο ρόλο της στην παραμονή του κυτάρου στη φάση G_2 μετά από βλάβη του γενετικού υλικού¹⁹⁶.



Σχήμα 5. Καταστολή του κυττάρου στη φάση G1 μέσω της πρωτεΐνης p53 μετά από βλάβη του DNA.

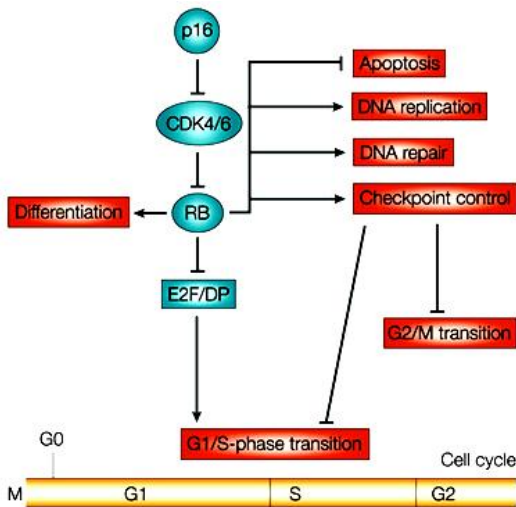
Έχει ήδη αναφερθεί, ότι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 είναι υπεύθυνες για τη διαταραχή της λειτουργίας της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Εκτός από την παρουσία των μεταλλάξεων, η λειτουργία της p53 διαταράσσεται και από μία άλλη πρωτεΐνη, την MDM2 (HDM2 στον άνθρωπο). Η πρωτεΐνη MDM2 δεσμεύει τη φυσιολογική μορφή της p53, αναστέλλει τη ρυθμιστική μεταγραφική δραστηριότητά της, ενώ παράλληλα ευοδώνει την αποδόμησή της από το σύστημα της ουβικιτίνης. Γίνεται κατανοητό, ότι υπερέκφραση της MDM2 δύναται να αδρανοποιήσει σε σημαντικό βαθμό την p53¹⁹⁷. Επί βλάβης του γενετικού υλικού, ενεργοποιείται μια ειδική κινάση, η πρωτεϊνική κινάση Atm, η οποία παρεμποδίζει τη δέσμευση της MDM2 με την p53, μέσω φωσφορυλίωσης της τελευταίας σε θέσεις σερίνης από την CDK2.

Από τα ανωτέρω γίνεται κατανοητό ότι η πρωτεΐνη MDM2 μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργική κατάσταση της πρωτεΐνης p53. Το γεγονός ότι η σύνθεση της MDM2 ρυθμίζεται σχεδόν αποκλειστικά από το p53, υποδηλώνει έναν αμφίδρομο ρυθμιστικό μηχανισμό (p53-MDM2 auto-regulatory feedback loop), ο οποίος έχει ενοχοποιηθεί στην καρκινογένεση^{189,198,199}.

3.6.3.2. Πρωτεΐνη pRb

Κυρίαρχο ρόλο για τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G₁ στη φάση S διαδραματίζει η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb, η οποία οδηγεί σε απενεργοποίηση του γονιδίου²⁰⁰. Τα επίπεδα της pRb παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ενώ η ενεργότητά της καθορίζεται από την κατάσταση της φωσφορυλίωσής της. Η pRb βρίσκεται στην ενεργό, υποφωσφορυλιωμένη μορφή κατά τη φάση G₀ και έως το μέσο της φάσης G₁, ενώ φωσφορυλιώνεται και αδρανοποιείται προς το τέλος της G₁ και κατά τη φάση S, παραμένοντας σε υψηλό βαθμό φωσφορυλίωσης κατά τη διάρκεια της φάσης G₂²⁰¹.

Η ενεργός (υποφωσφορυλιωμένη) μορφή της pRb αποτρέπει την είσοδο του κυττάρου στη φάση S καθώς αυτή συνδέεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F (E2F1, E2F2, E2F3), παρεμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίηση ποικίλων γονιδίων. Η αναστολή της ενεργοποίησης αυτών των γονιδίων ερμηνεύει την κατασταλτική δράση της pRb στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, η ανενεργός (φωσφορυλιωμένη) μορφή της pRb επάγει την απελευθέρωση των E2F, οι οποίοι με τη σειρά τους πυροδοτούν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη μετάβαση από τη φάση G₁ στην φάση S του κυτταρικού κύκλου, όπως το γονίδιο της κυκλίνης E, της κυκλίνης A αλλά και άλλων γονιδίων απαραίτητων για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 6).



Σχήμα 6.

Συμμετοχή της πρωτεΐνης pRb στον έλεγχο της μετάβασης από τη φάση G₁ στην φάση S του κυτταρικού κύκλου και άλλες πιθανές λειτουργίες της (απόπτωση, επιδιόρθωση γενετικού υλικού).

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση της pRb έχουν πλέον αποσαφηνιστεί. Πιστεύεται ότι, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb σε θέσεις σερίνης / θρεονίνης απαιτεί την παρουσία κυκλινών, οι οποίες σχηματίζουν στη συνέχεια συμπλέγματα με CDKs. Συγκεκριμένα, στο μέσο και έως το τέλος της φάσης G₁ παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας του συμπλέγματος κυκλίνη D1/CDK4, η οποία επάγει μερικώς τη φωσφορυλίωση της pRb^{202,203}. Η μερική φωσφορυλίωση της pRb από το σύμπλεγμα κυκλίνη D1-CDK4 επιτρέπει στο μεταγραφικό παράγοντα E2F να επάγει κατά το τέλος της φάσης G₁ την ενεργοποίηση του γονιδίου της κυκλίνης E και τη σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης²⁰⁴. Η σύνθεση του συμπλέγματος κυκλίνη E/CDK2 αρχίζει κατά το τέλος της φάσης G₁ και συνεχίζεται σε μέγιστο βαθμό κατά τη μετάβαση από τη φάση G₁ στη φάση S. Το σύμπλεγμα κυκλίνη E/CDK2 αποτελεί αναγκαίο και καθοριστικό παράγοντα για τη μετάβαση στη φάση S μέσω περαιτέρω φωσφορυλίωσης της pRb²⁰⁵. Η ενεργοποίηση των συμπλεγμάτων κυκλίνη D1/CDK4 ή κυκλίνη D1/CDK6 ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από την p16^{INK4a} πρωτεΐνη. Φαίνεται λοιπόν, ότι τα μόρια pRb, p16^{INK4a} και κυκλίνη D1/CDK4 ή κυκλίνη D1/CDK6 λειτουργούν στο ίδιο βιολογικό μονοπάτι με αποτέλεσμα οποιαδήποτε διαταραχή (σημειακές

μεταλλάξεις, απαλείψεις, μεθυλίωση, κτ.λ.) σε κάποιο μέλος αυτού του μονοπατιού να επιφέρει διαταραχές σε όλη την p16^{INK4a} - κυκλίνη D1/CDK4 ή κυκλίνη D1/CDK6 - pRb οδό.

Διαταραχές της pRb οδού έχουν παρατηρηθεί σε κακοήθη νεοπλάσματα. Η συνδυαστική μελέτη της λειτουργίας δύο ή και περισσότερων μορίων αυτής της οδού, κέντρισε το ενδιαφέρον διαφόρων ερευνητικών ομάδων, καθόσον αυτή μπορεί να παρέχει περισσότερες πληροφορίες για τη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλασματος. Στα αδενοκαρκινώματα στομάχου, η συνδυαστική γονιδιακή ανάλυση επέτρεψε τον διαχωρισμό των ασθενών σε διακριτές προγνωστικές ομάδες. Ασθενείς με p16⁺/pRb⁻/κυκλίνη D1/CDK4⁻ και p16⁻/pRb⁻/κυκλίνη D1/CDK4⁻ όγκους είχαν εξαιρετικά πτωχή πρόγνωση^{206,208}.

3.6.3.3. Πρωτεΐνη Ki67

Η Ki67 πρωτεΐνη είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη, της ομάδας των μη ιστονικών πρωτεϊνών, η οποία ανιχνεύεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, εκτός από τη φάση ηρεμίας G₀. Με την ανίχνευση της Ki67 πρωτεΐνης δύναται να προσδιοριστούν επομένως όλα τα ενεργοποιημένα κύτταρα των φάσεων G₁, S, G₂, και M του κυτταρικού κύκλου και να διακριθούν από τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας. Η έκφραση της Ki67 πρωτεΐνης έχει προταθεί ως δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επιπρόσθετα ως δείκτης προσδιορισμού του αυξητικού δυναμικού ενός νεοπλασματος.

Είναι αναμενόμενο λοιπόν, αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 να παρατηρείται συχνότερα στα κακοήθη νεοπλάσματα. Σε ότι αφορά το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου, τα αποτελέσματα των περισσότερων μελετών αναδεικνύουν αναλογικές συσχετίσεις της θετικής έκφρασης της πρωτεΐνης με δυσμενείς προγνωστικές παραμέτρους, όπως μεγάλο μέγεθος όγκου, προχωρημένο στάδιο και λεμφαδενικές ή περιτοναϊκές μεταστάσεις²⁰⁹.

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ανάπτυξη, εξέλιξη και διηθητική επέκταση του καρκινώματος του στομάχου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία επισυμβαίνουν ποικίλες γονιδιακές διαταραχές. Μελέτες έχουν δείξει ότι, αυτές οφείλονται κυρίως σε μεταβολές της δομής ή/και της λειτουργίας ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η επείγουσα ανάγκη να αναδειχθούν βιοδείκτες, ικανοί να διαχωρίσουν τους ασθενείς σε διακριτές προγνωστικές ομάδες, σε συνδυασμό με την εκρηκτική συσσώρευση γνώσης σε θέματα μοριακής βιολογίας και γονιδιακής θεραπείας, έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για μια πιο εμπειριστατωμένη και συστηματική μελέτη αυτών των μορίων. Τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα ερευνητικών μελετών όσον αφορά την προγνωστική αξία αυτών των μορίων είναι αντιφατικά.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53, Rb, p21, p27, p16, MDM2, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και Ki67 σε ιστούς 130 ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του στομάχου. Τα ευρήματα συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την κλινική πορεία των ασθενών. Σκοπός της μελέτης ήταν η περαιτέρω διερεύνηση παθογενετικών μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται οι πρωτεΐνες αυτές και της προγνωστικής τους αξίας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Υλικό

Το υλικό αποτέλεσαν 130 περιπτώσεις αδενοκαρκινώματος στομάχου οι οποίες συγκεντρώθηκαν από τα αρχεία του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και διαγιγνώσθησαν μεταξύ 09-1986 και 06-2007. Η επιλογή έγινε με την προϋπόθεση ότι υπήρχε επαρκές υλικό εγκλεισμένο σε κύβους παραφίνης, ώστε να πραγματοποιηθεί πολυπαραμετρική ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

Τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα στομάχου φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών με αδενοκαρκίνωμα στομάχου.

Χαρακτηριστικά	Περιπτώσεις (no)
Συνολικός αριθμός ασθενών	130
Ηλικία (mean±SD, year)	65±11.52
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	85 / 45
Ταξινόμηση κατά Lauren	
Εντερικού τύπου	62
Διαχύτου τύπου	52
Μικτού τύπου	16
Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας	
Grade 1	19
Grade 2	46
Grade 3	65
Αγγειακή διήθηση	
ΟΧΙ	80
ΝΑΙ	50
Περινευρική διήθηση	
ΟΧΙ	85
ΝΑΙ	45
Νέκρωση	
Απούσα	99
Παρούσα	31
Βλέννη	
Απούσα	101
Παρούσα	29
Λεμφαδενική προσβολή	
N0	36
N1, N2, N3	94

Σε 65 περιπτώσεις ασθενών ήταν δυνατή η ανεύρεση του ιατρικού τους φακέλου και η καταγραφή παραμέτρων που αφορούν τη κλινική παρακολούθηση (follow-up) και επιβίωση των ασθενών. Η κλινική παρακολούθηση (follow-up) των ασθενών κυμαινόταν από 1 έως 200 μήνες (μέσος όρος 37,15, SD 38,13 μήνες). Η περίοδος επιβίωσης υπολογίστηκε αρχίζοντας με το μήνα που έγινε η εγχείρηση έως το μήνα του θανάτου ή της τελευταίας καταγραφής ότι ο ασθενής ήταν εν ζωή.

Από τους κύβους παραφίνης κάθε περίπτωσης ελήφθησαν ιστολογικές τομές πάχους 3-5 μm και πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με τη μέθοδο της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB Kit, Dako SA, Glostrup, Denmark). Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η προέλευση και η αραιώσή τους παρατίθενται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Αντίσωμα	Προέλευση	Αραίωση
P53	DAKO	1:50
pRb	Oncogene	1:80
P21	Novocastra	1:20
P27	Nocovastra	1:50
P16	DAKO	Έτοιμο προς χρήση
MDM2	Oncogene	1:80
Κυκλίνη A	Novocastra	1:10
Κυκλίνη B1	Novocastra	1:10
Κυκλίνη D1	Novocastra	1:20
Κυκλίνη D2	Santacruz	1:500
Κυκλίνη D3	Santac ruz	1:500
Κυκλίνη E	Novocastra	1:10
Ki67 (MIB1)	DAKO	1:50

1.2. Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκε η **κλασική ανοσοϊστοχημική τεχνική της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης** (LSAB, Labeled StreptAbidin Biotin) η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του kit Lab Vision Corporation, UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready-to-use). Σε όλες τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις συμπεριλήφθηκαν θετικοί μάρτυρες (σύμφωνα με τις συστάσεις των κατασκευαστικών εταιρειών των αντισωμάτων) και αρνητικοί μάρτυρες (παράλειψη της προσθήκης του πρωτογενούς αντισώματος).

Περιγραφή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου

1. **Αποπαραφίνωση – ενυδάτωση:** Τα πλακίδια με τις ιστολογικές τομές παραφίνης τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 60 °C για 18 ώρες. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος ξυλόλης για 30' σε κλίβανο, σε θερμοκρασία 60 °C. Στη συνέχεια τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ξυλόλης και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο για 20' σε θερμοκρασία 60 °C. Κατόπιν εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ξυλόλης για 10' σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η διαδικασία ενυδάτωσης των ιστολογικών τομών με εμβάπτισή τους για 30' X2 διαδοχικά σε κατιόντα οινόπνευμα (100%, 96%) και τέλος σε απεσταγμένο νερό.
2. **Αποκάλυψη του αντιγόνου:** Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με νερό βρύσης X3. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος κιτρικού οξέος 10% (630 ml απεσταγμένο νερό και 70 ml κιτρικό οξύ, Buffer for Antigen Retrieval) σε φούρνο μικροκυμάτων για 3'. Στη συνέχεια τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο παραπάνω διάλυμα. Εφαρμόστηκαν 2 κύκλοι θέρμανσης εντός φούρνου μικροκυμάτων σε ισχύ 300 Watt επί 15' για κάθε κύκλο. Το διάλυμα με τα πλακίδια παρέμεινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10' και ακολούθησε έκπλυση σε απεσταγμένο νερό X2.
3. **Εξουδετέρωση ενδογενούς υπεροξειδάσης:** Προετοιμάστηκε διάλυμα εξουδετέρωσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης (500 ml H₂O₂ 30% και 50 ml μεθανόλη). Τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα για 30' και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα (εναλλακτικά, ενστάλαξη 2-3 σταγόνων από το Hydrogen Peroxide Block που παρέχεται έτοιμο στο Kit, και επώαση για 15').
4. **Προεπάωση:** Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων με απεσταγμένο νερό X3 και με διάλυμα TBS για 5' (TBS: Tris Buffer Solution, 20 g NaCl, 1.5 g Tris σε 2.5 lt dH₂O και pH 7.6). Στη συνέχεια ακολούθησε ενστάλαξη 2-3 σταγονιδίων Ultra V Block από το

kit και τα πλακίδια επώαστηκαν για 5' σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική χρώση (δέσμευση μη ειδικών αντιγονικών επιτόπων του ιστού).

5. **Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα:** Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 5', ακολούθησε ενστάλαξη του πρωτογενούς αντισώματος με την ενδεδειγμένη αραίωση. Το χρονικό διάστημα επώασης καθορίστηκε από το πρωτόκολλο κάθε αντισώματος και κυμάνθηκε από ώρες μέχρι ολονύκτια επώαση.
6. **Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα:** Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με διάλυμα TBS για 10' και στη συνέχεια επώαση με το δευτερογενές βιοτινισμένο αντίσωμα (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Envision Kit, έτοιμο προς χρήση) για 30'. Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 10'. Στη συνέχεια προστέθηκε το ABC Complex/HRP (στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με το σύμπλοκο αβιδίνη-βιοτίνη-υπεροξειδάση) και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκε έκπλυση σε TBS για 5' X2.
7. **Προσθήκη χρωμογόνου:** Για την προετοιμασία του χρωμογόνου αναμίχθηκαν 20 μl DAB (3,3' τετραχλωρική διαμινοβενζιδίνη) σε 1 ml από το αντίστοιχο Buffer. Τοποθετήθηκε διάλυμα χρωμογόνου (DAB 0.1% W/V) στις ιστολογικές τομές για 3'. Ακολούθησε έκπλυση σε αποσταγμένο νερό για 10' και χρώση με αιματοξυλίνη 10% (προσθήκη 10 ml αιματοξυλίνης 100% σε 90 ml αποσταγμένου νερού) για 2'. Τέλος, οι ιστολογικές τομές ξεπλύθηκαν σε νερό βρύσης για 1'.
8. **Αφυδάτωση των ιστών:** Τέλος, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε ανιόντα οινόπνεύματα (96%, 96%, 100%, 100%) και ξυλόλη. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επικάλυψη των ιστολογικών τομών με καλυπτρίδες.

1.2.1. Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.

Η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έγινε σε διπλό οπτικό μικροσκόπιο από δύο Παθολογοανατόμους, οι οποίοι δεν γνώριζαν τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά εκάστου εξεταζόμενου περιστατικού. Αξιολογήθηκαν τουλάχιστον 10 οπτικά πεδία από κάθε ιστολογική τομή, τα οποία επιλέχθηκαν με την προϋπόθεση ότι περιείχαν ανοσοθετικά νεοπλασματικά κύτταρα, και καλά διατηρημένο ιστό. Υπολογίστηκε το επί τις εκατό (%) ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων σε μεγέθυνση X400.

Για την περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα σημείο αποκοπής των θετικών (υψηλά επίπεδα έκφρασης) από τις αρνητικές (χαμηλά επίπεδα έκφρασης) περιπτώσεις με υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, p16, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3 και κυκλίνη E, όταν αυτές εξέφραζαν την πρωτεΐνη σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του 10% των νεοπλασματικών

κυττάρων και με υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών pRb, p27 και Ki67, όταν αυτές εξέφραζαν την πρωτεΐνη σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του 30% των νεοπλασματικών κυττάρων. Το σημείο αποκοπής (cut off) ορίστηκε κατά συνθήκη.

1.2.3. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS έκδοση 10.0.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι βασικές στατιστικές παράμετροι των επιπέδων έκφρασης κάθε μίας από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν ο μέσος όρος έκφρασης (mean value), η τυπική απόκλιση της τιμής κάθε παραμέτρου (SD, standard deviation – δείκτης που προσδιορίζει πόσο διαφέρουν κατά μέσο όρο οι τιμές της μεταβλητής από το μέσο όρο του συνόλου στο οποίο ανήκουν) καθώς και η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή (maximum-minimum values).

Η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων και της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης καθεμίας από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των στατιστικών ελέγχων (tests) χ^2 και Kruskal-Wallis.

Η διερεύνηση ενδεχόμενης συσχέτισης μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ανά ζεύγη, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman και Pearson (Spearman's and Pearson's correlation coefficient, αριθμητικό μέτρο ή δείκτης του βαθμού της συσχέτισης μεταξύ δύο συνόλων τιμών). Αυτή η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις τιμές των πρωτεϊνών ως συνεχείς μεταβλητές. Η διερεύνηση ενδεχόμενης συσχέτισης χρησιμοποιώντας τις τιμές των πρωτεϊνών ως κατηγορικές μεταβλητές πραγματοποιήθηκε με στατιστικό έλεγχο U των Mann-Whitney. Η αναζήτηση ενδεχόμενης συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών και της επιβίωσης των ασθενών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kaplan-Meier.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p) ορίστηκε ως <0.05 .

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb, p16, p27.

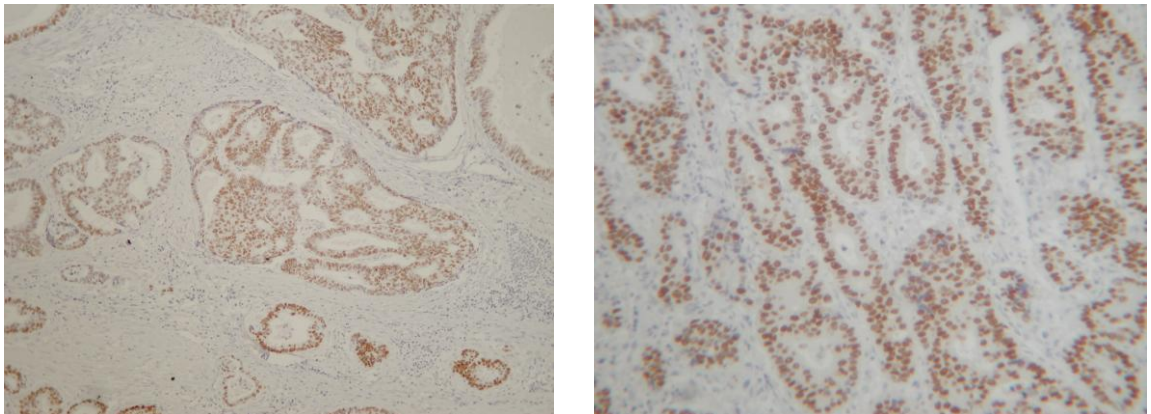
Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb και p27 στα νεοπλασματικά κύτταρα ήταν πυρηνική. Η έκφραση της πρωτεΐνης p16 ήταν πυρηνική και εν μέρει διάχυτη κυτταροπλασματική.

Οι βασικές στατιστικές παράμετροι των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb, p16, και p27 παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Βασικές στατιστικές παράμετροι της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb, p16 και p27.

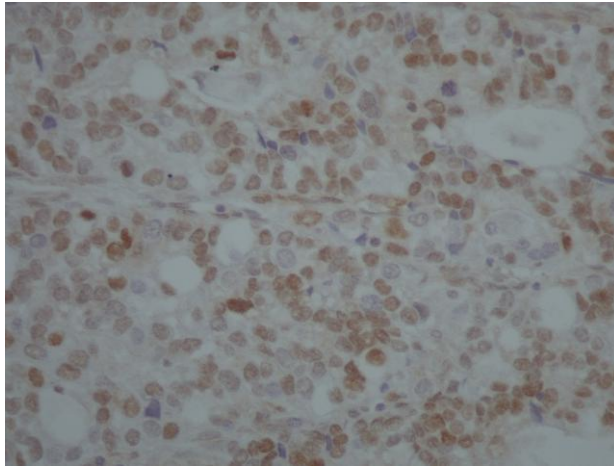
Πρωτεΐνη	Αριθμός περιπτώσεων	Μέσος όρος (%)	Τυπική απόκλιση (%)	Ελάχιστη – μέγιστη τιμή (%)
P53	130	27,92	35,058	0 – 98
P21	129	4,60	9,17	0 – 35
MDM2	128	2,62	9,28	0 – 85
pRb	129	61,50	29,25	0 – 98
p16	120	8,32	17,85	0 – 95
p27	129	67,77	27,38	0 – 99

Η έκφραση της πρωτεΐνης p53 εκτιμήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις (n=130) που μελετήθηκαν (Εικ. 1). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 27,92% των νεοπλασματικών κυττάρων των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 35,058%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 98%.



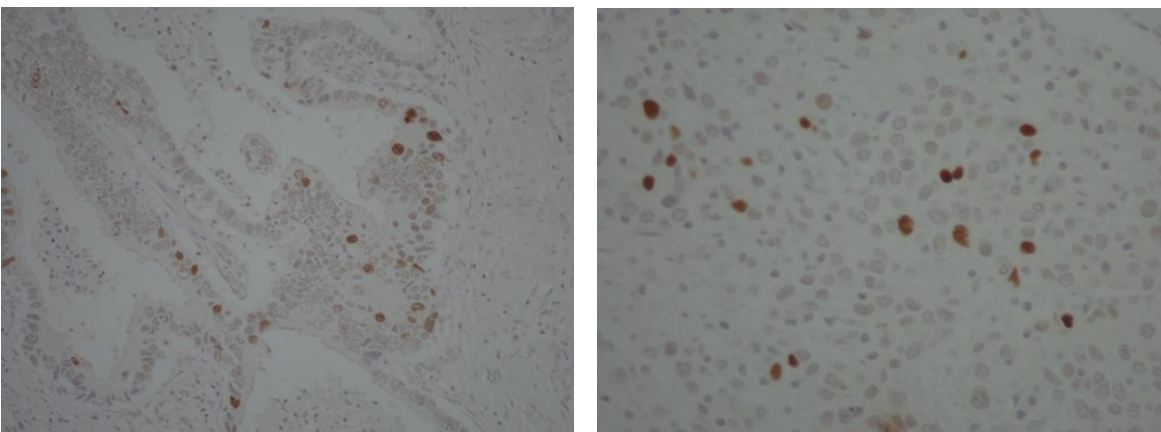
Εικόνα 1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53 στα νεοπλασματικά κύτταρα (X100, X200).

Η έκφραση της πρωτεΐνης p21 εκτιμήθηκε σε 129 από τις 130 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (Εικ. 2). Η πρωτεΐνη εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 4,60% των νεοπλασματικών κυττάρων. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης υπολογίστηκε σε 9,17%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 35%.



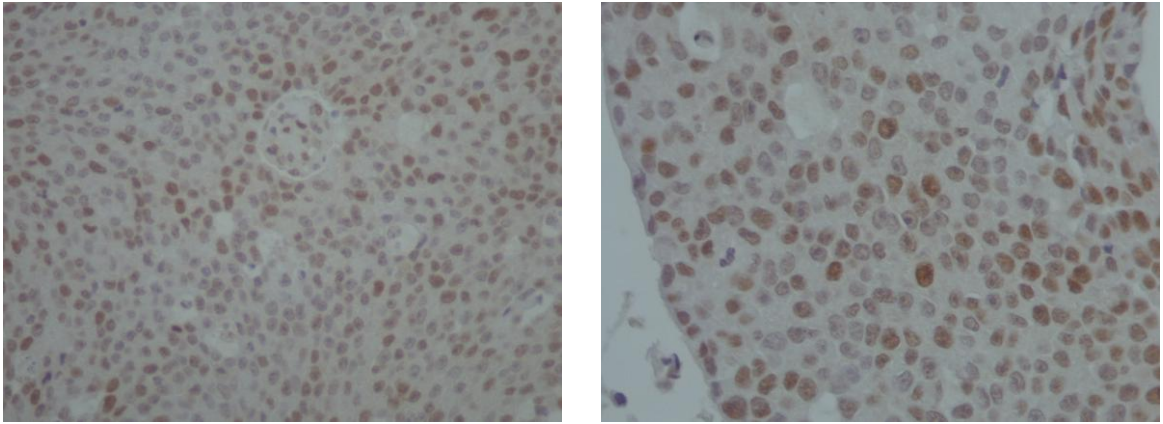
Εικόνα 2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p21 στα νεοπλασματικά κύτταρα (X400).

Η έκφραση της πρωτεΐνης MDM2 εκτιμήθηκε σε 128 από τις 130 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (Εικ. 3). Η πρωτεΐνη εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 2,62% των νεοπλασματικών κυττάρων και η τυπική απόκλιση υπολογίστηκε σε 9,28%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 85%.



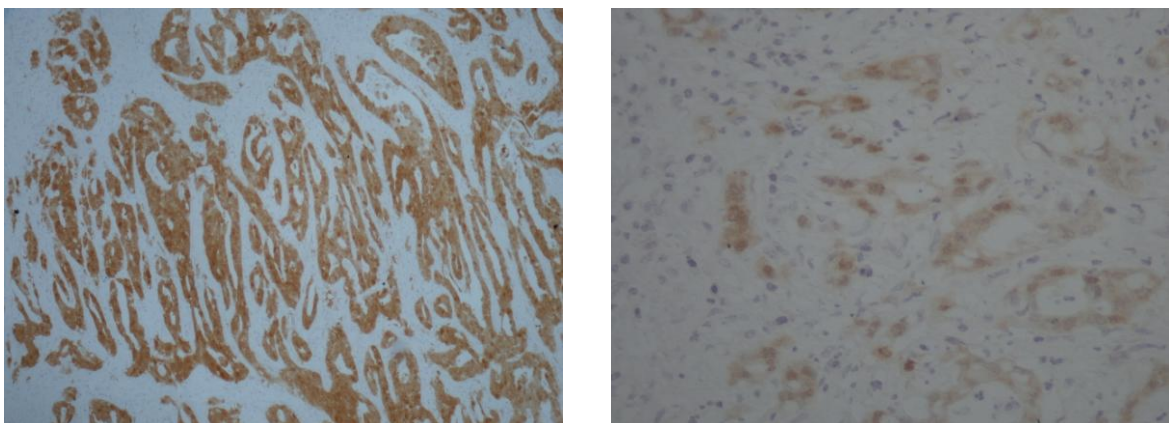
Εικόνα 3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης MDM2 στα νεοπλασματικά κύτταρα (X200, X400).

Η έκφραση της πρωτεΐνης pRb εκτιμήθηκε σε 129 από τις 130 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (Εικ. 4). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 61,5% των νεοπλασματικών κυττάρων και η τυπική απόκλιση υπολογίστηκε σε 29,25%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 98%.



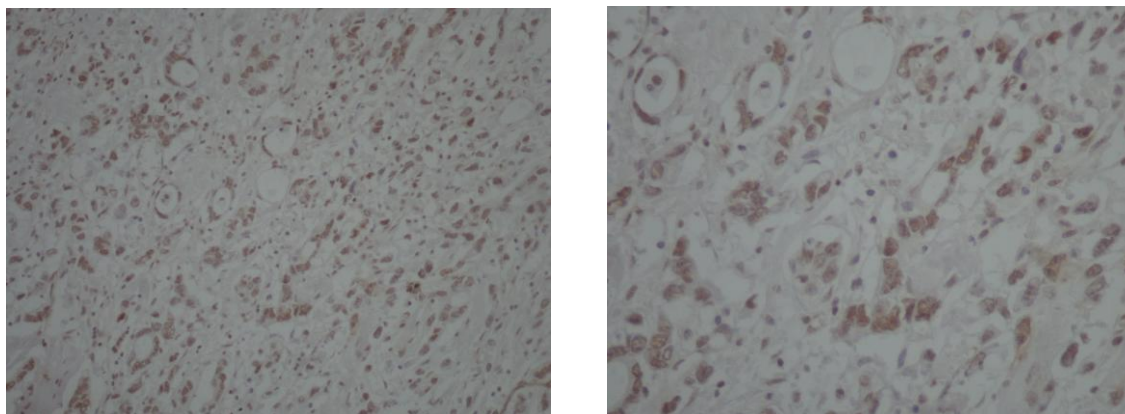
Εικόνα 4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Rb στα νεοπλασματικά κύτταρα (X400, X600).

Η έκφραση της πρωτεΐνης p16 αξιολογήθηκε σε 120 από τις 130 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (Εικ. 5). Η πρωτεΐνη εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 8,32% των νεοπλασματικών κυττάρων των περιπτώσεων που μελετήθηκαν, με τυπική απόκλιση από το μέσο όρο 17,85%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 95%.



Εικόνα 5. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p16 στα νεοπλασματικά κύτταρα (X100, X400).

Η έκφραση της πρωτεΐνης p27 αξιολογήθηκε σε 129 από τις 130 περιπτώσεις της μελέτης (Εικ. 6). Η πρωτεΐνη εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 67,77% των νεοπλασματικών κυττάρων και η τυπική απόκλιση υπολογίστηκε σε 27,38%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 99%.



Εικόνα 6. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p27 στα νεοπλασματικά κύτταρα (X200, X400).

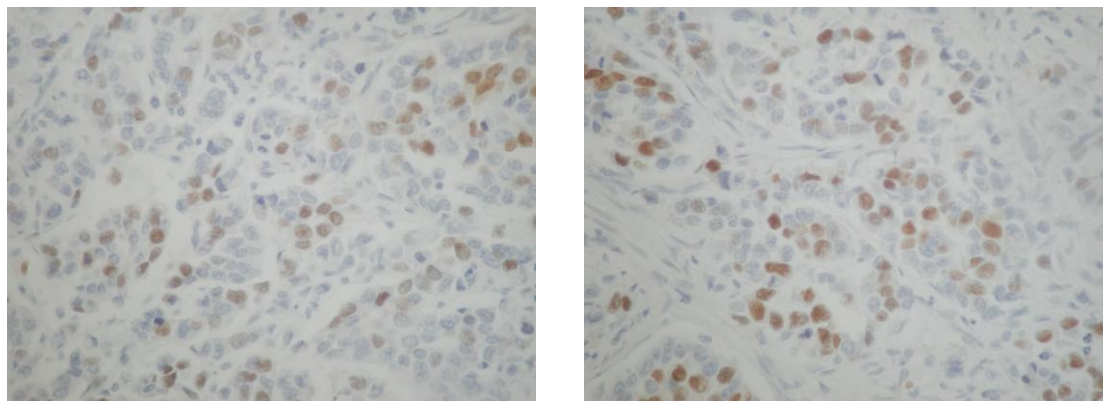
2.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας των κυκλινών και της πρωτεΐνης Ki67.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και Ki67 ήταν πυρηνική. Οι βασικές στατιστικές παράμετροι των επιπέδων έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Βασικές στατιστικές παράμετροι της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και Ki67.

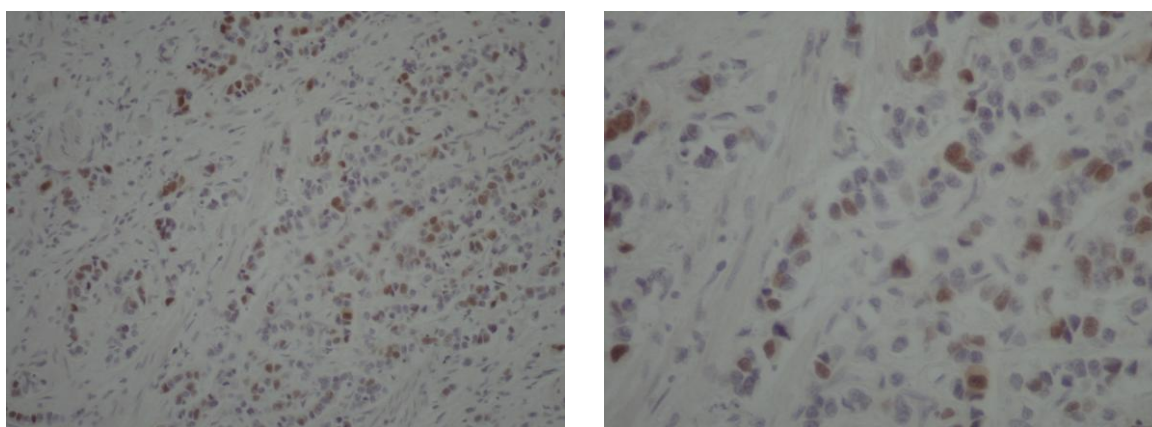
Πρωτεΐνη	Αριθμός περιπτώσεων	Μέσος όρος (%)	Τυπική απόκλιση (%)	Ελάχιστη – μέγιστη τιμή (%)
Κυκλίνη A	130	8,96	11,77	0 – 60
Κυκλίνη B1	130	2,16	5,55	0 – 35
Κυκλίνη D1	129	1,22	3,18	0 – 85
Κυκλίνη D2	129	6,66	12,69	0 – 65
Κυκλίνη D3	130	7,99	16,928	0 – 90
Κυκλίνη E	130	1,61	9,107	0 – 40
Ki67	124	32,75	22,64	4 – 92

Η έκφραση της πρωτεΐνης κυκλίνη Α εκτιμήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις (n=130) της παρούσας μελέτης (Εικ. 7). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 8,96% των νεοπλασματικών κυττάρων με τυπική απόκλιση 11,77%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 60%.



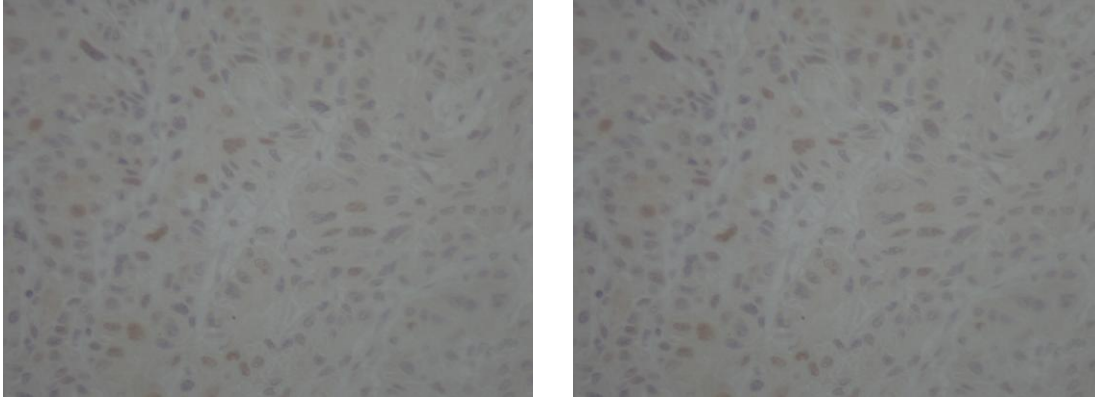
Εικόνα 7. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης Α στα νεοπλασματικά κύτταρα (Χ200, Χ400).

Η έκφραση της κυκλίνης Β1 εκτιμήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις (n=130) της μελέτης (Εικ. 8). Η κυκλίνη Β1 εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 2,16% των νεοπλασματικών κυττάρων και η τυπική απόκλισή της υπολογίστηκε σε 5,55%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 35%.



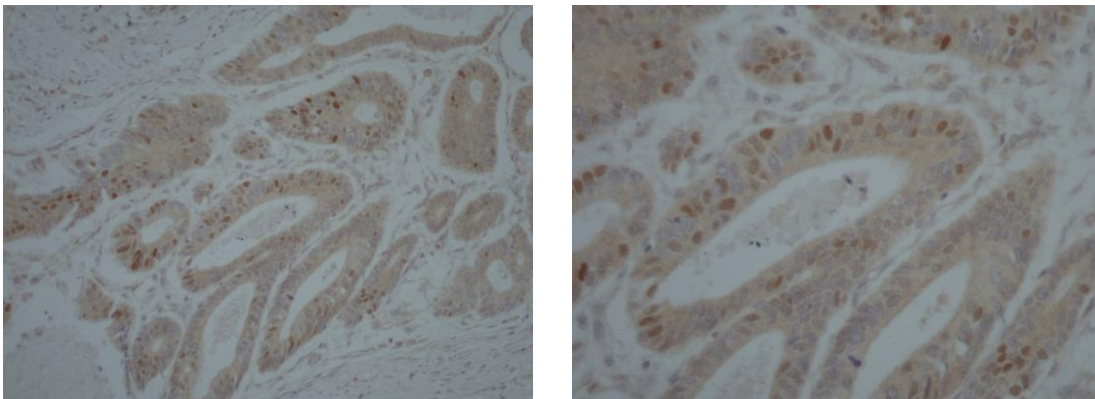
Εικόνα 8. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης Β1 στα νεοπλασματικά κύτταρα (Χ200, Χ400).

Η έκφραση της κυκλίνης D1 εκτιμήθηκε σε 129 από τις 130 περιπτώσεις της μελέτης και βρέθηκε να εκφράζεται κατά μέσο όρο στο 1,22% των νεοπλασματικών κυττάρων με τυπική απόκλιση 3,18% (Εικ. 9). Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 85%.



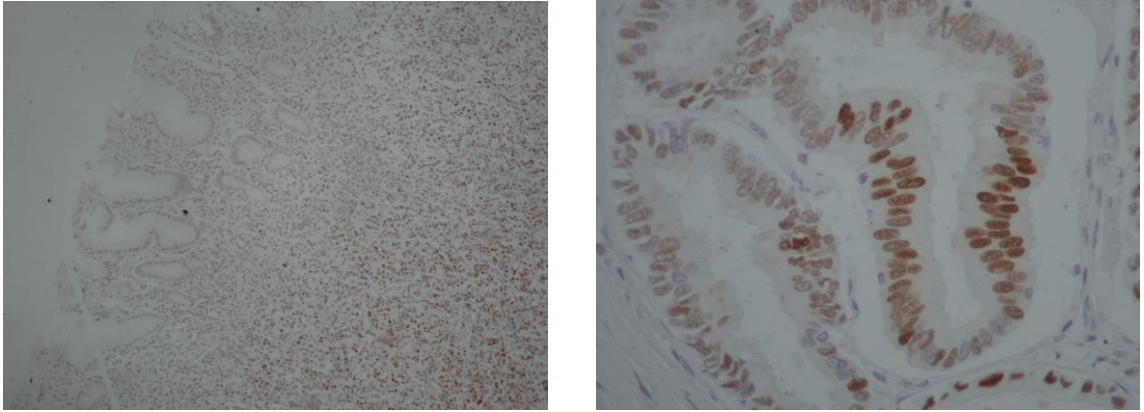
Εικόνα 9. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D1 στα νεοπλασματικά κύτταρα (Χ400, Χ400).

Η έκφραση της κυκλίνης D2 εκτιμήθηκε σε 129 από τις 130 περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Ο μέσος όρος της έκφρασης των νεοπλασματικών κυττάρων ήταν 6,66% και η τυπική απόκλιση 19,69% (Εικ. 10). Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 65%.



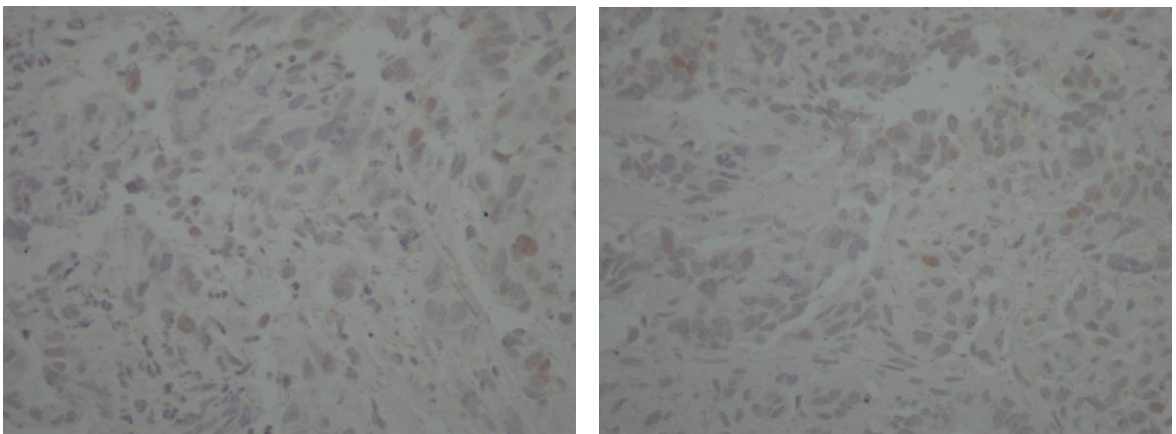
Εικόνα 10. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D2 στα νεοπλασματικά κύτταρα (Χ200, Χ400).

Η έκφραση της κυκλίνης D3 αξιολογήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις (n=130) (Εικ. 11). Η κυκλίνη D3 εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 7,99% των νεοπλασματικών κυττάρων με τυπική απόκλιση 16,928%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 90%.



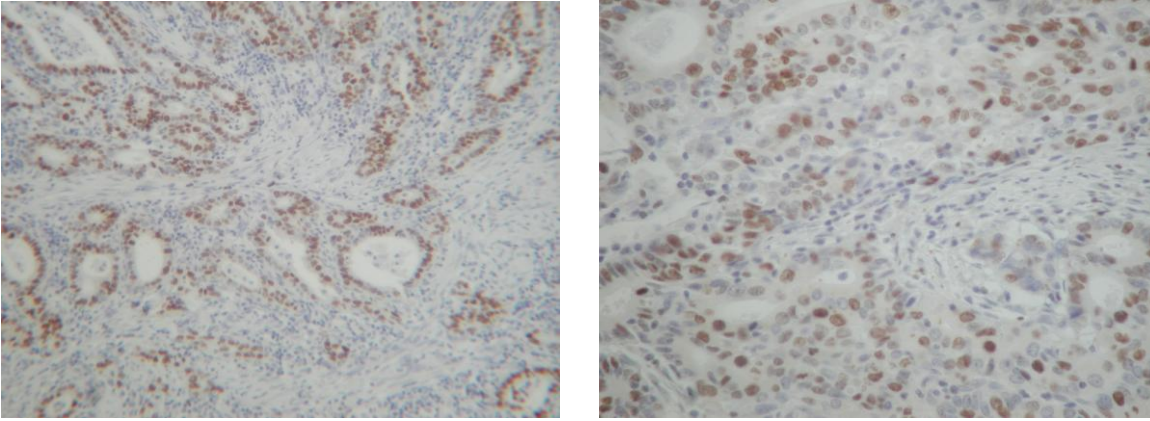
Εικόνα 11. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D3 στα νεοπλασματικά κύτταρα (X100, X400).

Η έκφραση της κυκλίνης E αξιολογήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις (n=130) (Εικ. 12). Η κυκλίνη E εκφράστηκε κατά μέσο όρο το 1,61% των νεοπλασματικών κυττάρων με τυπική απόκλιση 9,127%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% ενώ η μέγιστη ήταν 40%.



Εικόνα 12. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης E στα νεοπλασματικά κύτταρα (X400, X400).

Η έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 αξιολογήθηκε σε 124 από τις 130 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (Εικ. 13). Η πρωτεΐνη Ki67 εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 32,75% των νεοπλασματικών κυττάρων που μελετήθηκαν με τυπική απόκλιση 22,64%. Η ελάχιστη τιμή της έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 4% ενώ η μέγιστη ήταν 92%.



Εικόνα 13. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 στα νεοπλασματικά κύτταρα (Χ200, Χ400).

2.3. Προσδιορισμός των ανοσοϊστοχημικά θετικών περιπτώσεων ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν.

Ο προσδιορισμός των ανοσοϊστοχημικά θετικών περιπτώσεων των αδενοκαρκινωμάτων στομάχου ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21, p16, MDM2, κυκλίνες A, B1, D1, D2, D3 και E καθώς και των πρωτεϊνών pRb, p27 και Ki67 έγινε θέτοντας ως κατώτερα όρια έκφρασης των πρωτεϊνών από τα νεοπλασματικά κύτταρα, το 10% και το 30% αντίστοιχα.

Χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικής έκφρασης το 10% των νεοπλασματικών κυττάρων διαπιστώθηκε ότι 59/130 (45,38%) περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων στομάχου ήταν θετικές ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης p53, 23/139 (17,82%) ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης p21, 20/130 (15,38%) ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης p16, 11/124 (8,87%) ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης MDM2, 40/130 (30,77%) ως προς την έκφραση της κυκλίνης A, 7/130 (5,38%) ως προς την έκφραση της κυκλίνης B1, 4/130 (3,08%) ως προς την έκφραση της κυκλίνης D1, 30/130 (23,07%) ως προς την έκφραση των κυκλινών D2 και D3 και 4/130 (3,07%) ως προς την έκφραση της κυκλίνης E (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Θετικές ($\geq 10\%$ των νεοπλασματικών κυττάρων) ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21, p16, MDM2, κυκλινών A, B1, D1, D2, D3 και E.

Πρωτεΐνη	Αριθμός περιπτώσεων	Αριθμός θετικών περιπτώσεων	Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)
p53	130	59	45,38
p21	129	23	17,82
p16	130	20	15,38
MDM2	124	11	8,87
κυκλίνη A	130	40	30,77
κυκλίνη B1	130	7	5,38
κυκλίνη D1	130	4	3,07
κυκλίνη D2	130	30	23,07
κυκλίνη D3	130	30	23,07
κυκλίνη E	130	4	3,07

Χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικής έκφρασης το 30% των νεοπλασματικών κυττάρων, διαπιστώθηκε ότι 110/130 (84,61%) περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων στομάχου ήταν θετικές ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης pRb, 115/130 (88,46%) ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης p27 και 65/124 (52,41%) ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση ($\geq 30\%$ των νεοπλασματικών κυττάρων) ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών pRb, p27, Ki67.

Πρωτεΐνη	Αριθμός περιπτώσεων	Αριθμός θετικών περιπτώσεων	Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)
pRb	130	110	84,61
P27	130	115	88,46
Ki67	124	65	52,41

2.4. Συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

Οι πιθανές συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb, p16, p27, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, κυκλίνης D3, κυκλίνης E και Ki67 με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους προσδιορίστηκαν με εφαρμογή των στατιστικών ελέγχων χ^2 και Kruskal-Wallis.

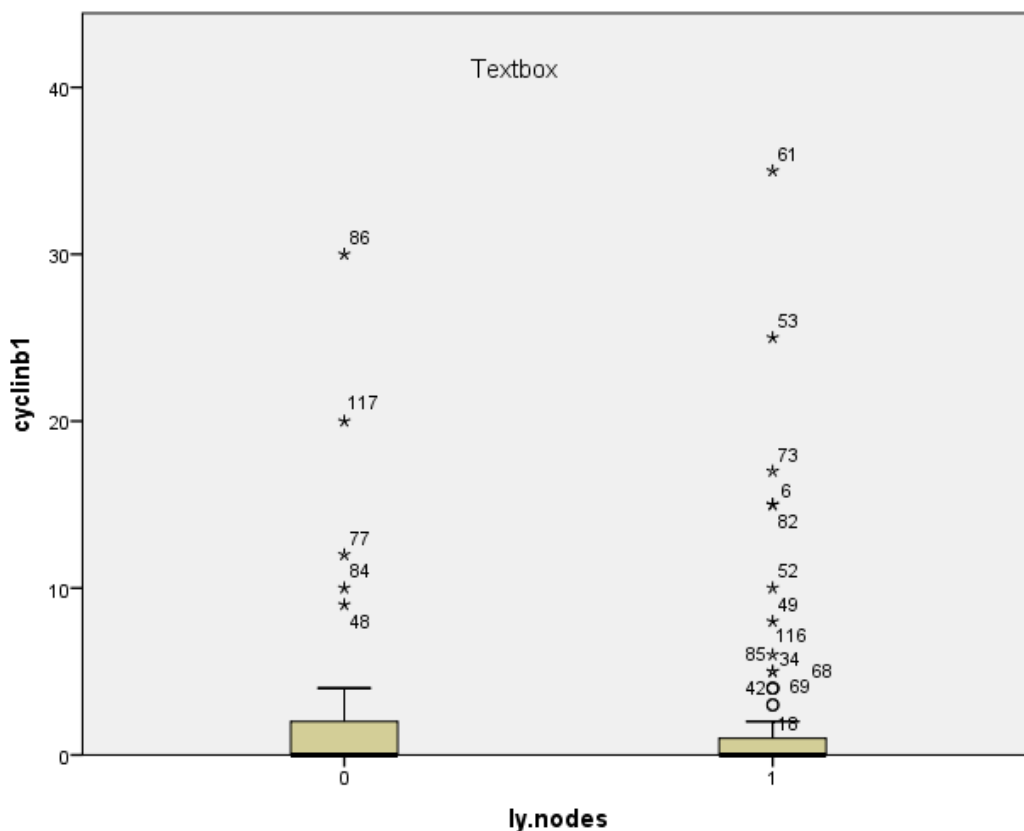
Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις διαπιστώθηκαν μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης B1 και της παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p=0,049$), της κυκλίνης A και της παρουσίας διήθησης αγγείων ($p=0,004$) καθώς και της πρωτεΐνης p21 με της παρουσίας νέκρωσης ($p<0.049$). Η έκφραση της κυκλίνης D2 ήταν υψηλότερη στις περιπτώσεις καρκινωμάτων με διάμετρο όγκου μεγαλύτερη των 5cm ($p=0,018$). Διαπιστώθηκε οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της πρωτεΐνης pRb και του βαθμού κακοήθειας (Grade) των καρκινωμάτων ($p=0.05$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των λοιπών πρωτεϊνών που μελετήθηκαν με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Συσχετίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, Rb, p16, p27, κυκλίνης A, κυκλίνης B1, κυκλίνης D1, κυκλίνης D2, κυκλίνης D3, κυκλίνης E και Ki67 με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (στατιστικός έλεγχος χ^2).

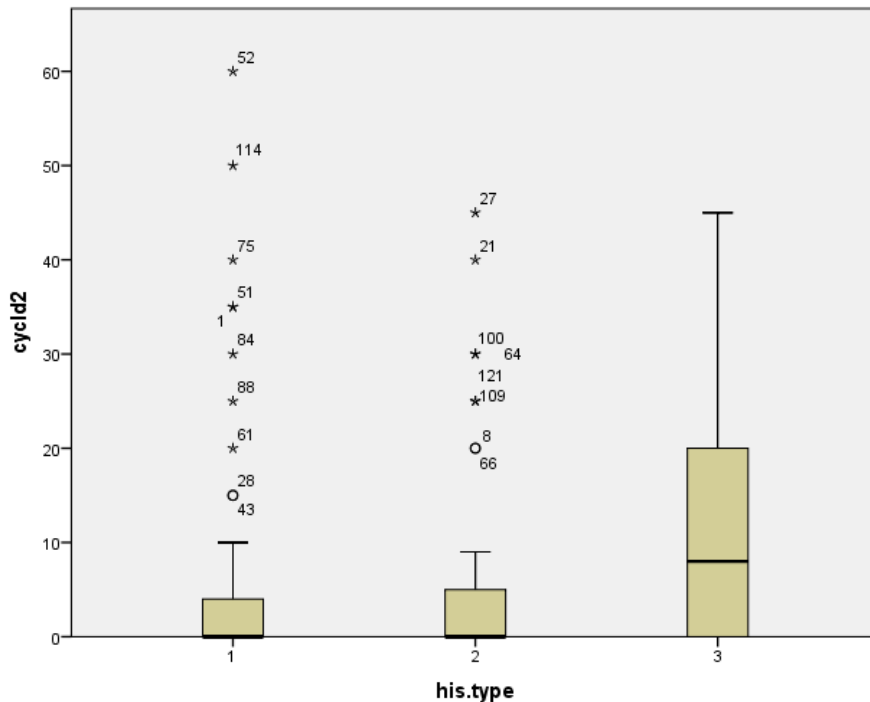
	Ιστολογικός τύπος	Βαθμός κακοήθειας (Grade)	Μεγαλύτερη διάμετρος όγκου	Λεμφαδενικές μεταστάσεις	Διήθηση αγγείων	Νέκρωση
p53	0,037	0,439	0,989	0,516	0,267	0,949
p21	0,547	0,375	0,793	0,352	0,292	0,049
MDM2	0,301	0,607	0,178	0,985	0,201	0,852
pRb	0,375	0,05	0,156	0,113	0,669	0,705
P16	0,544	0,755	0,836	0,945	0,310	0,329
P27	0,727	0,447	0,629	0,451	0,090	0,165
Κυκλίνη A	0,903	0,716	0,908	0,329	0,004	0,259
Κυκλίνη B1	0,922	0,922	0,658	0,049	0,780	0,559
Κυκλίνη D1	0,208	0,769	0,629	0,669	0,585	0,331
Κυκλίνη D2	0,027	0,249	0,018	0,490	0,576	0,402
Κυκλίνη D3	0,057	0,402	0,472	0,743	0,253	0,779
Κυκλίνη E	0,197	0,498	0,406	0,913	0,456	0,389
Ki67	0,393	0,706	0,618	0,342	0,324	0,374

Με την εφαρμογή στατιστικού ελέγχου Kruskal-Wallis προέκυψε επιπλέον στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D2 με τον ιστολογικό τύπο ($p=0,027$) και οριακά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D3 με τον ιστολογικό τύπο ($p=0,057$). Συμπερασματικά, και οι δύο κυκλίνες εκφράζονται συχνότερα στα διαχύτου τύπου συγκριτικά με τα εντερικού τύπου αδenoκαρκινώματα στομάχου.

Ενδεικτικά στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα του ελέγχου Kruskal-Wallis παρατίθενται με τη μορφή διαγραμμάτων πλαισίου-απολήξεων (box-plots) στις Εικόνες 14 και 15.



Εικόνα 14. Το διάγραμμα πλαισίου απολήξεων δείχνει ότι η έκφραση της κυκλίνης B1 σχετίζεται με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις ($p=0.049$) .

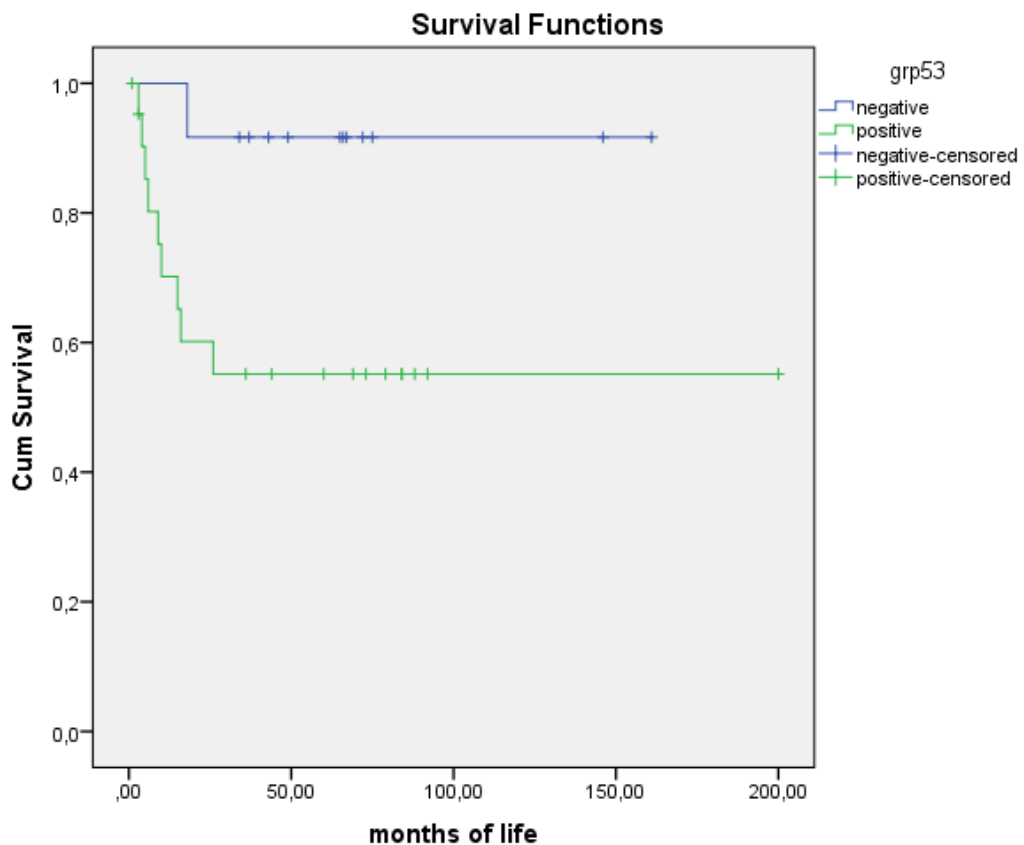


Εικόνα 15. Το διάγραμμα πλαισίου απολήξεων δείχνει ότι η έκφραση της κυκλίνης D2 σχετίζεται με τον ιστολογικό τύπο και παρατηρείται συχνότερα στα διαχύτου τύπου καρκινώματα ($p=0.027$)

2.5. Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb, p16, p27, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και Kι67, της ηλικίας και του φύλου με την επιβίωση των ασθενών.

Με την εφαρμογή του στατιστικού ελέγχου Kaplan-Meier παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 με μικρότερη επιβίωση των ασθενών ($p=0,01$) (Εικόνα 16). Η ηλικιακή ομάδα των 65 ετών και άνω είχε μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης ($p=0,05$). Η επιβίωση δεν διέφερε μεταξύ ανδρών και γυναικών.

Δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των λοιπών πρωτεϊνών που μελετήθηκαν και της επιβίωσης.



Εικόνα 16. Γράφημα της καμπύλης επιβίωσης για την κατηγοριοποιημένη μορφή της έκφρασης της πρωτεΐνης p53

2.6. Συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ανά ζεύγη.

Οι πιθανές συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ανά ζεύγη προσδιορίστηκαν υπολογίζοντας τους συντελεστές απήχησης r κατά Spearman και Pearson (συνεχείς μεταβλητές).

Οι στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις από τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών ανά ζεύγη με τον έλεγχο Spearman παραθέτονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις των συνεχών τιμών της έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ανά ζεύγη (στατιστικός έλεγχος Spearman).

	p53	p21	MDM2	Rb	p16	p27	Κυκλ. A	Κυκλ. B1	Κυκλ. D1	Κυκλ. D2	Κυκλ. D3	Κυκλ. E	Ki67
p53				<0,001		0,001	<0,001	<0,001				0,001	0,001
p21						0,003	<0,001	0,007		0,007			
MDM2													
pRb	<0,001	0,003				<0,001	<0,001	0,001					<0,001
p16								<0,001					
p27	0,001	<0,001		<0,001			<0,001	<0,001			0,009		0,001
Κυκλ. A	<0,001	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001				0,003	<0,001
Κυκλ. B ₁	<0,001	0,007		<0,001		<0,001	<0,001					0,006	<0,001
Κυκλ. D1											0,009		
Κυκλ. D2		0,007											
Κυκλ. D3						0,009			0,009	0,002			
Κυκλ. E	0,001				0,007		0,003	0,006					
Ki67	0,001			<0,001		0,001	<0,001	<0,001					

Παρόμοιες στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις προέκυψαν κατόπιν στατιστικής ανάλυσης με τον έλεγχο Pearson. Αναλυτικότερα, από τη στατιστική μελέτη κατά Spearman και Pearson διαπιστώθηκαν ότι:

1. Η έκφραση της πρωτεΐνης p53 συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών pRb ($p < 0,001$), p27 ($p = 0,001$), κυκλίνης A ($p = 0,001$), κυκλίνης B1 ($p < 0,001$), κυκλίνης D1 ($p < 0,001$), κυκλίνης E ($p = 0,001$) και Ki67 ($p = 0,001$).
2. Η έκφραση της πρωτεΐνης p21 συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p27 ($p = 0,003$), κυκλίνης A ($p < 0,001$), κυκλίνης B1 ($p = 0,007$) και κυκλίνης D2 ($p = 0,007$).
3. Η έκφραση της πρωτεΐνης p16 συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση της κυκλίνης B1 ($p < 0,001$).
4. Η έκφραση της πρωτεΐνης pRb συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 ($p < 0,001$), p21 ($p = 0,003$), p27 ($p < 0,001$), κυκλίνης A ($p < 0,001$), κυκλίνης B1 ($p = 0,001$) και Ki67 ($p < 0,001$).
5. Η έκφραση της πρωτεΐνης p27 συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 ($p = 0,001$), p21 ($p < 0,001$), Rb ($p < 0,001$), κυκλίνης A ($p < 0,001$), κυκλίνης B1 ($p < 0,001$), κυκλίνης D3 ($p = 0,003$) και Ki67 ($p = 0,001$).

6. Η έκφραση της κυκλίνης A συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 ($p < 0,001$), p21 ($p < 0,001$), pRb ($p < 0,001$), p27 ($p < 0,001$), κυκλίνης B1 ($p < 0,001$), κυκλίνης E ($p = 0,003$) και Ki67 ($p < 0,001$).
7. Η έκφραση της κυκλίνης B1 συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 ($p < 0,001$), p21 ($p = 0,007$), pRb ($p < 0,001$), p27 ($p < 0,001$), κυκλίνης A ($p < 0,001$), κυκλίνης E ($p = 0,006$) και Ki67 ($p < 0,001$).
8. Η έκφραση της κυκλίνης D1 συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση της κυκλίνης D3 ($p = 0,009$).
9. Η έκφραση της κυκλίνης D2 συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης p21 ($p = 0,007$).
10. Η έκφραση της κυκλίνης D3 συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης p21 ($p = 0,009$), κυκλίνης D1 ($p = 0,009$), κυκλίνης D2 ($p = 0,002$).
11. Η έκφραση της κυκλίνης E συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 ($p = 0,001$), p16 ($p = 0,007$), κυκλίνης A ($p = 0,003$) και κυκλίνης B1 ($p = 0,006$).
12. Η έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 ($p = 0,001$), pRb ($p < 0,001$), p27 ($p = 0,001$), κυκλίνης A ($p < 0,001$) και κυκλίνης B1 ($p < 0,001$).

Εν συνεχεία, οι περιπτώσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε θετικές και αρνητικές, χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας το 10% για τις πρωτεΐνες p53, p21, MDM2, p16, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3 και κυκλίνη E, και ως κατώτερο όριο θετικότητας το 30% για τις πρωτεΐνες pRb, p27 και Ki67. Εφαρμόστηκε για τη στατιστική ανάλυση ο έλεγχος U των Mann-Whitney.

Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις από τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών ανά ζεύγη (ομαδοποιημένες μεταβλητές) παρατίθενται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις των κατηγοριοποιημένων τιμών της έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν ανά ζεύγη (στατιστικός έλεγχος U κατά Mann-Whitney).

Κατηγοριοποιημένες μεταβλητές	p53	p21	MDM2	Rb	p16	p27	Κυκλ. A	Κυκλ. B1	Κυκλ. D1	Κυκλ. D2	Κυκλ. D3	Κυκλ. E	Ki67
p53				0,001	0,027	0,003	0,002	<0,001				0,003	0,002
p21										0,003	0,005	0,027	
MDM2	0,005			0,006					0,001		0,001		
pRb	0,003				0,05	0,031	<0,001	0,014		0,009			<0,001
p16												0,046	
p27				0,037									
Κυκλ. A	0,055			0,012				0,001					
Κυκλ. B1	0,041	0,001					0,001					0,001	0,040
Κυκλ. D1					0,049					0,005			
Κυκλ. D2		0,016											
Κυκλ. D3									0,048				
Κυκλ. E													
Ki67				0,013			0,010	0,038					

Με τη στατιστική ανάλυση αυτή παρατηρήθηκαν επιπλέον συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών p53 και p16 ($p=0,027$), p21 και κυκλίνης D3 ($p=0,005$), p21 και κυκλίνης E ($p=0,027$), MDM2 και pRb ($p=0,006$), MDM2 και κυκλίνης D1 ($p=0,001$), MDM2 και κυκλίνης D3 ($p=0,001$), pRb και p16 ($p=0,05$), pRb και κυκλίνης D2 ($p=0,009$), p16 και κυκλίνης E ($p=0,046$), κυκλίνης D1 και p16 ($p=0,049$), κυκλίνης D1 και κυκλίνης D2 ($p=0,005$).

2.7. Συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, pRb, p16, p27 και κυκλίνης E.

Σε αυτή την ανάλυση, οι περιπτώσεις κατατάχθηκαν σε επιμέρους κατηγορίες σύμφωνα με την υψηλή ή χαμηλή έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21, pRb, p16, p27 και κυκλίνης E (Πίνακας 10).

Πίνακας 8. Πρότυπα συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, Rb, p16, p27 και κυκλίνης E.

Πρότυπα συνδυασμένης έκφρασης	Αρ. περιπτώσεων	%
p53 + / p21 +	14	11,023
p53 + / p21 -	45	35,43
p53 - / p21 +	11	8,66
p53 - / p21 -	57	44,88
pRb + / p16 +	20	15,50
pRb + / p16 -	91	70,54
pRb - / p16 +	0	0
pRb - / p16 -	18	13,95
p27 + / κυκλίνη E +	4	3,14
p27 + / κυκλίνη E -	111	87,40
p27 - / κυκλίνη E +	0	0
p27 - / κυκλίνη E -	12	9,44

Διαπιστώθηκε ότι 14/127 (11.023%) περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων παρουσίαζαν πρότυπο συνδυασμένης υψηλής έκφρασης των πρωτεϊνών p53 και p21 ενώ 57/127 (44,88%) περιπτώσεις παρουσίαζαν πρότυπο συνδυασμένης χαμηλής έκφρασης. Σε 45/127 (35,43%) περιπτώσεις παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση μόνο της πρωτεΐνης p53 και σε 11/127 (8,66%) περιπτώσεις παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση μόνο της πρωτεΐνης p21.

Σε ότι αφορά την έκφραση των πρωτεϊνών pRb και p16 διαπιστώθηκε ότι συνδυασμένη χαμηλή έκφραση παρατηρήθηκε σε 18/129 (13,95%) περιπτώσεις και συνδυασμένη υψηλή έκφραση σε 20/129 (15,50%) περιπτώσεις. Σε 91/129 (70,54%) περιπτώσεις αναδείχθηκε χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης p16 και υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης pRb ενώ σε καμία περίπτωση (0%) δεν διαπιστώθηκε χαμηλή έκφραση της pRb πρωτεΐνης και υψηλή έκφραση της p16 πρωτεΐνης.

Η ανάλυση της συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών p27 και κυκλίνης E έδειξε ταυτόχρονα υψηλή έκφραση και των δύο πρωτεϊνών σε 4/127 (3.14%) περιπτώσεις και χαμηλή έκφραση σε 12/127 (9,44%) περιπτώσεις. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων (111/127 περιπτώσεις, ποσοστό 87,40%) παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση μόνο της πρωτεΐνης p27 ενώ σε καμία από τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε αποκλειστικά υψηλή έκφραση της κυκλίνης E.

Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε διαταραχή του p53 μονοπατιού (p53 pathway) σε 116/127 (91,33%) περιπτώσεις και συγκεκριμένα στις περιπτώσεις με συνδυασμένο πρότυπο έκφρασης: p53+ / p21+, p53+ / p21- και p53- / p21-. Επιπλέον διαταραχή του pRb μονοπατιού (pRb pathway) παρατηρήθηκε σε 109/129 (84,49%) περιπτώσεις και συγκεκριμένα στις περιπτώσεις με συνδυασμένο πρότυπο έκφρασης pRb+ / p16-, και pRb- / p16-. Σε ελάχιστες περιπτώσεις φαίνεται να διαταράσσεται το p27 μονοπάτι (p27 pathway) και αυτές αφορούν περιπτώσεις με συνδυασμένα πρότυπα έκφρασης p27+ / κυκλίνη E+ και p27- / κυκλίνη E-. Δεν παρατηρήθηκαν περιπτώσεις με p27- / κυκλίνη E+ συνδυαστική έκφραση.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου αποτελεί μια από τις συχνότερες κακοήθειες και συνεχίζει να αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως.

Ο ιστολογικός τύπος και το στάδιο της νόσου αποτελούν σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες για την επιβίωση των ασθενών, ωστόσο τα ποσοστά επιβίωσης συχνά ποικίλουν ακόμη και σε ασθενείς με όγκους παρομοίου ιστολογικού τύπου και σταδίου. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στη συμμετοχή μοριακών παραμέτρων που εμπλέκονται στην εξέλιξη, τη διηθητική επέκταση και μεταστατική ικανότητα του νεοπλασματος. Πρόσφατες μελέτες εισηγούνται την παρουσία διαφόρων γενετικών ή/και επιγενετικών αλλαγών που ενοχοποιούνται τόσο για την καρκινογένεση όσο και για την πρόοδο και εξέλιξη του καρκινώματος του στομάχου.

Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53, pRb, p21, p27, p16, MDM₂, κυκλίνη A, κυκλίνη B, κυκλίνη D₁, κυκλίνη D₂, κυκλίνη D₃ κυκλίνη E και Ki67.

Αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης p53 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 27,92% των περιπτώσεων αδενοκαρκινώματος στομάχου που μελετήθηκαν. Σε ανάλογες προηγούμενες μελέτες η έκφραση της πρωτεΐνης κυμαίνεται από 4% έως 70%²¹⁰⁻²¹². Σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων μελετών, έκφραση της πρωτεΐνης δεν παρατηρήθηκε στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο²¹³⁻²¹⁵. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι η παρουσία της πρωτεΐνης στα νεοπλασματικά κύτταρα οφείλεται πιθανότατα σε μεταλλάξεις του p53 γονιδίου.

Η έκφραση της πρωτεΐνης p53 στα νεοπλασματικά κύτταρα ήταν εξαιρετικά ετερογενής. Η ετερογένεια της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης έχει αποδοθεί βιβλιογραφικά είτε στην αυτή καθαυτή ετερογένεια του όγκου, είτε σε ειδικές μεταλλάξεις του γονιδίου ή σε μεταβολές των επιπέδων της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

Στην παρούσα μελέτη, δεν αναδείχτηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της πρωτεϊνικής έκφρασης με το βαθμό διαφοροποίησης, τον ιστολογικό τύπο, το βάθος διήθησης και την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Τα ευρήματα αυτά, συμφωνούν με τα ευρήματα μερικών μελετών²¹⁶⁻²²², αλλά αντιτίθενται με τα ευρήματα άλλων, τα οποία δεν αναδεικνύουν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 και των προαναφερθέντων ιστολογικών παραμέτρων^{183,210,211,213,217}.

Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα ερευνητικών μελετών αναφορικά με την προγνωστική αξία της έκφρασης της πρωτεΐνης p53. Σε ορισμένες μελέτες, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης είναι ανεξάρτητος δείκτης πρόγνωσης^{212,213,215}, ενώ σε άλλες δεν βρέθηκε να έχει προγνωστική αξία^{223,224,228}. Στην μελέτη μας, η συσχέτιση της έκφρασης της

πρωτεΐνης με φτωχή επιβίωση αναδεικνύει τον προγνωστικό της ρόλο στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα στομάχου.

Οι διαφορές των αποτελεσμάτων που παρατηρούνται στις διάφορες μελέτες, είναι δυνατόν να αποδοθούν σε διαφορές που αφορούν την επιλογή των ασθενών, τον τρόπο μονιμοποίησης των ιστών, τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, τις ανοσοϊστοχημικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν και τα κατώτερα όρια ανοσοϊστοχημικής θετικότητας που έχουν επιλεγεί. Αν και η ευαισθησία της ανοσοϊστοχημικής ανάδειξης της πρωτεΐνης p53, ως δείκτη υποκείμενης μετάλλαξης, ανέρχεται σε ποσοστό 80%, πρέπει πάντοτε να λαμβάνονται υπόψιν οι μεθοδολογικοί παράγοντες για την ερμηνεία των παρατηρούμενων διαφορών στη συχνότητα ανίχνευσης της πρωτεΐνης, μεταξύ των διαφόρων σειρών. Τονίζεται επιπλέον, ότι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης αντανακλά σε μεταλλάξεις που αφορούν συγκεκριμένα τμήματα του γονιδιώματος της p53. Συνεπώς, αν οι μεταλλάξεις εμφανίζονται σε άλλα τμήματα, αυτές δεν είναι δυνατόν να αναδειχθούν ανοσοϊστοχημικά. Σε ότι αφορά την επιλογή του κατώτερου ορίου θετικότητας της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης, στη μελέτη μας και σε συμφωνία με τους περισσότερους ερευνητές^{20,213,226}, ως όριο θετικότητας ορίστηκε το 10%, δεδομένου ότι, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης σε χαμηλότερο ποσοστό νεοπλασματικών κυττάρων δεν σχετίζεται με την παρουσία μεταλλάξεων.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 με την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο κυτταρικό κύκλο, όπως τις κυκλίνες A, B1, D₁, E και την πρωτεΐνη Ki67. Και σε προηγούμενες μελέτες καρκινωμάτων στομάχου, έχουν περιγραφεί συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της p53 και των πρωτεϊνών κυκλίνης B1 και Ki67^{225,227-229}. Το εύρημα αυτό, ενισχύει την άποψη της εμπλοκής της πρωτεΐνης p53 στον κυτταρικό κύκλο, στην κυτταρική αύξηση και στο αυξητικό δυναμικό του νεοπλασματος.

Επιπλέον, στη μελέτη αυτή βρέθηκε αναλογική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης και της έκφρασης των πρωτεϊνών pRb και p27. Ελάχιστα δεδομένα περιγράφονται στη βιβλιογραφία αναφορικά με τη συσχέτιση μεταξύ των p53 και p27 πρωτεϊνών. Τα ευρήματα μελετών, σε αντίθεση με τα δικά μας, υποδεικνύουν αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασής τους και συγκεκριμένα ότι η υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης p53 βαίνει αναλογικά με την χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης p27²²⁶. Είναι γνωστό, ότι κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης και κατά την εξέλιξη ενός νεοπλασματος, η έκφραση της πρωτεΐνης p27 ελαττώνεται, γεγονός που αποδίδεται σε απενεργοποίηση του γονιδίου. Η απενεργοποίηση προκαλείται μέσω πρωτεόλυσης ή φωσφορυλίωσης, όπου σημαντικό ρόλο παίζουν το σύστημα ουβικιτίνης και σύμπλεγμα κυκλίνης E-CDK2, αντίστοιχα. Στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου, η χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης p27 έχει συσχετισθεί με τον υψηλό βαθμό κακοηθείας, την αγγειακή διήθηση και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις^{112,183,186-188,227}. Στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκαν παρόμοιες συσχετίσεις.

Διαταραχές στους μηχανισμούς απενεργοποίησης ή λειτουργικής αδρανοποίησης της πρωτεΐνης p27 πιθανώς να ενοχοποιούνται για τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης που έχουν παρατηρηθεί στην πλειονότητα των περιπτώσεων που αναλύθηκαν στη μελέτη αυτή.

Έκφραση της πρωτεΐνης pRb παρατηρήθηκε στο 84,61% των περιπτώσεων που μελετήθηκαν. Έχει διατυπωθεί η άποψη, ότι αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης είναι δυνατόν να παρατηρείται από τα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης και να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης του γαστρικού καρκινώματος^{191,229,230}. Σε άλλες μελέτες, έχει περιγραφεί μια σταδιακή ελάττωση της έκφρασης της πρωτεΐνης από το φυσιολογικό, μεταπλαστικό, δυσπλαστικό και καρκινωμάτωδες γαστρικό επιθήλιο^{230,231}. Η λειτουργική κατάσταση της πρωτεΐνης pRb και επομένως τα επίπεδα έκφρασής της, καθορίζεται από την φωσφορυλίωσή της. Υποστηρίζεται ότι ανιχνεύεται κυρίως όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στη φωσφορυλιωμένη και σε πολύ μικρότερο βαθμό όταν αυτή βρίσκεται στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή. Στην δική μας μελέτη, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης pRb υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται σε φωσφορυλιωμένη (ενεργό) μορφή.

Η ανάλυση των συσχετίσεων της έκφρασης της πρωτεΐνης pRb με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους έχει δώσει αντιφατικά αποτελέσματα. Στις περισσότερες μελέτες καρκινωμάτων στομάχου, η ελαττωμένη έκφραση της πρωτεΐνης pRb έχει συσχετισθεί με δυσμενείς κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, όπως εκτεταμένο βάθος διήθησης και λεμφαδενικές μεταστάσεις^{229,231,232}. Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση της πρωτεΐνης σχετίστηκε με το χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης. Παρόμοια συσχέτιση έχει περιγραφεί σε μερικές μελέτες αλλά όχι σε άλλες^{231,233-235}.

Επίσης έχουν περιγραφεί διαφορές στην έκφραση της pRb μεταξύ πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας. Χαμηλότερη έκφραση αναφέρεται συχνότερα στις λεμφαδενικές μεταστάσεις²³⁵ συγκριτικά με τις πρωτοπαθείς εστίες, εύρημα που θα μπορούσε να οφείλεται σε διαφορετικές συνοδές γονιδιακές διαταραχές ή διαφορές στο μικροπεριβάλλον του όγκου (pRb₆). Στη δική μας μελέτη, όπως και σε άλλες μελέτες, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση της πρωτεΐνης pRb μεταξύ πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας.

Στην παρούσα μελέτη ανευρέθηκε στατιστικώς σημαντικά θετική συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης pRb με τις κυκλίνες A και B₁ καθώς και με την πρωτεΐνη Ki67. Το εύρημα πιθανώς να οφείλεται σε λειτουργική διαταραχή της pRb η οποία επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Διαταραχές της έκφρασης των πρωτεϊνών p16 ή κυκλίνης D₁ ή CDK4/6 θα μπορούσαν να ενοχοποιηθούν για τη διαταραγμένη λειτουργία της pRb σηματοδοτικής οδού. Επιπλέον, στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης pRb με την έκφραση των πρωτεϊνών p21 και p27. Οι πρωτεΐνες p21 και p27 αποτελούν σημαντικούς αναστολείς της προόδου του κυτταρικού κύκλου, η ανασταλτική τους

δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αναμένεται επομένως να έχει επιπτώσεις στην εξέλιξη του όγκου.

Στην παρούσα μελέτη, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p16 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 15,38% των περιπτώσεων. Στις περισσότερες μελέτες κακοήθων νεοπλασμάτων, συμπεριλαμβανομένων και των αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου, αναφέρονται χαμηλά ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης, ενώ τα υψηλότερα ποσοστά έκφρασης που έχουν καταγραφεί ανέρχονται στο 53%. Υπάρχουν δεδομένα που εισηγούνται, ότι η χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των γαστρικών καρκινωμάτων που σχετίζονται με τον ιό Epstein Barr²³².

Η ελαττωμένη πρωτεϊνική έκφραση θα μπορούσε να αποδοθεί σε απενεργοποίηση του γονιδίου. Η απενεργοποίηση του γονιδίου p16 αποτελεί μια από τις συχνότερες γενετικές διαταραχές των κακοήθων νεοπλασμάτων και οφείλεται σε μεταλλάξεις, απαλείψεις ή μεθυλίωσεις²³⁰. Η μεθυλίωση επισυμβαίνει στην πλειονότητα των γαστρικών καρκινωμάτων, ενώ οι μεταλλάξεις ή απαλείψεις είναι εξαιρετικά σπάνιες (0% έως 13% στις διάφορες σειρές)²³⁰. Από τις διαφορές της μειωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης p16 (11% - 53%) και του ποσοστού μεθυλίωσης (18% - 87%) που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, ενισχύεται η άποψη μερικών ερευνητών ότι η μεθυλίωση του p16 γονιδίου δεν οδηγεί πάντοτε σε μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι, όταν η μεθυλίωση είναι μερική ή μη καίρια, η πρωτεΐνη p16 μπορεί να διατηρεί την ανασταλτική της δράση.

Σε διάφορες μελέτες βρέθηκαν συσχετίσεις της μεθυλίωσης με το χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης και της χαμηλής ανοσοϊστοχημικής έκφρασης με το βάθος διήθησης και την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων^{191,218-230}. Στην παρούσα μελέτη, όπως και σε άλλες μελέτες^{234,236}, δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης p16 με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους που εξετάστηκαν, ωστόσο επιβεβαιώνεται η συχνή ύπαρξη απενεργοποίησης του γονιδίου P16. Τέλος, διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης p16 και της κυκλίνης B1, εύρημα που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης p16 κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Διαταραχές των γονιδίων των κυκλινών D έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες σειρές αδενοκαρκινωμάτων στομάχου. Οι συχνότερες διαταραχές αφορούν σε μεταλλάξεις, οι οποίες οδηγούν σε αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση. Στην παρούσα μελέτη, ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D1 παρατηρήθηκε σε ελάχιστες περιπτώσεις (ποσοστό 3,07%). Στις περιορισμένες υπάρχουσες μελέτες, τα ποσοστά ανοσοϊστοχημικής έκφρασης κυμαίνονται από 20-50% των γαστρικών καρκινωμάτων^{147,225}. Οι διαφορές της πρωτεϊνικής έκφρασης πιθανώς να οφείλονται σε διαφορές των μεθοδολογιών ή των αντισωμάτων που

εφαρμόζονται. Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα μελετών όσον αφορά τις συσχετίσεις της έκφρασης της κυκλίνης D1 με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Σε μερικές μελέτες αναφέρεται συσχέτιση της έκφρασης με το χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης^{152,154,155,164} ενώ σε άλλες, όπως και στη δική μας, δεν παρατηρούνται σημαντικές συσχετίσεις. Μελέτες της προγνωστικής αξίας της κυκλίνης D1 έχουν δώσει επίσης αντιφατικά αποτελέσματα, με τις περισσότερες από αυτές να εισηγούνται τη συσχέτιση της έκφρασης με δυσμενή πρόγνωση^{146,150,155,237,239}.

Όσον αφορά τις κυκλίνες D2 και D3 και το ρόλο τους στο γαστρικό καρκίνο λίγα είναι γνωστά. Η έκφραση της κυκλίνης D2 ανέρχεται σε ποσοστό έως 25% στις διάφορες σειρές και έχει παρατηρηθεί συχνότερα σε καρκινώματα προχωρημένου σταδίου¹⁵⁰. Το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώνεται από άλλες μελέτες²⁵³. Στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκε έκφραση της κυκλίνης D2 στο 23% των περιπτώσεων. και παρατηρήθηκε συχνότερα στα καρκινώματα διαχύτου τύπου, εύρημα το οποίο υποδηλώνει την παρουσία έκφρασης σε επιθετικότερες μορφές καρκινωμάτων. Ως προς την κυκλίνη D3, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της κυκλίνης D3 και της έκφρασης της πρωτεΐνης p27. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να υποδηλώσει την συμμετοχή του μονοπατιού της p27 στη δράση της κυκλίνης D3 τουλάχιστον σε μία υποομάδα ασθενών με γαστρικό καρκίνωμα.

Ως προς την κυκλίνη E, αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα εισηγούνται συσχέτιση της αυξημένης έκφρασης με επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά^{159,164,188}. Η αυξημένη έκφραση της κυκλίνης E οφείλεται κυρίως σε ενίσχυση του γονιδίου και έχει περιγραφεί σε ποσοστό 10% των διαχύτου τύπου και σε ποσοστό 20% των εντερικού τύπου καρκινωμάτων.. Στη δική μας μελέτη, έκφραση της κυκλίνης E παρατηρήθηκε σε μικρό ποσοστό των περιπτώσεων (3.07%) και συσχέτισθηκε με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 και p16, καθώς και με την έκφραση των μιτωτικών κυκλινών A και B1^{240,241}. Το εύρημα αυτό είναι σημαντικό και υποδηλώνει τη σημαντική εμπλοκή της κυκλίνης E στην εξέλιξη και πρόοδο του γαστρικού καρκίνου. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της κυκλίνης E με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Οι δύο πολύ σημαντικές ρυθμιστικές κυκλίνες του κυτταρικού κύκλου, η κυκλίνη A και η κυκλίνη B έχουν μελετηθεί ευρέως σε ποικίλους τύπους κακοήθων νεοπλασμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού καρκίνου^{149,156-158}. Στην πλειονότητα των μελετών διαφαίνεται συσχέτιση της έκφρασης των κυκλινών με προχωρημένα στάδια γαστρικού καρκίνου, παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και μικρή επιβίωση ασθενών^{149,156-158}. Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση της κυκλίνης A σχετίστηκε με την αγγειακή διήθηση και της κυκλίνης B1 με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη:

1. Αναδείχθηκαν υψηλά επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p53, pRb και p27 με ποσοστά 45,38%, 84,61% και 88,46% αντίστοιχα. Το εύρημα αυτό, υποδηλώνει την εμπλοκή τους στην εξέλιξη και πρόοδο του γαστρικού καρκίνου και πιθανώς και στην καρκινογένεση του στομάχου.
2. Διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης pRb με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, της κυκλίνης A με τη διήθηση αγγείων, της κυκλίνης B1 με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και της κυκλίνης D2 με τον ιστολογικό τύπο.
3. Παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών p53, p21, pRb, και p27 με τις μιτωτικές κυκλίνες A και B1, καθώς και με την πρωτεΐνη Ki67. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν τον κεντρικό ρόλο των πρωτεϊνών p53, p21, pRb και p27 στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.
4. Η ανάλυση της συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21, pRb, p16, p21 και κυκλίνης E έδειξε ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων καρκινωμάτων στομάχου παρατηρείται διαταραχή των p53 και pRb σηματοδοτικών μονοπατιών, ενώ εξαιρετικά σπάνια φαίνεται να διαταράσσεται το p27 μονοπάτι.
5. Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης p53 έχει προγνωστική αξία και αποτελεί δυσμενή παράγοντα πρόγνωσης, σχετιζόμενο με μικρή επιβίωση των ασθενών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτες των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκινώματος του στομάχου έχουν αναδείξει έναν κεντρικό ρόλο των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε συστηματική ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο και που συμβάλλουν στην καρκινογένεση.

Η μελέτη συμπεριέλαβε 130 περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων στομάχου στις οποίες διερευνήθηκαν: 1) η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb, p16 και p27, και 2) η ανοσοϊστοχημική έκφραση των κυκλινών A, B1, D1, D2, D3 και E και της πρωτεΐνης Ki67, προκειμένου να αναζητηθούν περαιτέρω παθογενετικοί μηχανισμοί του γαστρικού καρκινώματος. Επιπλέον, τα ευρήματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και με την κλινική έκβαση των ασθενών, προκειμένου να διερευνηθεί η προγνωστική αξία των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν.

Έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21, MDM2, pRb, p16, και p27 ανιχνεύθηκε στο 45,38%, 17,82%, 8,87%, 84,61%, 17,38% και 88,46% των περιπτώσεων αντίστοιχα. Έκφραση των πρωτεϊνών: κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και Ki67 διαπιστώθηκε στο 30,37%, 5,38%, 3,07%, 23,007%, 23,07%, 3,07% και 52,41% των περιπτώσεων αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ της πρωτεΐνης p53 και των πρωτεϊνών pRb, p27, Ki67, κυκλίνη A, κυκλίνη D1 και κυκλίνη E. Παρόμοιες θετικές συσχετίσεις αναδείχθηκαν μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης pRb και των πρωτεϊνών p27, p21, Ki67, κυκλίνη A και κυκλίνη B1. Τα ευρήματα αυτά, υποδηλώνουν τον κεντρικό ρόλο των πρωτεϊνών p53 και pRb στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στο καρκίνωμα του στομάχου.

Η μελέτη της συσχέτισης της έκφρασης των πρωτεϊνών με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης pRb σχετίζεται με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, η έκφραση της κυκλίνης A με τη διήθηση αγγείων, η έκφραση της κυκλίνης B1 με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και η έκφραση της κυκλίνης D2 με τον ιστολογικό τύπο. Επίσης,

διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης p53 σχετίζεται με μικρή επιβίωση των ασθενών.

Διαταραχή της p53 σηματοδοτικής οδού διαπιστώθηκε στο 91,33% των περιπτώσεων και συγκεκριμένα στις περιπτώσεις με συνδυασμένο πρότυπο έκφρασης: p53+ / p21+, p53+ / p21- και p53- / p21-. Επιπλέον διαταραχή της pRb σηματοδοτικής οδού παρατηρήθηκε σε 84,49% των περιπτώσεων και συγκεκριμένα στις περιπτώσεις με συνδυασμένο πρότυπο έκφρασης pRb+ / p16-, pRb+ / p16- και pRb- / p16-. Σε ελάχιστες περιπτώσεις φαίνεται να διαταράσσεται η p27 οδός και αυτές αφορούν περιπτώσεις με συνδυασμένα πρότυπα έκφρασης p27+ / κυκλίνη E+ και p27- / κυκλίνη E-.

Συμπερασματικά, η μελέτη της συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου ανέδειξε ότι οι κυριότερες σηματοδοτικές οδοί που διαταράσσονται στο καρκίνωμα του στομάχου είναι οι οδοί των πρωτεϊνών p53 και pRb, ενώ εξαιρετικά σπάνια φαίνεται να διαταράσσεται η σηματοδοτική οδός της πρωτεΐνης p27. Η έκφραση της πρωτεΐνης p53 σχετίζεται με την πρόγνωση των ασθενών και αποτελεί ανεξάρτητο δείκτη δυσμενούς έκβασης.

SUMMARY

Oncogenes and anti-oncogenes in gastric cancer

EUDOXIA SINTOU - MANTELA

Several studies of the molecular mechanisms that are involved in the pathogenesis of gastric cancer have demonstrated the central role of the cell cycle regulatory proteins. In the present study a systematic analysis of the immunohistochemical expression of the proteins that are involved in the cell cycle and implicated in carcinogenesis was performed.

In a total number of 130 cases of gastric adenocarcinomas we evaluated: 1) the immunohistochemical expression of the proteins p53, p21, MDM2, pRb, p16 and p27 as well as 2) the immunohistochemical expression of cyclins A, B1, D1, D2, D3, E and of Ki67 protein, in order to investigate further pathogenetic mechanisms of gastric cancer. Moreover, the immunohistochemical findings were correlated with clinicopathological parameters and clinical outcome in order to assess any prognostic value of the studied proteins.

Immunohistochemical expression of p53, p21, MDM2, pRb, p16 and p27 proteins was detected in 45.38%, 17.82%, 8.87%, 84.61%, 17.38% and 88.46% of the cases, respectively. Expression of cyclins A, B1, D1, D2, D3, E and of Ki67 protein was found in 30.37%, 5.38%, 3.07%, 23.007%, 23.07%, 3.07% and 52.41% of the cases, respectively. Statistically significant positive correlations were observed between p53 protein expression and the expression of pRb, p27, Ki67, cyclin A, cyclin D1 and cyclin E. Additionally, positive correlations between the expression of pRb protein and the expression of p27, p21, Ki67, cyclin A and cyclin B1 were detected. These findings suggest the crucial role of p53 and pRb proteins in the progress of cell cycle in gastric cancer.

The statistical analysis of the protein expression with the clinicopathological parameters showed significant correlations between the expression of pRb protein with the histological grade, the expression of cyclin A with the vessel invasion, the expression of cyclin B1 with the lymph node metastasis and the expression of cyclin D2 with the histological type. Moreover, the expression of p53 protein was correlated with poor patient overall survival.

Alterations of the p53 pathway were detected in 91.33% of the cases and mainly in the cases with combined expression patterns p53+/p21+, p53+/p21- and p53-/p21-. Alterations of the Rb pathway were observed in 84.49% of the cases and especially in the cases with combined expression patterns pRb+/p16- and pRb-/p16-. In rare cases with

combined expression patterns p27+/cyclinE+ and p27-/cyclin E-, alterations of the p27 pathway were observed.

In conclusion, the study of the combined immunohistochemical expression of the cell cycle proteins showed common alterations of the p53 and Rb pathways while the p27 pathway is altered in frequently. The expression of p53 protein was correlated with patient survival and seems to have an independent adverse prognostic value.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 2000, *World Health Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system* Lyon.
2. Fenoglio-Preiser C. M., Noffsinger A. E., Stemmermann G. N., & Isaacson P. G. 2007, *Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text*, 3 edn, Lippincott Williams & Wilkins.
3. Λαρίου Κ. Καρκίνος του στομάχου - Ιστολογική Ταξινόμηση.
www.exe1928.gr/static/media/2011/07/38.doc. 2011. Ref Type: Electronic Citation.
4. Koyama Y, Okayama H, Kumamoto K, Saito K, Nakamura I, Ohki S, Takenoshita S. Overexpression of endoglin (CD105) is associated with recurrence in radically resected gastric cancer. *Exp Ther Med* 2010; 4: 627-633.
5. Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of extension of gastric cancer classified by histological types: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut* 1992; 33: 606-612.
6. Ming SC. Gastric carcinoma: a pathological classification. *Cancer* 1977; 39: 2745-2485.
7. Washington, K., Berlin, J., Branton, P., Burgart, L. J., Carter, D. K., Fitzgibbons, P., Frankel, W. L., Jessup, J., Kakar, S., Minsky, B., Nakhleh, R., & Compton, C. C. http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2011/Stomach_11p_rotocol.pdf . 2011. Ref Type: Electronic Citation.
8. Breaux JR, Bringaze W, Chappuis C, Cohn I jr. Adenocarcinoma of the stomach: a review of 35 years and 1,710 cases . *Wrld J Surg* 1990; 14: 580-586.
9. Maruyama K. The most important prognostic factors for gastric cancer patients: a study using univariate and multivariate analyses. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 63-68.
10. Shiu MH, Moore E, Sanders M, et al. Influence of the extent of resection on survival after curative treatment of gastric carcinoma: a retrospective multivariate analysis. *Arch Surg* 1987; 122: 1347-1351.
11. Giles GR. Staging and prognostic determination of gastric cancer. In: PE Preece, A Gushieri, JM Wellwood (ed), *Cancer of the Stomach*, Grune and Stratton Ed, London 1986, pp: 89.
12. Msika S, Chastang C, Houry S, Lacaine F, et al. Lymph node involvement as the only prognostic factor in curative resected gastric carcinoma: a multivariate analysis. *World J Surg* 1989; 13: 118-123.
13. Baba H, Korenaga D, Okamura T, et al. Prognostic factors in gastric cancer with serosal invasion. *Arch Surg* 1989; 124: 1061-1064.

14. Bozzetti F, Bonfanti G, Morabit A, et al. A multifactorial approach for the prognosis of patients with carcinoma of the stomach after curative resection. *Surg Gynecol Obstet* 1986; 162: 229-234.
15. Schmitz-Moorman P, Phol C, Huttich C, Himmelmann GW. Prediction of prognosis in patients with gastric cancer by quantitative morphology and multivariate analysis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 58-62.
16. Hoerr SO. Prognosis for carcinoma of the stomach. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 137: 205-209.
17. Habu H, Takeshita K, Sunagawa M, Endo M. Prognostic factors of early gastric cancer: results of long term. *Jpn J Surg* 1987; 17: 248-255.
18. Borrmann R. Geschwulste des Magens und Duodenums. In: Henke F, Lubarsch O (eds): *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*. Berlin, Springer-Verlag, 1926, vol IV/I, pp: 865-1095.
19. Howley PR, Westerholm, P, Morson BC. Pathology and prognosis of carcinoma of the stomach. *Br J Surg* 1970; 57: 877-883.
20. Viste A, Eide GE, Halvorsen K, et al. Lauren's histologic classification and ABO blood group as prognostic factors for patients with stomach carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 49-50.
21. Davessar K, Pezzulo JC, Kessimian N, et al. Gastric adenocarcinoma: prognostic significance of several pathologic parameters and histologic classifications. *Hum Pathol* 1990; 21: 325-332.
22. Roder JD, Bottcher K, Siewert JR, et al. Prognostic factors in gastric carcinoma. *Cancer* 1993; 72: 2089-2097.
23. ReMine W, Gomes M, Dockerty M. Long term survival (10 to 56 years) after surgery for carcinoma of the stomach. *Am J Surg* 1969; 117: 177-184.
24. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of disease*. 4th ed, Philadelphia, WB Saunders Co, 1989, pp: 249-250.
25. ReMine WH, Dockerty MB, Priestly JT. Some factors which influence prognosis in surgical treatment of gastric carcinoma. *Ann Surg* 1953; 138: 311-319.
26. Sjostedt S, Pieper R. Gastric cancer. Factors influencing longterm survival and postoperative mortality. *Acta Chir Scand* 1986; 530(Suppl): 25-29.
27. Ohman U, Wetterfors J, Moberg A. Ulcer-cancer of the stomach. *Acta Chir Scand* 1972; 138: 391-395.
28. Noguch Y. Blood vessel invasion in gastric carcinoma. *Surgery* 1990; 107: 140-148.
29. Gabbert HE, Meier S, Gerharz CD, Hommel G. Incidence and prognostic significance of vascular invasion in 529 gastric cancer patients. *Int J Cancer* 1991; 49: 203-207.

30. Ming SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer* 1977; 39: 2475-2485.
31. Iwasaki K, Torisu M, Fujimura T. Malignant tumor and eosinophils. Prognostic significance in gastric cancer. *Cancer* 1986; 58: 1321-1327.
32. Songun I, van de Velde CJH, Hermans J, et al. Expression of oncoproteins and the amount of eosinophilic and lymphocytic infiltrates can be used as prognostic factors in gastric cancer. *Br J Cancer* 1996; 74: 1783-1788.
33. Yu CC_W, Levison DA, Dunn JA, et al. Pathological prognostic factors in the second British stomach cancer group trial of adjuvant therapy in resectable gastric cancer. *Br J Cancer* 1995; 71: 1106-1110.
34. Okusa T, Nakane Y, Boku T, et al. Quantitative analysis of nodal involvement with respect to survival rate after curative gastrectomy for carcinoma. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 170: 448-494.
35. Kim JP, Jung SE. Patients with gastric cancer and their prognosis in accordance with number of lymph node metastasis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 33-35.
36. Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119: 265-272.
37. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19: 484-490.
38. Kasagi N, Gomyo Y, Shirai H, et al. Apoptotic cell death in human gastric carcinoma: Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 939-945.
39. Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H, et al. Loss of heterozygosity at the bcl-2 gene locus and expression of bcl-2 in human gastric and colorectal carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 584-591.
40. Han JH, Yanagisawa A, Kato Y, et al. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 5087-5089.
41. Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y et al. Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 4595-4597.
42. Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, et al. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer* 1996; 77(suppl 8): 1620-1628.
43. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* 1994; 9: 29-32.
44. Seruca R, Santos NR, David L, et al. Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinicopathologic profile. *Int J Cancer* 1995; 64: 32-36.
45. Strickler JG, Zheng J, Shu Q, et al. p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fails. *Cancer Res* 1994; 54: 4750-4755.

46. Horii A, Han JH, Shimada M, et al. Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. *Cancer Res* 1994; 54: 3373-3375.
47. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. Genetics, natural history, tumour spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colon cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535-1549.
48. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1988; 85: 6622-6626.
49. Greider CW, Blackburn EH. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* 1996; 274: 92-97.
50. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-573.
51. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2015.
52. Harley CB, Vileponteau B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 249-255.
53. Rhyu MS. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 884-894.
54. Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, et al. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1245-1251.
55. Coussens L, Yang-Feug TL, Liao OYK, et al. Tyrosine-kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu-oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-1139.
56. Kameda T, Yasui W, Yoshida K, et al. Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185^{erb2} expression and the gene amplification. *Cancer Res* 1990; 50: 8002-8009.
57. Flack VG, Gullik WJ. C-erbB-2 oncogene product staining in gastric adenocarcinoma, an immunohistochemical study. *J Pathol* 1989; 159: 107-111.
58. Houldsworth J, Cordon-Cardo C, Ladanyi M, et al. Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1990; 50: 6417-6422.
59. Jain S, Isabel Filipe M, Gullick WJ, et al. c-erbB-2 proto-oncogene expression and its relationship to survival in gastric carcinoma: an immunohistochemical study on archival material. *Int J Cancer* 1991; 48: 668-671.
60. Lemoine NR, Jains S, Silvestre F, et al. Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *Br J Cancer* 1991; 64: 79-83.

61. Ranzani GN, Pellegata NS, Previdere C, et al. Heterogeneous proto-oncogene amplification correlates with tumor progression and presence of metastasis in gastric cancer patients. *Cancer Res* 1990; 50: 7811-7814.
62. Shun CT, Wu MS, Lin JT, et al. Relationship of p53 and c-erbB-2 expression to histopathological features, *Helicobacter pylori* infection and prognosis in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 604-609.
63. David L, Seruca R, Nesland JM, et al. c-erbB-2 expression in primary gastric carcinomas and their metastases. *Mod Pathol* 1992; 5: 384-390.
64. Ohguri T, Sato Y, Koizumi W, et al. In immunohistochemical study of c-erbB-2 protein in gastric carcinomas and lymph node metastases: Is the c-erbB-2 protein really a prognostic indicator? *Int J Cancer* 1993; 53: 75-79.
65. Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, et al. Evaluation of immunoreactivity for c-erbB-2 protein as a marker for poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 1034-1038.
66. Hilton DA, West KP. c-erbB-2 oncogene product expression and prognosis in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1992; 45: 454-456.
67. Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, et al. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. *Cancer* 1993; 72: 3179-3184.
68. Sasano H, Date F, Imatani A, et al. Double immunostaining for c-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells. *Hum Pathol* 1993; 24: 584-589.
69. Fincel T, Der CJ, Cooper GM. Activation of ras genes in human tumors does not affect localization, modification, or nucleotide binding properties of p21. *Cell* 1984; 37: 151-158.
70. Hurley JB, Simon MI, Teplow DB, et al. Homologies between signal-transducing G-proteins and ras gene products. *Science* 1984; 226: 860-863.
71. Kamata T, Feramiso JR. Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogene protein. *Nature* 1984; 310: 147-150.
72. Newbold R. Mutant ras proteins and cell transformation. *Nature* 1985; 310: 628-629.
73. Barbacid M. Ras genes. *Ann. Rev. Biochem.* 1987; 56:779-827.
74. Nagata Y, Abe M, Kobayashi K. Glycine to aspartic acid mutation at codon 13 of c-k-ras gene in human gastrointestinal cancer. *Cancer Res.* 1990; 50: 480-482.
75. Nanus OM, Kelsen OP, Altorki MN, Albiono AP. Infrequent point mutations of ras oncogene in gastric cancer. *Gastroenterology* 1990; 98: 955-960.
76. Spandidos DA, Wilkie NM. Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 1984; 310: 469-475.

77. Deng G, Liu X, Wang J. Correlation of mutations of oncogene c-Ha-ras at codon 12 with metastases and survival of gastric cancer patients. *Oncogene Res* 1991; 6: 33-38.
78. Tahara E, Yasui W, Taniyama K, et al. Ha-ras oncogene product in human gastric carcinoma: correlation with invasiveness, metastasis, or prognosis. *Jpn J Cancer Res* 1986; 77:517-522.
79. Yosbida K, Harnatani K, Koide H, et al. Analysis of ras gene expression in stomach cancer by anti-ras p21 monoclonal antibodies. *Cancer Detect Prev* 1988; 12: 369-376.
80. Naldini L, Vgna E, Narsimhan RP, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulated the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the protooncogene c-met. *Oncogene* 1991; 6: 501-504.
81. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 151: 802-804.
82. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, et al. Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 227-232.
83. Kuniyasu H, Yasui W, Yokouki H, et al. Aberrant expression of c-met mRNA in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1993; 55: 72-75.
84. Czerniak B, Herz F, Koss LG, Scholm J. Ras oncogene p21 as a tumor marker in the cytodiagnosis of gastric and colonic carcinomas. *Cancer* 1987; 60: 2432-2436.
85. Levine N, Momand J. Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1032: 119-136.
86. Hall PA. p53: integrating the complexity. *J Pathol* 1996; 180:1-5.
87. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 2000; 95: 189-197.
88. Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335: 675-679.
89. Gabbert HE, Muller W, Schneiders A, et al. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 720-726.
90. Schneider BG, Hilsenbeck SG, Hensel CH, et al. p53 mutations in gastric and colorectal cancers in Texas Hispanics versus Anglos. *Virchows Arch* 1994; 424:187-193.
91. Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, et al. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. *Br J Cancer* 1993; 67: 589-593.

92. Motojima K, Furui J, Kohara N, et al. Expression of p53 protein in gastric carcinomas is not independently prognostic. *Surgery* 1994; 116: 890-895.
93. Oypaul BY, Hopwood D, Newman EL, et al. The prognostic significance of the accumulation of p53 tumour-suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1994; 69: 943-946.
94. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, et al. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50: 859-862.
95. Lim BHO, Soong R, Griev F, et al. p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 69: 200-204.
96. Tahara E. Carcinogenesis and progression of human gastric cancer. *Trans Soc Pathol Jpn* 1992; 81:21-49.
97. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, et al. The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 3231-3233.
98. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19: 484-490.
99. Nishimura K, Yokozalci H, Haruma K, et al. Alterations of the APC gene in carcinoma cell lines and precancerous lesions of the stomach. *Int J Oncol* 1995; 7: 587-592.
100. Motojima K, Furui J, Kohara N, et al. Expression of kirsten-ras p21 in gastric cancer correlates with tumor progression and is prognostic. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3:184-91.
101. Yoshida K, Harnatani K, Koide H, et al. Preparation of anti-ras Mr. 21,00 protein monoclonal antibodies and immunohistochemical analyses on expression of ras genes in human stomach and thyroid cancers. *Cancer Res* 1988; 48: 5503-5509.
102. Ohuchi N, Hand PH, Merlo G, et al. Enhanced expression of c Ha-ras p2 I in human stomach adenocarcinomas defined by immunoassay using monoclonal antibodies and in situ hybridisation. *Cancer Res* 1987; 47: 1413-1420.
103. Czerniak B, Herz F, Gorczyca W, Koss L. Expression of ras oncogene p21 protein in early gastric carcinoma and adjacent gastric epithelia. *Cancer* 1989; 64:1467-1473.
104. Songun I, van den Velde CJ, Cramer-Knijnenburg G, van Krieken JH. Detectability of retinoblastoma (Rb), gene product and p53 antigen expression decreases in stored paraffin sections. *Histopathology* 1997; 30: 604-605.
105. Feakins RM, Nickols CD, Walton S-J. Abnormal expression of pRb, p16 and cyclin D in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases. Relationship with pathological features and survival. *Hum Pathol* 2003; 34.
106. Chou NH, Chen HC, Chou NS, Hsu PI, Then HH. Expression of altered retinoblastoma protein inversely correlates with tumor invasion in gastric carcinoma. *Word J Gastroenterol* 2006; 12: 7188-7191.

107. Lan J, Xiong YY, Lin YX, et al. Helicobacter pylori infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 54-58.
108. Reynolds FH, Todaro GH, Fryling G, Stephenson JR. Human transforming growth factors induce tyrosine phosphorylation of EGF receptors. *Nature* 1981; 292: 259-262.
109. Tahara E, Surniyoshi H, Hata J, et al. Human epidermal growth factor in gastric carcinoma as a biologic marker of high malignancy. *Gann* 1986; 77: 145-152.
110. Tokunaga A, Onda M, Shimizu Y, et al. Estrogen receptor, estradiol and epidermal growth factor in the gastric cancer as a biological markers of proliferation and progression [in Japanese with English abstract]. *J Jpn Surg Soc* 1987; 88: 1113-1116.
111. Onda M, Tokunaga A, Nishi K, et al. The correlation of epidermal growth factor with invasion and metastasis in human gastric cancer. *Jpn J Cancer* 1990; 20: 269-274.
112. Yasui W, Hata J, Yokozaki H, et al. Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1988; 41: 211-217.
113. Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells. Polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5258-5262.
114. Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C, et al. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 1982; 257: 1523-1531.
115. Tsujino T, Yoshida K, Nakayama H, et al. Alterations of oncogenes in metastatic tumours of human gastric carcinomas. *Br J Cancer* 1990; 62: 226-230.
116. Yoshida K, Kyo E, Tsuda T, et al. EGF and TGF- α , the ligands of hyperproduced EGFR in human esophageal carcinoma cells, act as autocrine growth factors. *Int J Cancer* 1990; 45: 131-135.
117. Malden LT, Novak U, Burgess AW. Expression of transforming growth factor alpha messenger RNA in the normal and neoplastic gastro-intestinal tract. *Int J Cancer* 1989; 43: 380-384.
118. Yonemura Y, Takamura H, Ninomiya I, et al. Interrelationships between transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in advanced gastric cancer. *Oncology* 1992; 49: 157-161.
119. Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* 1988; 48: 137-141.
120. Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T, et al. Epidermal growth factor receptor status and S-phase fractions in gastric carcinoma. *Oncology* 1989; 46: 158-161.

121. D'Agnano I, D'Angelo C, Saverese A, et al. DNA ploidy, proliferative index, and epidermal growth factor receptor: expression and prognosis in patients with gastric cancers. *Lab Invest* 1995; 72: 432-438.
122. Yoshida K, Tsuda T, Matsumura T, et al. Amplification of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and oncogenes in human gastric carcinomas. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1989; 57: 285-290.
123. Sugiyama K, Yonemura Y, Miyazaki I. Immunohistochemical study of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma. *Cancer* 1989; 63: 1557-1561.
124. Korenaga D, Haraguchi M, Okamura T, et al. DNA ploidy and tumour invasion in human gastric cancer: Histopathologic differentiation. *Arch Surg* 1989; 124: 314-318.
125. Watanabe A, Korenaga D, Machara Y, et al. Nuclear DNA content, tumour cell aggregation and metastatic events in patients with poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach. *Cancer* 1991; 68: 815-820.
126. Nava HR, Arredondo MA. Diagnosis of gastric cancer. *Endoscopy, Imaging and Tumour markers. Surg Oncol Clin North Am* 1993; 2: 371.
127. Yonemura Y, Ohyama S, Sugiyama K, et al. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 509-514.
128. Johnson HJ, Belluco C, Masood S, et al. The value of flow cytometric analysis in patients with gastric cancer. *Arch Surg* 1993; 128: 314-317.
129. Korenaga D, Okamura T, Saito A. et al. DNA ploidy is closely linked to tumour invasion, lymph-node metastasis and prognosis in clinical gastric cancer. *Cancer* 1988; 62: 309-319.
130. Ohyama S, Yonemura Y, Miyazaki I. Prognostic value of S-phase fraction and DNA ploidy studied with in vivo administration of bromodeoxyuridine on human gastric cancers. *Cancer* 1990; 65: 116-121.
131. Victorzon M, Roberts PJ, Haglund C, et al. Ki-67 immunoreactivity, ploidy and S-phase fraction as prognostic factors in patients with gastric carcinoma. *Oncology* 1996; 53: 182-191.
132. Evans CW. Cell adhesion and metastasis. *Cell Biol Internal Reports* 1992; 16:1-9.
133. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44 a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989; 10: 423-428.
134. Haynes BF, Liao HX, Patton KL. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells* 1991; 3: 347-350.

135. Screatton GR, BeU MV, Jackson DG, et al. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternative spliced exons. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 1210-1264.
136. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
137. Mayer B, Jauch KW, Gunthert U, et al. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993; 342: 1019-1022.
138. Washington K, Gottfried MR, Telen MJ. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1994; 18: 1043-1049.
139. Takeichi M. Cadherins in cancer; implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 806-811.
140. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, et al. Immunohistochemical evaluation of E-cadherin adhesion molecule expression in human gastric cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1992; 421: 149-156.
141. Yonemura Y, Ninomiya I, Kaji M, et al. Decreased E-cadherin expression correlates with poor survival in patients with gastric cancer. *Anal Cell Pathol* 1995; 8: 177-190.
142. Mayer B, Johnson JP, Leid F, et al. E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: Down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* 1993; 53: 1690-1695.
143. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, et al. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 1991; 139: 17-23.
144. Shino Y, Watanabe A, Yamada Y, et al. Clinicopathological evaluation of immunohistochemical E-cadherin expression in human gastric carcinomas. *Cancer* 1995; 76: 2193-2201.
145. Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, et al. Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 69: 184-189.
146. Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, et al. Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. *Am J Pathol* 2000; 156: 585-594.
147. Muller W, Noguchi T, Wirtz H-C, et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins cyclin D1, cyclin E and their inhibitor P21 Waf1/Cip1 in gastric cancer. *J Pathol* 1999; 189: 186-193.
148. Tenderenda M. A study on the prognostic value of cyclins D1 and E expression levels in resectable gastric cancer and on some correlations between cyclins expression, histoclinical parameters and selected protein products of cell-cycle regulatory genes. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 405-414.

149. Kim D-H. Prognostic implications of cyclin B1, p34cdc2, p27^{kip1} and p53 expression in gastric cancer. *Yonsei Med J* 2007; 48: 694-700.
150. Takano Y, Kato Y, Masuda M, et al. Cyclin D3, but not cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis. *J Pathol* 1999; 189: 194-200.
- 151.
152. Arici DS, Tuncer E, Ozer H, et al. Expression of retinoblastoma and cyclin D1 in gastric carcinoma. *Neoplasma* 2009; 56: 63-67.
153. Jun YU, Miehke S, Ebert MPA. Expression of cyclin genes in human gastric cancer and in first degree relatives. *Chin Med J* 2002; 115: 710-715.
154. Miehke S, Yu J, Ebert M, et al. Expression of G1 phase cyclins in human gastric cancer and gastric mucosa in first-degree relatives. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1248-1256.
155. Ahn MJ, Kim BH, Jang SJ. Expression of cyclin D1 and cyclin E in human gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *J Korean Med Sci* 1998; 13: 513-518.
156. Megnani MD, Gregnani JHTG, Nonogaki S, Soares FA. Evaluation of cell cycle protein expression in gastric cancer: cyclin B1 expression and its prognostic implication. *Hum Pathol* 2010; 41: 1120-1127.
157. Yasuda M, Takesue F, Inutsuka S, et al. Overexpression of cyclin B1 in gastric cancer and its clinicopathological significance: an immunohistological study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 412-416.
158. Mrena J, Wiksten J-P, Kokkola A, et al. Prognostic significance of cyclin A in gastric cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 1897-1901.
159. Yasui W, Oue N, Aung PP, et al. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005; 8: 86-94.
160. Serrano M, Hanno GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-707.
161. Vidal A, Koff A. Cell cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 2000; 247: 1-15.
162. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-704.
163. Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 1994; 8: 1750-1758.
164. Sun Y, Li J-Y, He J-S, et al. Tissue microarray analysis of multiple gene expression in intestinal metaplasia, dysplasia and carcinoma of the stomach. *Histopathology* 2005; 46: 505-514.

165. Noda H, Maehara Y, Irie K, et al. Growth pattern and expression of cell cycle regulator proteins p53 and p21WAF1/CIP1 in early gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 1828-1835.
166. Seo Y-H, Joo Y-E, Rew S-J-S, et al. Prognostic significance of p21 and p53 in gastric cancer. *Korean J Int Med* 2003; 18: 98-103.
167. Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, et al. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994; 79: 487-496.
168. Firpo EJ, Koff A, Solomon MJ, et al. Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin-2 induced proliferation of huma T lymphocytes. *MOI Cell Biol* 1994; 14: 4889-4901.
169. Viglietto G, Motti ML, Fresco A. Understanding p27^{kip1} deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization? *Cell Cyle* 2002; 6: 394-400.
170. Spirin KS, Simpson JF, Takeuchi S, et al. p27/Kip1 muation found in breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 2400-2404.
171. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27^{kip1} protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Med* 1997; 3: 231-234.
172. Lloyd RV, Jin L, Qian X, et al. Aberrant p27^{kip1} expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol* 1997; 150: 401-407.
173. Vlach J, Hennrecke S, Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1}. *EMBO J* 1997; 16: 5334-5344.
174. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Med* 2002; 8: 1136-1144.
175. Jordan RC, Bradley G, Slingerland J. Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27^{kip1} in epithelial dysplasia an carcinoma of the oral cavity. *Am J Pathol* 1998; 152: 585-590.
176. Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, et al. High level expression of p27^{kip1} and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27^{kip1} and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6380-6385.
177. Tsihlias J, Kapusta LR, DeBuer G, et al. Loss of cylin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 542-548.
178. Florenes VA, Maeldansmo GM, Kerbel RS, et al. Protein expression of the cell-cycle inhibitor p27^{kip1} in malignant melanoma: inverse correlation with disease-free survival. *Am J Pathol* 1998; 153: 305-312.

179. Tan P, Cady B, Wanner M, et al. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T2a,b) invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1259-1263.
180. Singh SP, Lipman J, Goldman H, et al. Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 1730-1735.
181. Mori M, Mimori K, Shiraishi T, et al. p27 expression and gastric carcinoma. *Nature Med* 1997; 3: 593.
182. Esposito V, Baldi A, DeLuca A, et al. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 3381-3385.
183. Abbas NF, El-Sharkawy SL, Fadel MT, et al. Combine expression of P27 and P53 in human gastric carcinoma. *Report and Opinion* 2010; 2: 27-34.
184. Borges BN, Burbano RMR, Harada ML. Absence of CIP1/KP1 hypermethylation in gastric cancer patients from northern Brazil. *In vivo* 2010; 24: 579-582.
185. Galizia G, Ferraraccio F, Lieto E, et al. p27 downregulation and metallothionein overexpression in gastric cancer patients are associated with a poor survival rate. *J Surg Oncol* 2006; 93: 241-252.
186. Gamboa-Dominguez A, Seidl S, Reyes-Gutierrez E, et al. Prognostic significance of p21^{WAF1/CIP1}, p27^{Kip1}, p53 and E-cadherin expression in gastric cancer. *J Clin Pathol* 2007; 60: 756-761.
187. Kim H, Lee HI, Nam ES et al. Reduced expression of the cell-cycle inhibitor p27^{Kip1} is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2000; 16: 245-253.
188. Wu WKK, Cho CH, Lee CW, et al. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. *Cancer Let* 2010; 295: 144-153.
189. Okuyama T, Maehara Y, Kabashima A, et al. Combined evaluation of expression of p53 and p21 protein as prognostic factors for patients with gastric carcinoma. *Oncology* 2002; 63: 353-361.
190. Sakaguchi T, Watanabe A, Sawada H. Prognostic value of cyclin E and p53 expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 1238-1243.
191. Song SH, Jong H-S, Choi HH, et al. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16^{INK4a} expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000; 87: 236-240.
192. Lu Z-M, Zhou J, Wang X, et al. Nucleosomes correlate with in vivo progression pattern of de novo methylation of p16 CpG islands in human gastric carcinogenesis. *Plosone* 2012; 7:e35928

193. Kim H, Kim YH, Kim SE, et al. Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16^{IN4A}, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2003; 200: 23-31.
194. Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
195. Marx J. How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993; 262: 1644-1645.
196. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-1501.
197. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, et al. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69: 1239-1245.
198. Craanen ME, Blok P, Offerhaus GJA, et al. p21^{Waf1/Cip1} expression and the p53/mdm2 feedback loop in gastric carcinogenesis. *J Pathol* 1999; 189: 481-486.
199. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Molec Cancer Res* 2003; 1: 1001-1008.
200. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989; 58: 1085-1095.
201. Mittnach S, Weinberg RA. G1/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell* 1991; 65: 381-393.
202. Dysn N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998; 12: 2245-2262.
203. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, et al. D-type cyclin dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2066-2076.
204. Geng Y, Eaton E, Picon M, et al. Regulation of cyclin E transcription of E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 1996; 12: 1173-1180.
205. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, et al. Human cyclin E, a nuclear protein essential for G1 to S phase transition. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2312-2324.
206. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1998; 51: 1-7.
207. Sommi P, Savio M, Stivala LA, et al. Helicobacter pylori releases a facto(s) inhibiting cell cycle progression of human gastric cell lines by affecting cyclin E/cdk2 kinase activity and Rb protein phosphorylation through enhanced p27^{KIP1} protein expression. *Exp Cell Res* 2002; 281: 128-139.
208. Costa NR, Sousa A, Teixeira C, et al. Oncogenic signaling in gastric cancer. In: *Gastric Carcinoma – Molecular Aspects and Current Advances*, Lotfy M (ed). Intech China, 2011; pp:1-26.

209. Casasol SV, Colung MJM, Millan OA, Rodriguez JMM. Prognostic value of clinicopathologic factors Ki67, cyclin D1, cyclin D3 and CDK4 in gastric carcinoma. *Oncologia (Barc)* 2004; 27: No 9.
210. Baldus SE, Schneider PM, Monig SP, et al. p21/waf1/cip1 in gastric cancer: associations with histopathological subtypes, lymphonodal metastasis, prognosis and p53 status. *Sand J Gastroenterol* 2001; 36: 975-980.
211. Schrami P, Bucher C, Bissig H, et al. Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. *J Pathol* 2003; 200: 375-382.
212. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004; 157: 327-349.
213. al-Moundhri MS, Nirmal V, al-Hadabi I, et al. The prognostic significance of p53, p27^{kip1}, p21^{waf1}, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. *J Surg Oncol* 2005; 91: 243-252.
214. Kaye PV, Radebold K, Isaacs S, Dent DM. Expression of p53 and p21^{waf1/cip1} in gastric carcinoma: lack of inter-relationship or correlation with prognosis. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 39-43.
215. Bellini MF, Cadamuro ACT, Succi M, et al. Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. *J Biomed Biotech* 2012; 891961:1-13.
216. Wei Z, Jian X, Qiao H, et al. STAT3 interacts with Skp2/p27/p21 pathway to regulate the motility and invasion of gastric cancer cells. *Cell Sign* 2013; 25: 931-938.
217. Liu XP, Kawauchi S, Oga A, et al. Combine examination of p27^{Kip1}, p21^{Waf1/Cip1} and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology* 2001; 19: 603-610.
218. Alves MK, Lima VP, Andre AR, et al. p27KIP1 expression in gastric cancer: differential pathways in the histological subtypes associated with helicobacter pylori infection. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45: 409-420.
219. Liu K-J, Qi H-Z, Yao H-L, et al. An updated meta-analysis of the p53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 8265-8275.
220. Trantafyllou K, Kitsanta P, Karamanolis DG, et al. Epithelial cell turnover, p53 and bcl-2 protein expression during oncogenesis of early and advanced gastric cancer in a Western population. *Digest Liver Dis* 2008; 40: 39-45.
221. Gryko M, Pryczynicz A, Gyzinska-Ustymowicz K, et al. Immunohistochemical assessment of apoptosis-associated proteins: p53, Bcl-xL, Bax and Bak in gastric cancer cells in correlation with clinical and pathomorphological factors. *Adv Med Sci* 2012; 57: 77-83.

222. Zha Y, Cun Y, Zhang Q, Li Y, Tan J. Prognostic value of expression of kit67, p53, topolla and GSTP1 for curatively resected advanced gastric cancer patients receiving adjuvant paclitaxel plus capecitabine chemotherapy. *Hepatogastroenterology* 2012; 117: 1327-1332.
223. Espinoza LA, Tone LG, Neto JB, et al. Enhanced TGF α -EGFR expression and p53 gene alterations contributes to gastric tumors aggressiveness. *Cancer Let* 2004; 212: 33-41.
224. Lazar D, Taban S, Sporea I, et al. The immunohistochemical expression of the p53-protein in gastric carcinomas. Correlation with clinicopathological factors and survival of patients. *Rom J Morphol Embryol* 2010; 51: 249-257.
225. Ahn M-J, Kim B-H, Jang S-J, et al. Expression of Cyclin D1 and cyclin E in human gastric carcinoma and its clinicoapthologic significance. *J Korean Med Sci* 1998; 13: 513-518.
226. Goncalves AR, Carneir AJV, Martins I, et al. Prognostic significance of p53 protein expression in early gastric cancer. *Pathol Oncol Res* 2011; 17: 349-355.
227. Le TVT, Seo Y, Ruy CJ, et al. Increased expression of p27 is associated with the cisplatin resistance in gastric cancer cell ine YCC-3. *Arch Pharm Res* 2010; 33: 1127-1132.
228. Muller W, Grabsch H, Takeno S, et al. Prognostic value of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in gastric cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 1787-1792.
229. Cito L, Pentimalli F, Forte I, et al. Rb family proteins in gastric cancer. *Oncol Reports* 2010; 24: 1411-1418.
230. Shi J, Zhang G, Yao D, et al. Prognostic significance of aberrant gene methylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 116-129.
231. Arici DS, Tuncer E, Ozer H, et al. Expression of retinoblastoma and cyclin D1 in gastric carcinoma. *Neoplasma* 2009; 56: 63-67.
232. Zhao C, Bu X. Promoter methylation of tumor-related genes in gastric carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2012; 27: 1271-1282.
233. Song HS, Kim IH, Sohn SS, et al. Prognostic significance of immunohistochemical expression of p53 and retinoblastoma gene protein (pRB) in curatively resected gastric cancer. *Korean J Intern Med* 2005; 20: 1-7.
234. Wu JF, Shao JC, Wang DB, Qin R, Zhang H. Expression and significance of cell cycle regulators in gastric carcinoma. *Ai Zheng* 2005; 24: 175-179.
235. Feakins RM, Nickols CD, Bidd H, Walton S-H. Abnormal expression of pRb, p16, and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival. *Hum Pathol* 2003; 35: 1276-1282.

236. Yang Z, Shu X, Chen L, et al. Expression of p53-MDM2 feedback loop related proteins in different gastric pathologies in relation to helicobacter pylori infection: implications in gastric carcinogenesis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36: 235—243.
237. Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, et al. Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2003; 23: 1663-1670.
238. Yu J, Leung WK, Ebert MPA, et al. Absence of cyclin D2 expression is associated with promoter hypermethylation in gastric cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 1560-1565.
239. Hirata Y, Ogasawara N, Sasaki M, et al. BCL6 degradation caused by the interaction with the C-terminus of pro-HB-EGF induces cyclin D2 expression in gastric cancers. *Brit J Cancer* 2009; 100: 1320-1329.
240. Bani-Hani KE, Almasri NM, Khader YS, et al. Combined evaluation of expressions of cyclin E and p53 proteins as prognostic factors for patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1447-1453.
241. Liang B, Wang S, Yang X, et al. Expressions of cyclin E, cyclin dependent kinase 2 and p57(KIP2) in human gastric cancer. *Clin Med J* 2003; 116: 20-23.
242. Kouraklis G, Katsoulis IE, Theocharis S, et al. Does the expression of cyclin E, pRb and p21 correlate with prognosis in gastric adenocarcinoma? *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1015-1020.
243. Andre AR, Ferriera MVP, Mota RMS, et al. Gastric adenocarcinoma and helicobacter pylori: correlation with p53 mutation and p27 immunoexpression. *Cancer Epidemiol* 2010; 34: 618-625.