

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΤΜΗΜΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ :
«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΣΥΓΧΡΟΝΗ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ»**

**ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ: ΑΝΟΣΟΕΚΦΡΑΣΗ ΚΕΡΑΤΙΝΩΝ ΚΑΙ
ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ MUC**

**ΑΥΓΕΡΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ-ΔΗΜΗΤΡΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ**

**ΑΘΗΝΑ
ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2014**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

**ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΣΥΓΧΡΟΝΗ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΔΑ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

Π. ΦΟΥΚΑΣ (Επιβλέπων)

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ι. ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΗΣ

ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ι. ΔΕΛΛΑΔΕΤΣΙΜΑ

ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Στην οικογένειά μου και στους φίλους μου

Ευχαριστίες

Αυτή η διπλωματική εργασία έγινε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος: Νεοπλασματική νόσος στον άνθρωπο: σύγχρονη κλινικοπαθολογοανατομική προσέγγιση και έρευνα και εκπονήθηκε στο Β΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής, στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αττικών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή Φούκα Περικλή.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον συνάδελφο Κων/νο Σαββατάκη, ο οποίος με υπομονή μου δίδαξε την τεχνική κατασκευής των κύβων παραφίνης με ενσωμάτωση ιστικών μικροσυστοιχιών, στον Διευθυντή του Εργαστηρίου, Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Ιωάννη Παναγιωτίδη, που με δέχτηκε στο Τμήμα και μου πρόσφερε τον απαραίτητο χώρο και εξοπλισμό και κυρίως στον επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας, Επίκουρο Καθηγητή κύριο Περικλή Φούκα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση του και την άψογη συνεργασία μας σε όλα τα βήματα της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

A. Γενικό μέρος

1. Αδενοκαρκίνωμα στομάχου.....	7
1.1 Επιδημιολογία και αιτιολογία.....	7
1.2 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά.....	9
1.3 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά.....	10
1.4 Σταδιοποίηση (TNM).....	14
1.5 Πρόγνωση.....	16
1.6 Θεραπεία.....	17
2. Βλεννοπρωτεΐνες (MUC).....	20
3. Κερατίνες και επιθηλιακή διαφοροποίηση.....	22

B. Ειδικό Μέρος

1. Ασθενείς και μέθοδοι.....	25
1.1 Ασθενείς.....	25
1.2 Ιστικές μικροσυστοιχίες.....	25
1.3 Ανοσοϊστοχημεία (αντισώματα και πρωτόκολλο).....	26
1.4 Εκτίμηση ανοσοχρώσεων.....	28
1.5 Στατιστική Ανάλυση.....	31
2. Αποτελέσματα.....	32
2.1 Ασθενείς.....	32
2.2 Έκφραση της MUC1.....	33
2.3 Έκφραση της MUC2.....	34
2.4 Έκφραση της MUC5AC.....	35
2.5 Έκφραση της MUC6.....	37
2.6 Έκφραση της κερατίνης 19.....	38
2.7 Έκφραση της κερατίνης 14.....	39
2.8 Συσχετισμός της έκφρασης των γλυκοπρωτεϊνών MUC και της κερατίνης 19 μεταξύ τους.....	40

2.9 Ανάλυση των νεοπλασμάτων με βάση τον ανοσοφαινότυπο που προκύπτει από την έκφραση των γλυκοπρωτεϊνών MUC.....	40
3. Συζήτηση.....	41
4. Περίληψη.....	44
5. Summary.....	45
Γ. Βιβλιογραφία.....	46

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Αδενοκαρκίνωμα στομάχου

1.1 Επιδημιολογία και αιτιολογία

Αν και η επίπτωση του γαστρικού καρκίνου μειώνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες, αποτελεί τον δεύτερο συχνότερο καρκίνο παγκοσμίως, με 800.000 νέες περιπτώσεις και 650.000 θανάτους κάθε χρόνο (Lauwers GY, 2004), αποτελώντας περίπου το 8% των καρκίνων παγκοσμίως (Ferlay J et al, 2010). Στις περιοχές με υψηλή επίπτωση (> 60 ανά 100.000) περιλαμβάνονται η ανατολική Ασία, η ανατολική Ευρώπη και η κεντρική και λατινική Αμερική, ενώ στις περιοχές με χαμηλή επίπτωση (< 15 ανά 100.000) περιλαμβάνεται η βόρεια Αμερική, η βόρεια Ευρώπη και οι περισσότερες χώρες της Αφρικής και της νοτιοανατολικής Ασίας (Curado MP et al, 2007). Το αδενοκαρκίνωμα εντερικού τύπου είναι συχνότερο στις περιοχές με υψηλή επίπτωση της νόσου, ενώ του διαχύτου τύπου στις περιοχές με χαμηλή. Αντίστοιχα, τα αδενοκαρκινώματα του άντρου και του πυλωρού είναι πιο συχνά στις περιοχές με υψηλή επίπτωση, ενώ της καρδιακής μοίρας στις περιοχές με χαμηλή επίπτωση (Parkin DM, 2006).

Οι χώρες που έχουν υψηλή επίπτωση του γαστρικού καρκίνου και διεξάγουν προληπτικό έλεγχο σε ασυμπτωματικούς ασθενείς π.χ. στην Ιαπωνία, βρίσκουν υψηλά ποσοστά (30-50%) πρώιμου γαστρικού καρκίνου, ο οποίος είναι ένα διηθητικό καρκίνωμα που όμως περιορίζεται στον βλεννογόνο ή στον βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο (Hisamichi et al, 1984; Ohta et al, 1987; Lauwers GY et al, 2010).

Το γαστρικό καρκίνωμα είναι σπάνιο σε άτομα ηλικίας < 30 ετών και στις ηλικίες αυτές είναι συνήθως διαχύτου τύπου, κληρονομικής αιτιολογίας πιο συχνά σε γυναίκες (Kaneko S et al, 2001; Miyahara R et al, 2007). Γενικά η επίπτωση αυξάνεται βαθμιαία με την ηλικία και στα δύο φύλα (Curado MP et al, 2007).

Σε επιδημιολογικές μελέτες έχει βρεθεί μία σχέση ανάμεσα στο κάπνισμα και στο γαστρικό καρκίνωμα (International Agency for Research on Cancer, 2004). Επιπλέον φαίνεται πως το κάπνισμα ενισχύει την καρκινογόνο δράση της μόλυνσης με *cagA*(+) *H. Pylori* (Brenner H et al, 2002).

Όσον αφορά τις διατροφικές συνήθειες, με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκινώματος, ειδικά του εντερικού τύπου, έχουν συσχετιστεί η μεγάλη κατανάλωση τροφίμων διατηρημένων στο αλάτι ή/και καπνιστών (Shikata K et al, 2006) και η μικρή κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών, ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με

λοιμωξη από *H. Pylori* (Erpplein M et al, 2008; International Agency for Research on Cancer, 2003). Η υπερκατανάλωση κόκκινου κρέατος καθώς και επεξεργασμένων κρεάτων, έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μη-καρδιακής μοίρας καρκινώματος (Gonzalez CA et al, 2006). Η πραγματική όμως επίδραση των διαιτητικών παραγόντων είναι γενικά δύσκολο να αποδειχτεί από τις επιδημιολογικές μελέτες (Lauwers GY et al, 2010).

Αν και διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει μία προστατευτική δράση της κατανάλωσης φρέσκων φρούτων και λαχανικών σε σχέση με την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου (International Agency for Research on Cancer, 2003), μία πρόσφατη μετα-ανάλυση βασισμένη σε τυχαιοποιημένες μελέτες, συνέκρινε τη λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων (π.χ. β-καροτίνη, βιταμίνες A, B, C, E και σελήνιο, σε συνδυασμό ή μόνα τους) με placebo ή με τη μη χορήγησή τους και έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική προστατευτική δράση στην επίπτωση του γαστρικού καρκινώματος (Bjelakovic G et al, 2008). Στην ίδια μελέτη δείχτηκε επίσης ότι η επίπτωση φαίνεται να επηρεάζεται από το εάν οι δοκιμές έγιναν σε καλά σιτισμένο πληθυσμό ή σε πληθυσμό με διατροφικές ελλείψεις (στον οποίο τα αντιοξειδωτικά μπορεί να έχουν ευεργετική δράση). Στη δεύτερη περίπτωση, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση (11%) στην θνητότητα στα άτομα που έλαβαν β-καροτίνη, βιταμίνη E και σελήνιο και ιδιαίτερα στα άτομα ηλικίας < 55 χρονών (Qiao YL et al, 2009).

Έχει παρατηρηθεί ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης γαστρικού καρκινώματος αυξάνεται 5-10 χρόνια μετά από χειρουργείο στον στόμαχο, ιδιαίτερα μετά από επέμβαση κατά Bilroth II (η οποία προδιαθέτει σε παλινδρόμηση της χολής). Αν και ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός, η λοίμωξη από *H. pylori* δεν φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου, γιατί η παλινδρόμηση του δωδεκαδακτυλικού περιεχομένου στο στομάχο αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Kondo K, 2002; Sinning C et al 2007).

Η σημαντικότερη αιτία για την ανάπτυξη γαστρικού καρκινώματος στην περιοχή του άντρου είναι η λοίμωξη από *H. pylori*, η οποία ξεκινάει συνήθως κατά την παιδική ηλικία και εμμένει για όλη την υπόλοιπη ενήλικη ζωή, εκτός εάν γίνει αγωγή εκρίζωσης (Bouvard V et al, 2009). Σε ένα ποσοστό των ασθενών με εμμένουσα, για αρκετές δεκαετίες λοίμωξη, προκαλούνται μερικές φαινοτυπικές αλλαγές (π.χ. χρόνια γαστρίτιδα, ατροφία του βλεννογόνου, πολυεστιακή εντερική μετάπλαση και δυσπλασία), οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη εντερικού τύπου αδενοκαρκινώματος (Correa P, 1992; Craanen ME et al, 1992; Rugge M et al, 1996).

Όσον αφορά τις ανωτέρω προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις, η εκρίζωση του *H. pylori* βρέθηκε ότι έχει προστατευτικό ρόλο (Ley C et al, 2004; Mera R et al, 2005), όπως επίσης και η προληπτική θεραπεία με αντιβιοτικά σε ασθενείς χωρίς ατροφία ή εντερική μετάπλαση (Wong BC et al, 2004). Οι λοιμογόνοι παράγοντες *cagA*, οι κυτταροτοξίνες *vacA* (Basso D et al, 2008; Censini S et al, 1996) και οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του *H. pylori* (π.χ. BabA, SabA, OipA, AlpA/B, homB) περιλαμβάνονται στους παράγοντες που σχετίζονται με την αποίκηση και την παθογένειά του (Jung SW et al, 2009; Mahdavi J et al, 2002; Odenbreit S et al, 2009). Τα στελέχη που παράγουν την *cagA* πρωτεΐνη, σχετίζονται με εντονότερη φλεγμονώδη αντίδραση, με παρουσία προκαρκινωματώδων αλλοιώσεων και με μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης μη-καρδιακής μοίρας καρκινώματος (Plummer M et al, 2007; Queiroz DM et al, 1998). Αν και ο κίνδυνος, σε μερικές χώρες της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής, είναι αυξημένος στα *vacA*+ στελέχη, τέτοια σχέση δεν έχει παρατηρηθεί στις χώρες της ανατολικής Ασίας (Figueiredo C et al, 2001; Hussein NR et al, 2008; Oriwara H et al, 2009). Η γαστρίτιδα που προσβάλλει κυρίως το σώμα, με συνοδό πολυεστιακή γαστρική ατροφία και υπο- ή αχλωρυδρία, παρατηρείται σε περίπου 1% των προσβεβλημένων από *H. pylori* ασθενών. Ως αποτέλεσμα της αύξησης του γαστρικού pH, ευνοείται η δημιουργία αποικιών αναερόβιων βακτηρίων, τα οποία ευθύνονται για τον σχηματισμό καρκινογόνων νιτροζαμινών (Sanduleanu S et al, 2001). Επιπροσθέτως, τα προερχόμενα από τον μυελό αρχέγονα κύτταρα, μπορεί να συμβάλουν στην αναγέννηση του βλεννογόνου στα πλαίσια της βλεννογονικής βλάβης, μπορεί όμως να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μετάπλασης και νεοπλασίας (Correa P, Houghton J, 2007; Houghton J et al, 2004).

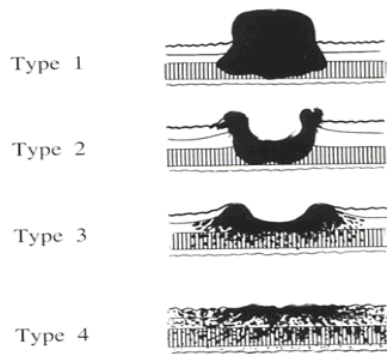
1.2 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά

Η μη διηθητική νεοπλασία (ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ή δυσπλασία) μπορεί να παρουσιαστεί: 1) σαν επίπεδο μόρφωμα, το οποίο είναι δύσκολο να εντοπιστεί με τη συμβατική γαστροσκόπηση, αλλά μπορεί να γίνει ορατό μετά από τη χρήση χρωστικής, 2) σαν πολυποειδές μόρφωμα, (το οποίο μερικές φορές αναφέρεται και ως αδένωμα), 3) με μία ενδιάμεση μορφή, δηλαδή είτε σαν εμβάθυνση είτε σαν εξέρυθρος ή αποχρωματισμένος βλεννογόνος.

Για την ταξινόμηση του μακροσκοπικού τύπου του πρώιμου γαστρικού καρκινώματος χρησιμοποιούνται κριτήρια όμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στην ενδοσκόπηση (Lauwers GY et al, 2010).

Η μακροσκοπική εμφάνιση του προχωρημένου καρκινώματος περιγράφεται σύμφωνα με την ταξινόμηση του Borrmann:

- Πολυποειδής (τύπος I).
- Μυκητοειδής (τύπος II).
- Ελκωτικός (τύπος III).
- Διάχυτα διηθητικός (τύπος IV).



Εικόνα 1: Μακροσκοπική ταξινόμηση του προχωρημένου γαστρικού καρκίνου, κατά Borrmann.

Οι πολυποειδείς και ελκωτικοί τύποι είναι οι πλέον συνήθεις. Οι διάχυτοι (διηθητικοί) όγκοι (τύπου IV) διηθούν επιφανειακά, δημιουργώντας επίπεδες βλάβες τύπου πλάκας, με ή χωρίς αβαθείς εξελκώσεις. Όταν η διήθηση είναι εκτεταμένη έχουμε την εικόνα πλαστικής λινίτιδας. Τα βλενώδη καρκινώματα έχουν ζελατινώδη όψη, με στυλπνή επιφάνεια διατομής (Lauwers GY et al, 2010).

Ο τύπος II αντιστοιχεί στο 36 % περίπου των γαστρικών καρκινωμάτων και βρίσκεται συχνότερα στο πυλωρικό άντρο, κατά μήκος του ελάσσονος τόξου. Ο τύπος I και III αντιστοιχούν στο 25 % των γαστρικών καρκινωμάτων, αντίστοιχα, και συναντώνται συχνότερα στο σώμα, κυρίως στο μείζον τόξο (Lauwers GY, 2004).

1.3 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά

Η ετερογένεια των γαστρικών καρκινωμάτων αντανακλάται εν μέρει στην ύπαρξη διαφόρων ιστοπαθολογικών ταξινομήσεων. Αν και οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ταξινομήσεις είναι αυτές της WHO και κατά Lauren (Lauren P, 1965), έχουν προταθεί και άλλες συμπεριλαμβανομένων των ταξινομήσεων του Ming (Ming SC, 1977), του Nakamura (Nakaruma K et al, 1968), του Mulligan (Mulligan RM, 1972), του Goseki (Goseki N et al, 1992) και του Carneiro (Carneiro F, 1997).

Ταξινόμηση κατά WHO

Είναι μία αυστηρά περιγραφική ταξινόμηση, που αναγνωρίζει πέντε κυρίως τύπους γαστρικού αδενοκαρκινώματος και σπάνιων υποτύπων. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της ταξινόμησης κατά WHO, είναι η αναγνώριση μορφολογικών τύπων που παρατηρούνται επίσης σε νεοπλάσματα άλλων τμημάτων του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως για π.χ. το λεπτό και το παχύ έντερο, συμβάλλοντας έτσι στην εναρμόνιση των ιστολογικών τύπων των ανωτέρω καρκινωμάτων.

Οι κύριες κατηγορίες είναι:

- Σωληνώδες αδενοκαρκίνωμα.
- Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα.
- Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα.
- Χαμηλής συνοχής αδενοκαρκίνωμα (poorly cohesive), που περιλαμβάνει το καρκίνωμα από κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου.
- Μικτά καρκινώματα.

Η ταξινόμηση κατά WHO ωστόσο δεν λαμβάνει υπόψη την ιστογένεση, την διαφοροποίηση ή τα επιδημιολογικά στοιχεία (Lauwers GY et al, 2010).

Σωληνώδες αδενοκαρκίνωμα

Αυτός ο τύπος αποτελείται από διατεταμένους ή σχισμοειδείς και διακλαδιζόμενους σωληνώδεις σχηματισμούς, ποικίλης διαμέτρου. Δομές λοβίων μπορούν επίσης να παρατηρηθούν. Τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να είναι κυλινδρικά, κυβικά ή πεπλατυσμένα, με ικανή ποσότητα ενδοαυλικής βλέννης. Έχει αναγνωριστεί επίσης ένας διαυγοκυτταρικός τύπος. Ο βαθμός της πυρηνικής ατυπίας κυμαίνεται από χαμηλός έως υψηλός. Υπάρχει ένας χαμηλά διαφοροποιημένος τύπος, ο οποίος μερικές φορές αναφέρεται ως συμπαγές καρκίνωμα. Τα καρκινώματα με ικανό λεμφοειδές στρώμα, μερικές φορές αναφέρονται ως καρκινώματα με λεμφοειδές στρώμα ή μυελοειδή καρκινώματα ή καρκινώματα του τύπου του λεμφοεπιθηλιώματος. Ο βαθμός της ίνωσης κυμαίνεται και μπορεί να είναι σημαντικός (Lauwers GY et al, 2010).

Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα

Είναι ένα καλά διαφοροποιημένο εξωφυτικό καρκίνωμα, με επιμήκεις δακτυλοειδείς προσεκβολές, οι οποίες επενδύονται από κυλινδρικά ή κυβοειδή

κύτταρα, με αγγειοσυνδετικούς άξονες. Τα κύτταρα τείνουν να διατηρήσουν την πολικότητα τους, ενώ μερικά καρκινώματα εμφανίζουν σωληνοθηλώδη αρχιτεκτονική. Σπάνια παρατηρείται μικροθηλώδης αρχιτεκτονική. Ο βαθμός της κυτταρικής ατυπίας και ο μιτωτικός δείκτης ποικίλουν. Μπορεί να υπάρχει σοβαρή πυρηνική ατυπία. Το διηθητικό μέτωπο του καρκινώματος συνήθως είναι σαφώς περιγεγραμμένο. Το καρκίνωμα μπορεί να διηθείται από οξέα και χρόνια φλεγμονώδη κύτταρα (Lauwers GY et al, 2010).

Βλεννώδες αδenoκαρκίνωμα

Αυτό το καρκίνωμα αποτελείται από κακόηθες επιθήλιο και εξωκυττάριας λίμνες βλέννης. Συμβατικά, θεωρείται βλεννώδες το καρκίνωμα το οποίο εμφανίζει σε περισσότερο από 50% της έκτασής του, εξωκυττάρια βλέννη. Τα βλεννώδη καρκινώματα μπορεί να περιέχουν διάσπαρτα κύτταρα με χαρακτηριστικές δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (Lauwers GY et al, 2010).

Χαμηλής συνοχής καρκινώματα (poorly cohesive), περιλαμβάνονται τα καρκινώματα με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου και άλλοι τύποι.

Τα χαμηλής συνοχής καρκινώματα αποτελούνται από μεμονωμένα ή σε μικρές αθροίσεις διατασσόμενα νεοπλασματικά κύτταρα και περιλαμβάνουν:

- Το καρκίνωμα με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet-ring), το οποίο ορίζεται σαν ένας όγκος, ο οποίος αποτελείται κυρίως ή αποκλειστικά από κύτταρα με χαρακτηριστικές δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από κεντρικά ευρισκόμενη κυτταροπλασματική βλέννη και έκκεντρος, απωθημένους στην περιφέρεια πυρήνες. Τα κακοκήθη κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου μπορεί να διαταχθούν είτε διάχυτα είτε σε αδενικούς, λιμνοειδείς ή σε μικροδοκιδώδεις σχηματισμούς. Τα ανωτέρω κύτταρα μπορεί να περιβάλλονται από έντονη ινοβλαστική αντίδραση στις εν τω βάθει μοίρες του γαστρικού τοιχώματος. Σε μερικές περιπτώσεις, τα κύτταρα αυτά μπορεί να περιορίζονται στο βλεννογόνο, σε συνδυασμό με άλλους τύπους χαμηλής συνοχής καρκινικών κυττάρων, σε πιο εν τω βάθει μοίρες του γαστρικού τοιχώματος.
- Άλλοι τύποι κυττάρων που παρατηρούνται στα χαμηλής συνοχής καρκινώματα, περιλαμβάνουν νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία

προσομοιάζουν με ιστιοκύτταρα ή λεμφοκύτταρα. Άλλα ακόμα μπορεί να έχουν έντονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα ή ακανόνιστους, ανώμαλους πυρήνες. Σε μερικές περιπτώσεις το νεόπλασμα αποτελείται από συνδυασμούς ποικίλης μορφολογίας νεοπλασματικών κυττάρων (Lauwers GY et al, 2010).

Μικτό καρκίνωμα

Αυτό το καρκίνωμα αποτελείται από ένα μίγμα ξεχωριστών συνιστωσών, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε έναν από τους ανωτέρω περιγραφέντες ιστολογικούς τύπους (σωληνώδες, θηλώδες και χαμηλής συνοχής καρκίνωμα, με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου). Κάθε επιμέρους ιστολογική συνιστώσα πρέπει να αναφέρεται στην ιστολογική έκθεση. Αν και η προγνωστική σημασία της ποσόστωσης της κάθε συνιστώσας δεν έχει καθοριστεί, μερικά στοιχεία υπαινίσσονται ότι η υπεροχή της συνιστώσας του χαμηλής συνοχής, με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου καρκινώματος, συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση (Lauwers GY et al, 2010).

Σπάνιοι ιστολογικοί τύποι (~5% των περιπτώσεων):

1. Ηπατοειδές αδενοκαρκίνωμα.
2. Γαστρικό καρκίνωμα με λεμφοειδές στρώμα.
3. Χοριοκαρκίνωμα.
4. Αδενοπλακώδες καρκίνωμα.
5. Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων.
6. Καρκινοσάρκωμα.
7. Καρκίνωμα από τοιχωματικά κύτταρα (Parietal cell).
8. Κακοήθης ραβδοειδής όγκος.
9. Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα.
10. Καρκίνωμα από κύτταρα Paneth.
11. Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα.
12. Μικτό αδενο-νευροενδοκρινές καρκίνωμα.
13. Εμβρυικό καρκίνωμα.
14. Γαστρικός όγκος λεκιθικού ασκού (Pure gastric yolksac tumour).
15. Ογκοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα.

Πρώιμο γαστρικό καρκίνωμα

Είναι ένα διηθητικό καρκίνωμα που περιορίζεται στον βλεννογόνο ή στον βλεννογόνο και στον υποβλεννογόνο χιτώνα, ανεξάρτητα της παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων. Τα περισσότερα από αυτά τα καρκινώματα έχουν διάμετρο από 2 έως 5 εκ. και εντοπίζονται στο έλλασον τόξο και πέριξ της γωνίας. Χωρίς θεραπεία, τα περισσότερα επεκτείνονται σε λίγους μήνες ή χρόνια. Οι σωληνώδεις και θηλώδεις τύποι εκπροσωπούν το 50% και 30% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Τα καρκινώματα από κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου και τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα αντιπροσωπεύουν το 25% και το 15% των περιπτώσεων, αντίστοιχα (Lauwers GY et al, 2010).

Βαθμός κακοήθειας (grading)

Ο βαθμός κακοήθειας χρησιμοποιείται βασικά στα σωληνώδη και στα θηλώδη καρκινώματα και όχι στους άλλους τύπους. Τα καλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα αποτελούνται από καλά σχηματισμένα αδένια, τα οποία μερικές φορές προσομοιάζουν σε μεταπλαστικό εντερικό επιθήλιο. Στα μέτριας διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα περιλαμβάνονται εκείνα τα οποία έχουν χαρακτήρες μεταξύ της καλής και της χαμηλής διαφοροποίησης. Τα χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα αποτελούνται από έντονα ακανόνιστα αδένια, τα οποία αναγνωρίζονται δύσκολα ως τέτοια. Ο βαθμός κακοήθειας μπορεί να αναφερθεί και ως χαμηλός βαθμός κακοήθειας (ο οποίος περιλαμβάνει τα νεοπλάσματα καλής και μέτριας διαφοροποίησης) και υψηλός βαθμός κακοήθειας (ο οποίος περιλαμβάνει τα αδενοκαρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης) (Lauwers GY et al, 2010).

1.4 Σταδιοποίηση

TNM ταξινόμηση των καρκινωμάτων του στομάχου

T- πρωτοπαθής όγκος

TX Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να αξιολογηθεί

T0 Δεν αποδεικνύεται πρωτοπαθής όγκος

Tis Καρκίνωμα in situ, ενδοβλεννογονικός όγκος χωρίς διήθηση του υποκείμενου χορίου, υψηλού βαθμού δυσπλασία

T1 Ο όγκος διηθεί το υποκείμενο χόριο, τη βλεννογόνια μυική στιβάδα ή τον υποβλεννογόνο χιτώνα

T1a Ο όγκος διηθεί το χόριο ή τη βλεννογόνια μυική στιβάδα

- T1b Ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνιο χιτώνα
- T2 Ο όγκος διηθεί τον μυικό χιτώνα
- T3 Ο όγκος διηθεί τον υποορογόνιο χιτώνα
- T4 Ο όγκος διαπερνάει τον ορογόνο ή διηθεί παρακείμενες δομές
- T4a Ο όγκος διαπερνάει τον ορογόνο (σπλαγγχικό περιτόναιο)
- T4b Ο όγκος διηθεί παρακείμενες δομές

N-επιχώριοι λεμφαδένες

- NX Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν
- N0 Μη παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων
- N1 Μετάσταση σε 1 έως 2 επιχώριους λεμφαδένες
- N2 Μετάσταση σε 3 έως 6 επιχώριους λεμφαδένες
- N3 Μετάσταση σε 7 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες
- N3a Μετάσταση σε 7 έως 15 επιχώριους λεμφαδένες
- N3b Μετάσταση σε 16 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες

M-απομακρυσμένες μεταστάσεις

- M0 Μη παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
- M1 Απομακρυσμένες μεταστάσεις

Ομάδες σταδιοποίησης

Στάδιο	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
IIB	T1	N2	M0
	T4a	N0	M0

	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
III A	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
III B	T4b	N0, N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
III C	T4a	N3	M0
	T4b	N2, N3	M0
IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

1.5 Πρόγνωση και προγνωστικοί δείκτες

α) Πρώιμο γαστρικό καρκίνωμα

Το πρώιμο γαστρικό καρκίνωμα έχει χαμηλό ποσοστό διήθησης αγγείων και λεμφαδενικών μεταστάσεων και καλή πρόγνωση (περίπου 90% των ασθενών ζει για 10 χρόνια). Διάφορες πολυπαραγοντικές αναλύσεις έχουν εντοπίσει σαν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για λεμφαδενική μετάσταση τους εξής: τη διήθηση του υποβλεννογόνιου χιτώνα, τη διάμετρο του καρκινώματος >3,0-3,5 εκ., την παρουσία αγγειακής διήθησης, την παρουσία λεμφαγγειακής διήθησης και τους εξελκωμένους ή εισέχοντες/εσκαμμένους όγκους. Για τους ασθενείς στους οποίους παρατηρούνται αυτά τα κριτήρια, η χειρουργική εξαίρεση θεωρείται γενικά αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση από την ενδοσκοπική εξαίρεση. Εν τούτοις, μερικοί ερευνητές ισχυρίζονται ότι τα μικρά ενδοβλεννογονικά γαστρικά καρκινώματα, αδιαφοροποίητου ιστολογικού τύπου, τα οποία έχουν διάμετρο <20 χιλ., χωρίς λεμφαγγειακή ή αγγειακή διήθηση, έχουν μικρό κίνδυνο λεμφαδενικής μετάστασης και θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με ενδοσκοπική εξαίρεση (Lauwers GY et al, 2010).

β) Σταδιοποίηση του γαστρικού καρκινώματος

Η σταδιοποίηση του γαστρικού καρκινώματος, κυρίως με την αναφορά της επέκτασης στον ορογόνο και στους λεμφαδένες (TNM), παραμένει ο κυριότερος

προγνωστικός δείκτης. Η πενταετής επιβίωση είναι 60-80% για ασθενείς με όγκους που διηθούν την βλεννογόνια μυική στιβάδα αλλά 50% για εκείνους με όγκους οι οποίοι διηθούν τον υπορογόνο χιτώνα. Δυστυχώς, κατά το χρόνο της διάγνωσης, οι περισσότεροι ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα έχουν ήδη λεμφαδενικές μεταστάσεις και γι'αυτούς προτείνεται μόνο η παρηγορητική χειρουργική επέμβαση. Η συχνά παρατηρούμενη στα διηθητικά καρκινώματα λεμφαγγειακή και αγγειακή διήθηση, σχετίζονται επίσης με κακή πρόγνωση. Σε ασθενείς στους οποίους παρατηρείται διήθηση 1 έως 6 λεμφαδένων, η πενταετής επιβίωση είναι περίπου 46%, ενώ σε ασθενείς με διήθηση 7 έως 15 λεμφαδένων είναι 30%. Ο λεμφαδενικός καθαρισμός των επιχώριων λεμφαδένων και η ιστολογική εκτίμηση έχουν μεγάλη αξία. Ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε «θεραπευτική» γαστρεκτομή αλλά περιορισμένο λεμφαδενικό καθαρισμό (D1/D0), έχουν εκτιμώμενη πενταετή επιβίωση γύρω στο 23%, σε σχέση με το 50% αυτών, οι οποίοι υφίστανται εκτενέστερο λεμφαδενικό καθαρισμό (Lauwers GY et al, 2010).

γ) Ιστολογικός τύπος

Η προγνωστική σημασία της ιστολογικής τυποποίησης του καρκινώματος είναι αντικρουόμενη. Είναι ακόμα υπό συζήτηση, το αν η πρόγνωση του διαχύτου καρκινώματος κατά Lauren είναι ή δεν είναι καλύτερη από του εντερικού τύπου καρκινώματος. Η πρόγνωση των ασθενών με χαμηλής συνοχής καρκίνωμα είναι κακή κυρίως στα παιδιά και νεαρούς ενήλικες, στους οποίους η διάγνωση γίνεται καθυστερημένα και πιθανώς εμπίπτουν στην κατηγορία του κληρονομικού διάχυτου γαστρικού καρκινώματος (Lauwers GY et al, 2010).

1.6 Θεραπεία

Χειρουργική θεραπεία του γαστρικού καρκινώματος

Η χειρουργική εξαίρεση είναι η μόνη θεραπευτική αντιμετώπιση του γαστρικού καρκινώματος. Μία ποικιλία μεθόδων μπορεί να εφαρμοστεί, σε συνάρτηση με τη θέση του όγκου και τον βαθμό της τοπικής έκτασης. Η πιο ριζική χειρουργική επέμβαση συνίσταται στην ολική γαστρεκτομή, αν και για σχετικά εντοπισμένους όγκους μπορεί να γίνει μερική γαστρεκτομή. Μερικά είδη υφολικής γαστρεκτομής αποτελούν την πιο συνήθη χειρουργική πρακτική. Η ολική γαστρεκτομή, εάν απαιτηθεί, συνίσταται στην αφαίρεση όλου του στομάχου, του μείζονος επιπλόου, συνήθως αφαίρεση του σπληνός και κατά περίπτωση του κατώτερου τμήματος του οισοφάγου, εάν ο όγκος είναι εγγύς

του. Στη ριζική υφολική γαστρεκτομή αφαιρείται το 80% του στομάχου, με το επίπλουν και μέρος του δωδεκαδακτύλου. Μετά τη γαστρεκτομή υπάρχει μία ευρεία ποικιλία επιλογών, για τη χειρουργική αποκατάσταση της συνέχειας του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπλέον, η έκταση της εκτομής των επιχώριων λεμφαδένων είχε γίνει αντικείμενο έντονης αντιπαράθεσης τα τελευταία χρόνια. Μία πρόσφατη έρευνα Ολλανδών ερευνητών αναφέρει πρόσθετες μετεγχειρητικές επιπλοκές και θνησιμότητα, οφειλόμενες στην πιο ριζική γιαπωνέζικη προσέγγιση της εκτεταμένης ριζικής γαστρεκτομής, με συνοδό εκτομή των επιχώριων λεμφαδένων, αν και αυτή η επέμβαση είναι επέμβαση ρουτίνας στην Ιαπωνία, χωρίς όμως να προσθέτει στη συνολική επιβίωση.

Η θνησιμότητα από την ολική γαστρεκτομή είναι σημαντική, με προβλήματα στη διατήρηση του σωματικού βάρους, ενώ, αν ο ασθενής επιβιώσει, απαιτείται εφ'όρου ζωής θεραπεία, για την αντιμετώπιση της σιδηροπενικής και μεγαλοβλαστικής αναιμίας.

Ασθενείς οι οποίοι παρουσιάζονται με μεγάλη ενδοκοιλιακή μάζα, κακοήθη ασκίτη, εμφανείς λεμφαδενικές μεταστάσεις, συμφύσεις του όγκου ή μεταστάσεις στο ήπαρ, θεωρούνται ανεγχείρητοι.

Ακτινοθεραπεία

Η παρηγορητική αντιμετώπιση μερικών συμπτωμάτων του γαστρικού καρκινώματος μπορεί περιστασιακά να επιτευχθεί με την ακτινοθεραπεία. Η θεραπεία είναι δύσκολη, επειδή υπάρχουν αρκετά ακτινοευαίσθητα όργανα στην άνω κοιλιακή χώρα, συγκεκριμένα το λεπτό έντερο, το ήπαρ, ο μυελός των οστών και οι νεφροί. Η δόση των 40Gy μπορεί συνήθως να χορηγηθεί με ασφάλεια, σε μία χρονική περίοδο 4-5 εβδομάδων. Η ανορεξία και η ναυτία είναι συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες και οι ασθενείς συνήθως χάνουν βάρος κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η πρόθεση είναι παρηγορητική, αν και περιστασιακή αύξηση του χρόνου επιβίωσης έχει παρατηρηθεί.

Χημειοθεραπεία

Στο προχωρημένο γαστρικό καρκίνωμα, η χημειοθεραπεία μπορεί να έχει ποσοστά επιτυχίας >50%, ωστόσο αυτά διαρκούν λίγους μήνες. Υπάρχει ένδειξη ότι η επιβίωση επιμηκώνεται με τη χρήση χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων, είτε κατά μόνας είτε σε συνδυασμό. Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης χημειοθεραπείας είναι καλύτερα από τα αποτελέσματα της χρήσης ενός σκευάσματος και τώρα αποτελούν τη θεραπεία

επιλογής. Στο προχωρημένο γαστρικό καρκίνωμα, διάφοροι συνδυασμοί χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί. Ο συνδυασμός των 5-FU, doxorubicin και mitomycin (FAM) είχε ως αποτέλεσμα μία ανταπόκριση του ποσοστού του 40%, άλλα πιο επιθετικά σχήματα έχουν ανταπόκριση σε ποσοστό 62%. Η epirubicin χρησιμοποιείται πιο συχνά από την doxorubicin, συχνά σε συνδυασμό με cisplatin και έγχυση 5-FU, η οποία αποδείχτηκε ιδιαίτερα δραστική σε σύγκριση με αρκετά άλλα σχήματα. Η ανεκτικότητα αυτού του σχήματος έχει καλυτερέψει με την αντικατάσταση του cisplatin από το oxaliplatin και του 5-FU από το capecitabine per os.

Επικουρική χημειοθεραπεία

Υπάρχει πρόσφατο ενδιαφέρον στη χρήση της χημειοθεραπείας επικουρικά στη χειρουργική εξαίρεση του όγκου, με μικρή ή καμία βελτίωση ωστόσο, όπως αποδεικνύεται από διάφορες μελέτες. Συμπερασματικά, οι περισσότερες μελέτες δεν απέδειξαν βελτίωση της επιβίωσης σε ομάδα ασθενών που αντιμετωπίστηκαν με επικουρική χημειοθεραπεία, σε σύγκριση με ομάδα ασθενών που αντιμετωπίστηκαν μόνο χειρουργικά. Ωστόσο μία τυχαιοποιημένη μελέτη, με περισσότερους από 500 ασθενείς, έδειξε θετικά αποτελέσματα. Η μέση επιβίωση των ασθενών, οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν μόνο χειρουργικά ήταν 27 μήνες, σε σχέση με αυτούς που αντιμετωπίστηκαν επιπρόσθετα με χημειοθεραπεία, η οποία ήταν 36 μήνες. Συμπερασματικά, με όρους ανεκτικότητας και επιβίωσης, η χημειοθεραπεία είναι ελκυστική επιλογή, κυρίως όταν η χειρουργική επέμβαση είναι ιδιαίτερα επιτυχημένη (Tobias J, 2010).

2. Βλεννοπρωτεΐνες (MUC)

Οι βλεννοπρωτεΐνες είναι υψηλού μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνες (>200kDa), με ολιγοσακχαρίδια συνδεδεμένα σε έναν πεπτιδικό σκελετό με Ο-γλυκοσιδικούς δεσμούς, οι οποίες παράγονται από διάφορα επιθηλιακά κύτταρα (Khoury T et al, 2006). Διαχωρίζονται σε βλεννοπρωτεΐνες συνδεόμενες με την κυτταρική μεμβράνη (membrane-associated mucins, MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC16, MUC17), σε εκκρινόμενες βλεννοπρωτεΐνες γέλης (gel forming secreted mucins, MUC2, MUC5AC και MUC6) και σε εκκρινόμενες διαλυτές βλεννοπρωτεΐνες (soluble secreted mucin, MUC7) (Basturk O et al, 2010).

Η MUC1 γλυκοπρωτεΐνη μεμβράνης ή βλεννοπρωτεΐνη τύπου μαζικού αδένου (Basturk O et al, 2010), εκφράζεται σε πολλά φυσιολογικά επιθήλια, μεταξύ των οποίων σε αυτό των βρόγχων, του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, του τελικού ειλεού και του στομάχου (Tsukashita S et al, 2001), βασικά στο προς τον αυλό κυτταρικό άκρο (apical) σχεδόν όλων των επιθηλιακών κυττάρων των αδενίων και των πόρων (Khoury T et al, 2006). Θεωρείται ότι έχει ανασταλτικό ρόλο στην διακυτταρική και στην μεταξύ κυττάρων-στρώματος επικοινωνία, καθώς επίσης και στην κυτταροτοξική ανοσολογική απάντηση (Levi E et al, 2004). Η MUC1 φαίνεται να λειτουργεί σαν ένας μεταδότης σήματος, ο οποίος αλληλεπιδρά στενά με την οικογένεια του EGFR και συμμετέχει στην διαδικασία της καρκινογένεσης (Levi E et al, 2004), ενώ η έκφρασή της φαίνεται επίσης να συνδέεται με την ανάπτυξη και εξέλιξη του γαστρικού καρκινώματος (Tsukashita S et al, 2001). Τέλος, ο βαθμός γλυκοζυλίωσης και έκφρασης της MUC1 παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών και νεοπλασματικών ιστών, αποτελώντας ως εκ τούτου πιθανό ανοσοθεραπευτικό στόχο (Beatty PL and Finn OJ, 2013). Έτσι, η MUC1 που εκφράζεται από τα καρκινώματα μαστού είναι φτωχά γλυκοζυλιωμένη, ενώ σε αντίθεση στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, παρατηρείται υψηλού επιπέδου έκφραση της MUC1, η οποία είναι πλήρως γλυκοζυλιωμένη στα προχωρημένα στάδια ή σε μεταστατική νόσο (Utsunomiya T et al, 1998).

Η MUC2, επίσης γνωστή ως εντερικού τύπου εκκριτική βλεννοπρωτεΐνη, τύπου καλυκοειδών κυττάρων βλεννοπρωτεΐνη ή βλεννοπρωτεΐνη γέλης, παρουσιάζει περιορισμένο πρότυπο έκφρασης στα βλενώδη καλυκοειδή κύτταρα (goblet cells) του λεπτού και του παχέος εντέρου (Ho SB, et al, 1993). Είναι ένα παράγωγο του γονιδίου

MUC2, το οποίο έχει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες και ως εκ τούτου η έκφραση της *MUC2* σχετίζεται με ηπιότερη συμπεριφορά των όγκων (Yozezawa S et al, 2008).

Ως γαστρικού τύπου βλεννοπρωτεΐνες θεωρούνται η *MUC5AC*, η οποία εκφράζεται από το επιφανειακό επιθήλιο των γαστρικών βοθρίων και η *MUC6*, η οποία εκφράζεται από το επιθήλιο των πυλωρικών αδενίων (Reis CA et al, 1999).

Το πρότυπο έκφρασης των βλεννοπρωτεϊνών *MUC* φαίνεται ότι σχετίζεται με την διαφοροποίηση και τον ιστολογικό τύπο των γαστρικών καρκινωμάτων. Για παράδειγμα η *MUC5AC* εκφράζεται στα διάχυτα και διηθητικά καρκινώματα, ενώ η *MUC2* εκφράζεται συχνά στα βλενώδη καρκινώματα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στα διάφορα επιθηλιακά κύτταρα και όγκους, η έκφραση μερικών *MUC* πρωτεϊνών συνδέεται με το μονοπάτι ενδοκυττάριας σηματοδότησης Notch (Kang H et al, 2012).

3. Κερατίνες και επιθηλιακή διαφοροποίηση

Οι κερατίνες (CK) είναι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού των επιθηλιακών κυττάρων που ανήκουν στην οικογένεια των διάμεσων ινιδίων και έχουν υψηλό βαθμό ειδικότητας και ευαισθησίας στη διάγνωση των καρκινωμάτων. Άλλα μέλη της οικογένειας των διάμεσων ινιδίων, τα οποία επίσης χρησιμοποιούνται ως δείκτες διαφοροποίησης, είναι η βιμεντίνη (για το μεσέγγυμα), η GFAP (για τη γλοία), η δεσμίνη (για τους μύες) και τα νευροϊνίδια (για τα νεύρα) (Rekhtman N, Biskop JA, 2011).

Υπάρχουν τουλάχιστον 20 διαφορετικοί τύποι κερατινών, που έχουν περιγραφεί από τον Moll και το τωρινό σύστημα προσδιορισμού είναι γνωστό ως κατάλογος του Moll (Moll R, Cell, 1982). Οι κερατίνες έχουν προσδιοριστεί με βάση την ηλεκτροφόρησή τους σε γέλη (gel) δύο διαστάσεων, κατά την οποία διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και το ισοηλεκτρικό τους σημείο (Moll R, Histochem Cell Biol, 2008). Από αυτήν την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι οι κερατίνες ανήκουν σε δύο κατηγορίες: την ομάδα των βασικών (CK1 έως 8) και την ομάδα των όξιων (CK9 έως 20) κερατινών. Οι κερατίνες και των δύο κατηγοριών έχουν καταχωρηθεί με αρίθμηση από το υψηλότερο μοριακό βάρος (HMW) προς το χαμηλότερο (LMW), όπως δείχνει το ακόλουθο διάγραμμα (Rekhtman N, Biskop JA, 2011).

Βασική CK (Type B/Class II):	Όξινη CK (Type A/Class I):	
CK1	CK9	HMWCK= κερατίνες πλακώδους επιθηλίου (Ab: CK903, CK5/6)
CK2	CK10	
CK3	CK11	
CK4	:	
CK5	CK16	
CK6	CK17	
CK7	CK18	LMWCK= απλές ή μη πλακώδους επιθηλίου κερατίνες (Ab: Cam 5.2)
CK8	CK19	
	CK20	
Βασικές CKs (Ab: AE3)	Όξινες CKs (Ab: AE1)	

Οι κερατίνες τυπικά εκφράζονται σε ζεύγη για κάθε είδος κυττάρου. Τα ζεύγη αυτά αντιπροσωπεύονται από μία όξινη (τύπος I) και μία βασική (τύπος II) κερατίνη, οι οποίες διαφέρουν στο μοριακό βάρος, το οποίο κυμαίνεται από 40 έως 67 kD. Όπως περιγράφηκε από τον Miettinen, οι κερατίνες τείνουν να δημιουργούν ζεύγη μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης, έτσι ώστε μία τύπου I κερατίνη συνδέεται με μία τύπου II, η οποία είναι 7 έως 9 kD μεγαλύτερου μοριακού βάρους. (Wick M, Hornick J, 2010).

Για διαγνωστικούς σκοπούς, οι κερατίνες έχουν χωριστεί, όπως δείχνει και το διάγραμμα, σε LMWCK και σε HMWCK. Ο διαχωρισμός αυτός αντιστοιχεί στην ειδική κατανομή των κερατινών αυτών των δύο ομάδων στους φυσιολογικούς ιστούς:

- Οι HMWCKs εκφράζονται κυρίως στο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο (και στα βασικά κύτταρα) και είναι γνωστές ως κερατίνες πλακώδους επιθηλίου. Είναι μεγάλες και ικανές να σχηματίσουν ένα πυκνό κυτταροπλασματικό δίκτυο ινιδίων, το οποίο καθιστά ανθεκτικά τα επιθηλιακά κύτταρα στο μηχανικό στρες. Μεγάλες δέσμες των HMWCKs είναι γνωστές μέσω του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ως «τονοϊνίδια» και αυτές οι δομές αποτελούν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του πλακώδους επιθηλίου, καθώς και των καρκινωμάτων εκ πλακωδών κυττάρων (SqCC).
- Σε αντίθεση, οι LMWCKs είναι αραιά κατανεμημένες στο κυτταρόπλασμα και δεν σχηματίζουν δέσμες. Ως εκ τούτου είναι χαρακτηριστικές των επιθηλιακών κυττάρων των ενδοκοιλιακών οργάνων, τα οποία υπόκεινται σε μικρότερο μηχανικό στρες, όπως το ήπαρ, οι νεφροί και ποικίλα αδενικά επιθήλια π.χ. πάγκρεας. Οι LMWCKs είναι γνωστές ως κερατίνες μη πλακώδους επιθηλίου ή απλές κερατίνες και εκφράζονται σε όλους τους επιθηλιακούς ιστούς, με εξαίρεση το κερατινοποιούμενο πλακώδες επιθήλιο. Πρέπει να σημειωθεί ότι μερικά αδενικά επιθήλια (όπως του μαστού) συνεκφράζουν HMWCK και LMWCK, και ότι έκφραση των HMWCK μπορεί να παρατηρηθεί σε μη πλακώδες επιθήλιο, ως αποτέλεσμα αντιδραστικών καταστάσεων (όπως η φλεγμονή). Έτσι ο εμπειρικός κανόνας: «πλακώδες επιθήλιο= HMWCK, μη πλακώδες επιθήλιο= LMWCK» δεν ισχύει πάντοτε.
- Ο όρος διάμεσου μοριακού βάρους κερατίνες εφαρμόζεται κατά περίπτωση και αναφέρεται στις ελαφρύτερες κυτοκερατίνες της ομάδας HMWCK (CK5,6,17). Αυτές είναι επίσης γνωστές ως βασικές κερατίνες, γιατί εκφράζονται κυρίως στα βασικά κύτταρα.

Τα παραπάνω πρότυπα έκφρασης των κερατινών διατηρούνται στα αντίστοιχα καρκινώματα, οπότε και αποτελούν χρήσιμους διαγνωστικούς δείκτες (Rekhtman N, Biskop JA, 2011).

Η κερατίνη 19 είναι τύπου I και είναι η μικρότερη, παρουσιάζοντας μεγάλο εύρος ιστικής κατανομής. Εκφράζεται στα περισσότερα απλά επιθήλια, εκτός από αυτά των παρεγχυματικών οργάνων, δηλαδή τα ηπατοκύτταρα, τα αδενοκυψελιδικά κύτταρα του παγκρέατος και το επιθήλιο των εγγύς νεφρικών σωληναρίων. Λειτουργικά θεωρείται ότι είναι περιττή (dispensable), καθώς τα knockout για την κερατίνη 19 ποντίκια είναι απόλυτα φυσιολογικά, με καλή αναπαραγωγή. Δεν έχει βρεθεί κάποια μετάλλαξη του γονιδίου της κερατίνης 19 που να σχετίζεται με κάποια νόσο (Moll R et al, 2008).

Η κερατίνη 14 είναι επίσης τύπου I κερατίνη και σχηματίζει ζεύγη με την κερατίνη 5 στα πολύστιβα πλακώδη επιθήλια, κερατινοποιούμενα και μη, δημιουργώντας τα τονοϊνίδια, τα οποία προσδένονται στα δεσμοσώματα και ημιδεσμοσώματα. Και οι δύο παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στην αδιαφοροποίητη βασική στιβάδα, η οποία περιλαμβάνει τα μητρικά/βλαστικά (stem) κύτταρα, ενώ η έκφρασή τους ελατώνεται στις ανώτερες στιβάδες. Επιπλέον, οι κερατίνες 5 και 14 εκφράζονται στα βασικά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα των αδενικών επιθηλιακών ιστών (Purkis PE et al, 1990).

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ασθενείς και μέθοδοι

1.1 Ασθενείς

Από το αρχείο του Β' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αττικών, επιλέχθηκαν 154 περιπτώσεις ασθενών με αδενοκαρκίνωμα στομάχου, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε γαστρεκτομή το χρονικό διάστημα 2002-2011. Όλα τα περιστατικά συνοδεύονταν από πληροφορίες για την ηλικία και το φύλο των ασθενών, την εντόπιση, τον ιστολογικό τύπο, το βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλάσματος, το βάθος διήθησης και την κατάσταση των επιχώριων λεμφαδένων. Η μονιμοποίηση των ανωτέρω παρασκευασμάτων έγινε σε τιτλοποιημένο διάλυμα φορμόλης 10%. Επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικές θέσεις, οι οποίες υπέστησαν κατεργασία αφυδάτωσης, διαύγασης και εμπότισης σε παραφίνη και στο τέλος εγκλείστηκαν σε κύβους παραφίνης.

1.2 Ιστικές μικροσυστοιχίες

Ιστολογικές τομές με χρώση Αιματοξυλίνης και Ηωσίνης, μελετήθηκαν και έγινε επιλογή θέσεων που αντιστοιχούσαν στον όγκο (κέντρο και περιφέρεια/εν τω βάθει διηθητικό μέτωπο και ενδοβλεννογονικό στοιχείο), σε φυσιολογικό βλεννογόνο, σε εντερική μετάπλαση, σε δυσπλασία, σε υπερπλασία, σε λεμφαδενικές μεταστάσεις και σε ορισμένες περιπτώσεις σε ενδοαγγειακά έμβολα. Οι θέσεις αυτές εντοπιστήκαν στους αντίστοιχους κύβους παραφίνης (κύβοι δότες) και αφαιρέθηκαν με τη μορφή μικρών κυλίνδρων, διαμέτρου 2 χιλιοστών. Οι κύλινδροι αυτοί, με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν σε κενούς κύβους παραφίνης (κύβοι δέκτες). Με αυτόν τον τρόπο κατασκευάστηκαν 36 νέοι κύβοι παραφίνης.

Η πλαρφόρμα κατασκευής ιστικών μικροσυστοιχιών ATA-100, της εταιρείας Chemicon International, ήταν στη διάθεση μας. Με το σύστημα αυτό, μειώθηκε ο χρόνος και το κόστος των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και επιπλέον προσέφερε τη δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης νεοπλασμάτων από διαφορετικούς ασθενείς. Αποτελείται από μία κινούμενη τράπεζα και από ένα σύστημα δότη-δέκτη. Κάθε νέος κύβος αποτελείται από 39 θέσεις (spots), οι οποίες είναι τοποθετημένες σε πέντε στήλες (Α- Ε) και οκτώ σειρές (1-8). Για να γίνει η τέλεια ενσωμάτωση, οι κύβοι δέκτες επώαστηκαν για 1 λεπτό σε θερμαινόμενη πλάκα στους 70°C και στη συνέχεια σε μεταλλικό καλούπι με λίγη υγρή παραφίνη για 2 λεπτά σε θερμοκρασία 57°C.

Ακολούθησε μικροτόμηση και λήψη τομών για χρώση Αιματοξυλίνης και Ηωσίνης και ανοσοϊστοχημείας.

1.3 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στην καθημερινή ρουτίνα ενός παθολογοανατομικού εργαστηρίου και επιτρέπει την οπτικοποίηση των ιστικών/κυτταρικών αντιγόνων μέσω της διαδοχικής επώασης, αρχικά με το ειδικό έναντι του αντιγόνου αντίσωμα (πρωτογενές αντίσωμα) και στη συνέχεια με ένα δευτερογενές αντίσωμα (συνήθως προσδεμένο σε πολυμερές για ενίσχυση του σήματος) έναντι του πρωτογενούς αντισώματος και τέλος με τη χρήση ενός ενζυμικού συμπλόκου, του υποστρώματος και του χρωμογόνου. Η ενζυμική ενεργοποίηση του χρωμογόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ορατού προϊόντος αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου φωτός.

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πρωτογενή αντισώματα:

Αντίσωμα	Αραίωση	Κλώνος/Εταιρεία
MUC-1	1:200	Ma695, Novocastra
MUC-2	1:100	CCP58, BioGenex
MUC5AC	1:150	45M1, Thermo Scientific
MUC-6	1:50	CLH5, Novocastra
Cytokeratin 19	1:50	RCK108, Dako
Cytokeratin 14	1:20	LL002, Novocastra

Για τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών στις ιστολογικές τομές, επιλέχθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος με χρήση συστήματος ανίχνευσης EnVision (DAKO). Η μέθοδος περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια*:

- Επώαση σε ξηρό κλίβανο στους 65°C για 2 ώρες
- Ανάκτηση αντιγονικών επιτόπων, με θερμική επεξεργασία (σε φούρνο μικροκυμάτων 850 Watt) των ιστολογικών τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PT [Target Retrieval Solution High pH(=9) 50x-K8004] για τα αντισώματα MUC2, MUC5AC και Cytokeratin 19 και σε ρυθμιστικό διάλυμα S-1700 [Target Retrieval Solution Low pH(=6) για τα αντισώματα MUC6 και Cytokeratin 14.

- Παραμονή των τομών σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, έκπλυση με τρεχούμενο νερό σε χαμηλή ροή για 10 λεπτά και μετά σε απεσταγμένο νερό.
- Επώαση σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 0,3% σε σκοτεινό περιβάλλον για 10 λεπτά. Ο στόχος είναι η αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης.
- Έκπλυση σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά, τρεις αλλαγές
- Έκπλυση σε διάλυμα TBS (Tris Buffered Saline)/Tween 20 (Thermo Scientific) για 5 λεπτά, τρεις αλλαγές
- Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα για 45 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έκπλυση με διάλυμα TBS για 5 λεπτά
- Επώαση με τον En Vision πολυμερές (DAKO, CA, USA) για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
- Έκπλυση με διάλυμα TBS, τρεις αλλαγές
- Επώαση με διάλυμα DAB 2% (DAKO, CA, USA) για 10 λεπτά
- Έκπλυση με άφθονο νερό
- Αντίχρωση των τομών, με εμβάπτιση σε αιματοξυλίνη για 1 λεπτό
- Έκπλυση με άφθονο νερό
- Αφυδάτωση με δέκα εμβάπτισεις σε ανιούσα σειρά αλκοολών (50°, 70°, 80°, 96°, 100°)
- Εμβάπτιση σε ξυλόλη και επικάλυψη με καλυπτρίδα

*Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας DAKO Autostainer Plus.

Για την ανοσοϊστοχημική χρώση με το αντίσωμα MUC1 χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο μηχάνημα Leica BOND-MAX με το πρωτόκολλο Bond Polymer Refine Detection System (IHC protocol). Η θερμοεπαγόμενη ανάκτηση των επιτόπων επιτεύχθη με το ρυθμιστικό διάλυμα Bond Epitope Retrieval Solution 1 (ER1) με pH 5.9-6.1 για 20 λεπτά. Στη συνέχεια η διαδικασία έχει ως εξής:

- Peroxide Block: 10 min

- Marker (πρωτογενές αντίσωμα, MUC1): 20 min
- Post Primary: 15 min
- Polymer: 15 min
- Mixed DAB Refine: 9 min

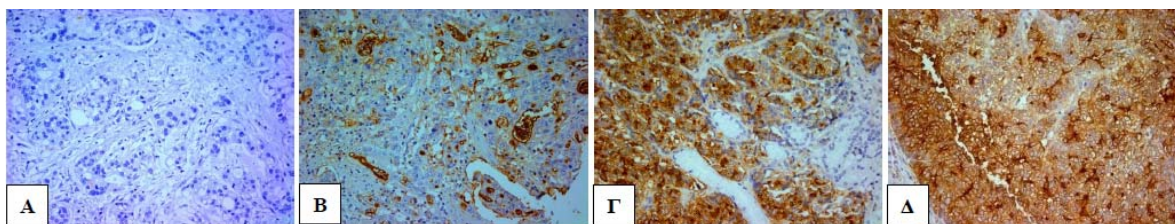
1.4. Εκτίμηση ανοσοχρώσεων

Η εκτίμηση έγινε σε φωτομικροσκόπιο Nikon Eclipse E400 και μετρήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εμφάνιζαν θετική ανοσοχρώση για τα αντισώματα MUC2, MUC5AC, MUC6, Cytokeratin19 και Cytokeratin 14, ενώ για τη MUC1 αξιολογήθηκε και το είδος της χρώσης των κυττάρων, δηλαδή apical (χρώση στο ένα κυτταροπλασματικό άκρο), κυτταροπλασματική και μικτή.

Για τη στατιστική ανάλυση και για όλες τις μεταβλητές που μελετήθηκαν (γλυκοπρωτεΐνες MUC και κερατίνη 19), ως αρνητικά ορίστηκαν τα περιστατικά με score 0 και όλα τα υπόλοιπα ως θετικά.

MUC1

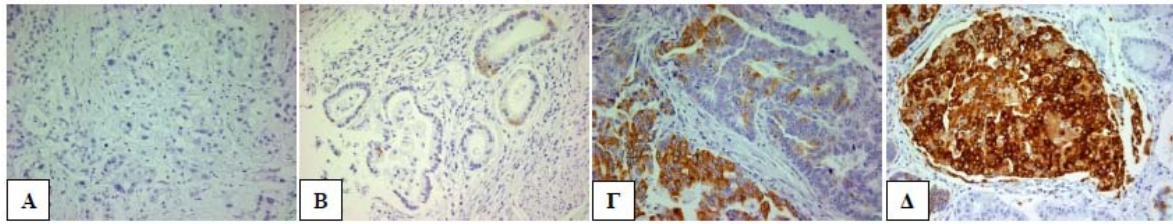
<20% των νεοπλασματικών κυττάρων	0
Μεμβρανική \geq 20%	A
Κυτταροπλασματική \geq 20%	C
Μικτή \geq 20%	A/C



Εικόνα 2: Έκφραση της MUC1: Αρνητική (Α), μεμβρανική (apical) (Β), κυτταροπλασματική (Γ) και μικτή μεμβρανική/κυτταροπλασματική (Δ) χρώση.

MUC2

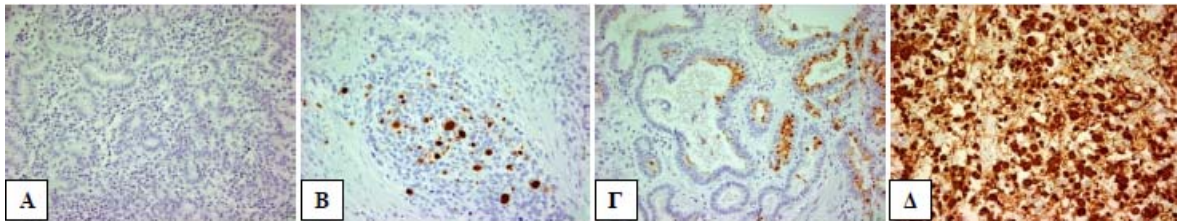
Ποσοστό θετικών κυττάρων	Score
0-<5%	0
5-30%	1
30-60%	2
60-100%	3



Εικόνα 3: Έκφραση της MUC2: Αρνητική (Α), θετική 5-30% (Β), θετική 30-60% (Γ), θετική 60-100% (Δ).

MUC5AC

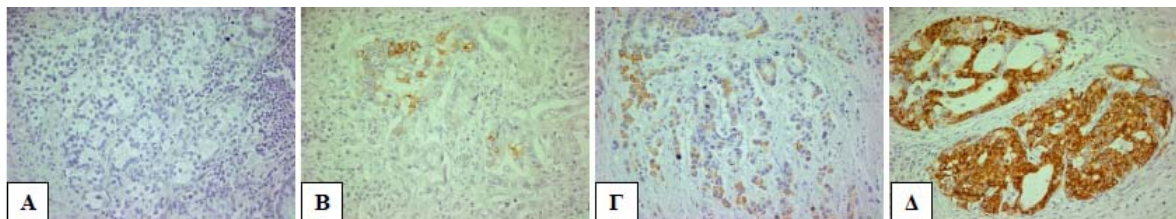
Ποσοστό θετικών κυττάρων	Score
0-<5%	0
5-30%	1
30-60%	2
60-100%	3



Εικόνα 4: Έκφραση της MUC5AC: Αρνητική (Α), θετική 5-30% (Β), θετική 30-60% (Γ), θετική 60-100% (Δ).

MUC6

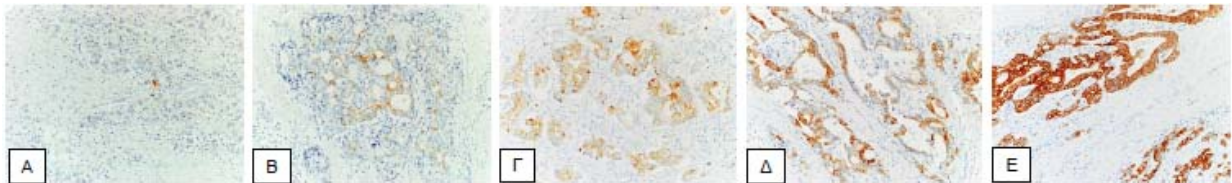
Ποσοστό θετικών κυττάρων	Score
0-<5%	0
5-30%	1
30-60%	2
60-100%	3



Εικόνα 5: Έκφραση της MUC6: Αρνητική (Α), θετική 5-30% (Β), θετική 30-60% (Γ), θετική 60-100% (Δ).

Κερατίνη 19

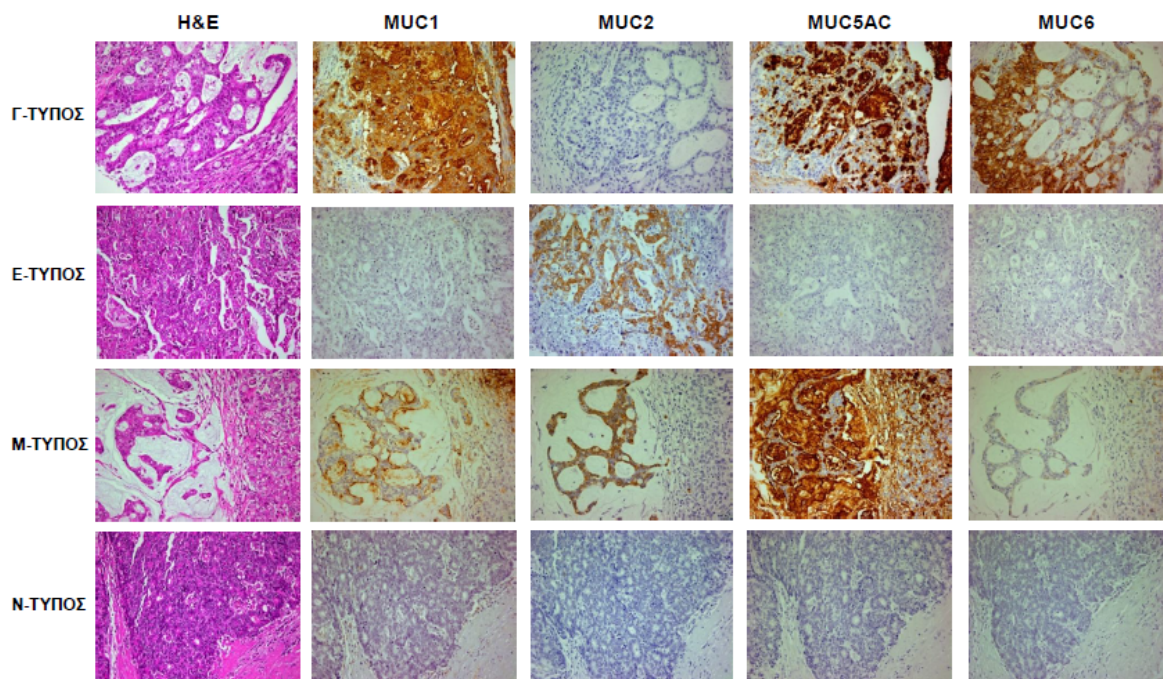
Ποσοστό θετικών κυττάρων	Score
0-<5%	0
5-25%	1
25-50%	2
50-75%	3
75-100%	4



Εικόνα 6: Έκφραση της κερατίνης 19: Αρνητική (Α), θετική 5-25% (Β), θετική 25-50% (Γ), θετική 50-75% (Δ), θετική 75-100%.

Επίσης τα περιστατικά μας ομαδοποιήθηκαν με βάση το φαινότυπο που προκύπτει από την θετική ή αρνητική έκφραση των επιμέρους γλυκοπρωτεϊνών (Nishimura R et al, 2013), ως εξής (Εικόνα 7):

- i) Γαστρικός φαινοτύπος (Γ-τύπος): περιστατικά θετικά σε μία ή περισσότερες των MUC1, 5AC, 6 και ταυτόχρονα MUC2(-).
- ii) Εντερικός φαινοτύπος (Ε-τύπος): περιστατικά θετικά στη MUC2 και αρνητικά σε όλες τις υπόλοιπες
- iii) Μικτός φαινοτύπος (Μ-τύπος): περιστατικά θετικά στη MUC2, με επιπλέον θετικότητα σε μία ή περισσότερες των MUC1, 5AC, 6.
- iv) Μηδενικός (Null) φαινοτύπος (N-τύπος): περιστατικά αρνητικά (=0) σε όλες τις MUC.



Εικόνα 7: Ανοσοφαινότυποι γαστρικών καρκινωμάτων.

1.5 Στατιστική ανάλυση

Αρχικά, έγινε περιγραφική στατιστική ανάλυση για τις μεταβλητές της εν λόγω μελέτης. Οι διαφορές μεταξύ των ποσοστιαίων συχνοτήτων των ασθενών κάθε κατηγορίας – χωρισμένων βάσει των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων – έγινε με χ^2 τεστ, ενώ έγινε και η διόρθωση κατά Fisher στους πίνακες 2x2. Εκτός από το σύνολο των ασθενών, η ίδια ανάλυση έγινε και σε υποκατηγορίες ασθενών [MUC1+/MUC2- και MUC1-/MUC2+, όπως επίσης και στις υποκατηγορίες με βάση τον ανοσοφαινότυπο (γαστρικός, εντερικός, μικτός και μηδενικός)]. Τέλος, διερευνήθηκε η ύπαρξη τυχόν συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των διαφόρων υπό μελέτη πρωτεϊνών (MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, και KRT19), όπως επίσης και μεταξύ των MUC1/MUC2 και MUC1/MUC2/MUC5AC/MUC6 συνδιασμένων φαινοτύπων και των διαφόρων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων.

2. Αποτελέσματα

2.1 Ασθενείς

Συνολικά 154 ασθενείς συμμετείχαν στη μελέτη, με μέση ηλικία τα 68 έτη και εύρος 27-96 έτη (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Ηλικίες

Μεταβλητή	N	Mean ± S.E.	Μέση	Εύρος
Ηλικία	137	66 ± 1	68	27 - 96

Από τους ασθενείς αυτούς, 62,1% ήταν άνδρες και 37,9% γυναίκες, με τους εξής τύπους καρκινωμάτων: 53 (37,3%) διαχύτου τύπου, 66 (46,5%) εντερικού τύπου, 15 (10,6%) μικτού τύπου και 8 (5,6%) βλεννώδους τύπου. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά των νεοπλασμάτων (βάθος διήθησης, πρώιμα-προχωρημένα, λεμφαδενικές μεταστάσεις) περιγράφονται στον πίνακα 2.

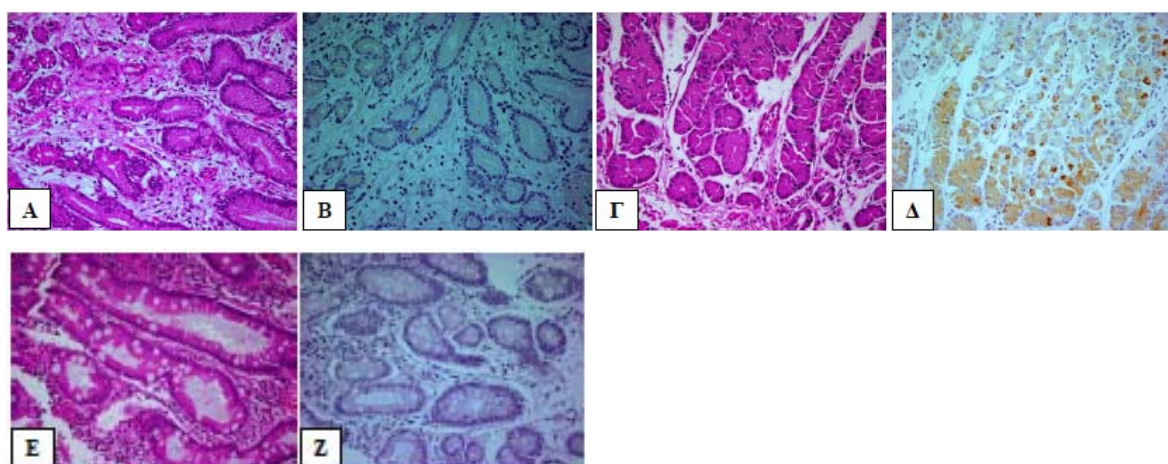
Πίνακας 2: Φύλο, τύποι καρκινωμάτων, βάθος διήθησης (T), λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Μεταβλητή	N	Ποσοστό (%)
Φύλο (153/154 ασθενείς)		
Γυναίκες	58	37,9
Άνδρες	95	62,1
Τύπος (142/154 ασθενείς)		
Διάχυτος	53	37,3
Εντερικός	66	46,5
Μικτός	15	10,6
Βλεννώδης	8	5,6
T (153/154 ασθενείς)		
Tis	1	0,7
T1	28	18,3
T2	21	13,7
T3	37	24,2
T4a	60	39,2
T4b	6	3,9
T στάδιο (153/154 ασθενείς)		
Πρώιμο	29	19,0
Προχωρημένο	124	81,0
N (154/154 ασθενείς)		
N0	45	29,2
N1	23	14,9
N2	31	20,1

N3a	36	23,4
N3b	19	12,3
Κατάσταση λεμφαδένων (154/154 ασθενείς)		
Αρνητικοί	45	29,2
Θετικοί	109	70,8

2.2 Έκφραση της MUC1

Όσον αφορά το φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο παρατηρείται ασθενής έκφραση στα γαστρικά βοθρία και σε αδένια του άντρου, καθώς και μικτή κυτταροπλασματική και μεμβρανική χρώση (A/C) στα εξειδικευμένα αδένια του σώματος. Δεν εκτιμάται ανοσοθετικότητα των βλενωδών καλυκοειδών (goblet) και των κυλινδρικών (columnar) κυττάρων, στις θέσεις εντερικής μετάπλασης.



Εικόνα 8: Έκφραση της MUC1 στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο και στην εντερική μετάπλαση: φυσιολογικό άντρο (A+B), φυσιολογικό σώμα (Γ+Δ), εντερική μετάπλαση (E+Z).

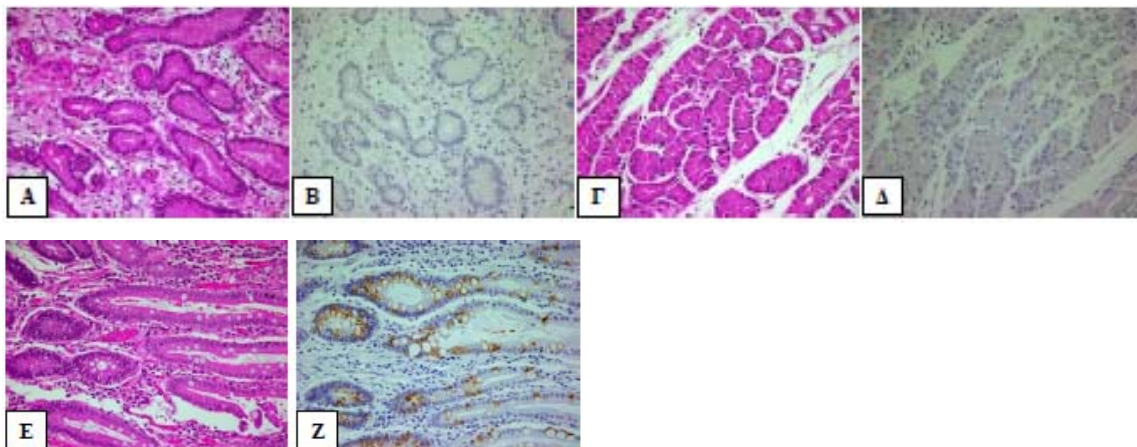
Όσον αφορά τα νεοπλάσματα, ανοσοθετικότητα παρατηρείται στο 29,2% αυτών και ανοσοθετικότητα στις λεμφαδενικές μεταστάσεις στο 34,2% ($p=0.52$) (Πίνακας 3). Δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ηλικία, το φύλο, το βάθος διήθησης (πρώιμο/προχωρημένο) και την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, ενώ παρατηρήθηκε συχνότερη ανοσοθετικότητα στα εντερικού σε σχέση με τα διαχύτου τύπου καρκινώματα (51,6% έναντι 5,8%, $p<0.05$).

Πίνακας 3: Έκφραση της MUC1.

		MUC1				P value	
		Σύνολο	Αρνητική		Θετική		
Ηλικία (67)	<68 έτη	62	48	77,4%	14	22,6%	0,16
	>=68 έτη	59	38	64,4%	21	35,6%	
Ηλικία (68)	<=68 έτη	67	52	77,6%	15	22,4%	0,11
	>68 έτη	54	34	63,0%	20	37,0%	
Φύλο	Γυναίκες	53	42	79,2%	11	20,8%	0,086
	Άνδρες	83	54	65,1%	29	34,9%	
Τύπος	Διάχυτος	52	49	94,2%	3	5,8%	<0,001
	Εντερικός	62	30	48,4%	32	51,6%	
	Μικτός	13	12	92,3%	1	7,7%	
	Βλεννώδης	8	6	75,0%	2	25,0%	
Τύπος (1-3)	Διάχυτος	52	49	94,2%	3	5,8%	<0,001
	Εντερικός	62	30	48,4%	32	51,6%	
	Μικτός	13	12	92,3%	1	7,7%	
Τ στάδιο	Πρώιμο	21	17	81,0%	4	19,0%	0,43
	Προχωρημένο	115	80	69,6%	35	30,4%	
Κατάσταση λεμφαδένων	Αρνητικοί	34	26	76,5%	8	23,5%	0,52
	Θετικοί	103	71	68,9%	32	31,1%	

2.3 Έκφραση της MUC2

Ο φυσιολογικός γαστρικός βλεννογόνος δεν παρουσιάζει έκφραση της MUC2, ενώ παρατηρείται ανοσοέκφραση στις θέσεις εντερικής μετάπλασης, πλήρους (τύπου Ι) και ατελούς (τύπου ΙΙ), όπως αναμένεται.



Εικόνα 9: Έκφραση της MUC2 στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο και στην εντερική μετάπλαση: φυσιολογικό άντρο (Α και Β), φυσιολογικό σώμα (Γ και Δ), εντερική μετάπλαση (Ε και Ζ).

Όσον αφορά τα νεοπλάσματα, ανοσοθετικότητα παρατηρείται στο 31,2% αυτών και ανοσοθετικότητα στις λεμφαδενικές μεταστάσεις στο 20,0%. Η ανοσοθετικότητα του πρωτοπαθούς νεοπλάσματος στη MUC2 σχετίζεται με μικρότερη πιθανότητα λεμφαδενικής μεταστατικής νόσου ($p=0.019$). Δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ηλικία, το φύλο, το βάθος διήθησης (πρώιμο/προχωρημένο), ενώ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ανοσοθετικότητα μεταξύ των κατηγοριών: διαχύτου τύπου 21,2%, εντερικού τύπου 27,0%, μικτά 46,2%, βλεννώδη 100%, $p<0.001$ (Πίνακας 4).

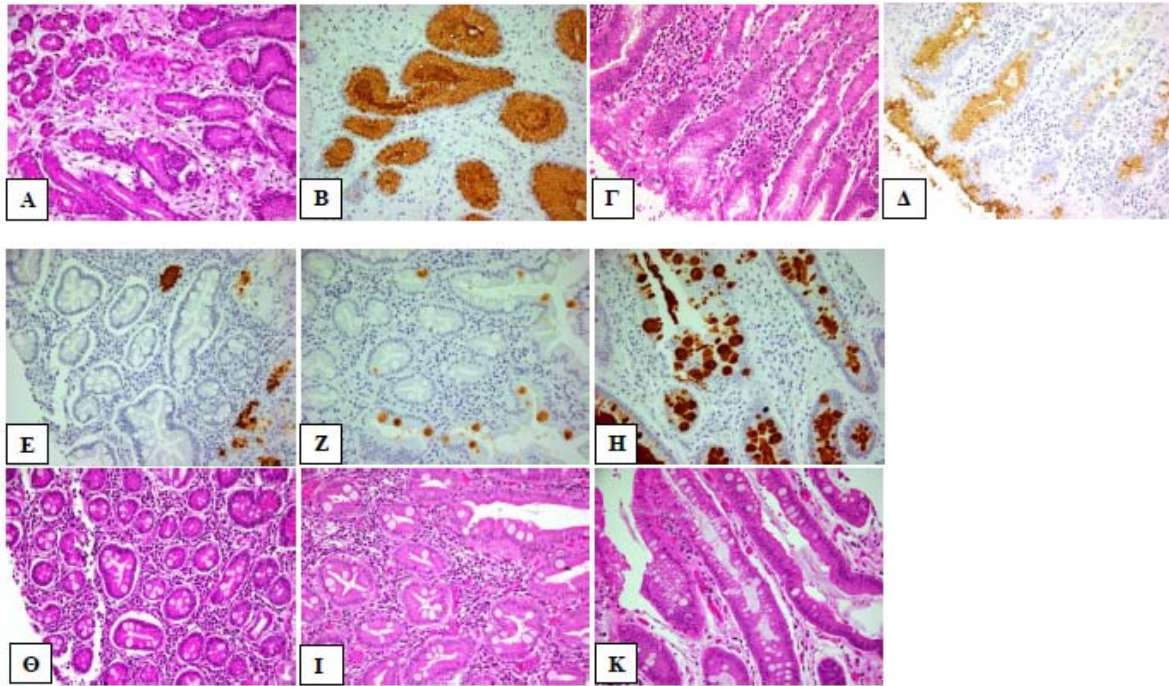
Πίνακας 4: Έκφραση της MUC2.

		MUC2				P value	
		Σύνολο	Αρνητική		Θετική		
Ηλικία (67)	<68 έτη	62	47	75,8%	15	24,2%	0,12
	>=68 έτη	60	37	61,7%	23	38,3%	
Ηλικία (68)	<=68 έτη	67	50	74,6%	17	25,4%	0,17
	>68 έτη	55	34	61,8%	21	38,2%	
Φύλο	Γυναίκες	54	32	59,3%	22	40,7%	0,063
	Άνδρες	83	62	74,7%	21	25,3%	
Τύπος	Διάχυτος	52	41	78,8%	11	21,2%	<0,001
	Εντερικός	63	46	73,0%	17	27,0%	
	Μικτός	13	7	53,8%	6	46,2%	
	Βλεννώδης	8	0	0,0%	8	100,0%	
Τύπος (1-3)	Διάχυτος	52	41	78,8%	11	21,2%	0,19
	Εντερικός	63	46	73,0%	17	27,0%	
	Μικτός	13	7	53,8%	6	46,2%	
Τ στάδιο	Πρώιμο	22	13	59,1%	9	40,9%	0,31
	Προχωρημένο	115	82	71,3%	33	28,7%	
Κατάσταση λεμφαδένων	Αρνητικοί	35	18	51,4%	17	48,6%	0,019
	Θετικοί	103	77	74,8%	26	25,2%	

2.4 Έκφραση της MUC5AC

Όσον αφορά τον φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο, παρατηρείται ανοσοέκφραση στα γαστρικά βοθρία, τόσο στο άντρο όσο και στο σώμα. Στις θέσεις εντερικής μετάπλασης παρατηρείται ετερογένεια στην ανοσοέκφραση, στοιχείο το οποίο σχετίζεται με την παρουσία πλήρους (τύπου I, τύπου λεπτού εντέρου) εντερικής μετάπλασης, όπου η MUC5AC είναι αρνητική (ομοίως και στα συνεξαιρεθέντα

τμήματα 12λου που μελετήθηκαν) ή ατελούς (τύπου II, τύπου παχέος εντέρου) όπου είναι θετική (Reis CA et al, 1999; Correa P and Houghton JM, 2007).



Εικόνα 10: Έκφραση της MUC5AC στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο και στην εντερική μετάπλαση: φυσιολογικό άντρο (Α και Β), φυσιολογικό σώμα (Γ και Δ), εντερική μετάπλαση (Ε έως Κ). Παρατηρείται αυξημένο ποσοστό ανοσοθετικών κυττάρων στο περιστατικό Κ,Η [τύπου ΙΙ (ατελής) εντερική μετάπλαση], σε σχέση με τα περιστατικά Θ,Ε και Ι,Ζ [τύπου Ι (πλήρης) εντερική μετάπλαση].

Όσον αφορά τα νεοπλάσματα, ανοσοθετικότητα παρατηρείται στο 46,7% αυτών και ανοσοθετικότητα στις λεμφαδενικές μεταστάσεις στο 44,4%. Δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ηλικία, το φύλο, το βάθος διήθησης (πρώιμο/προχωρημένο) και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις, ενώ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό ανοσοθετικότητας μεταξύ των κατηγοριών: διαχύτου τύπου 56,9%, εντερικού τύπου 33,9%, μικτά 50,0%, βλενωδή 75%, $p=0.031$ (Πίνακας 5).

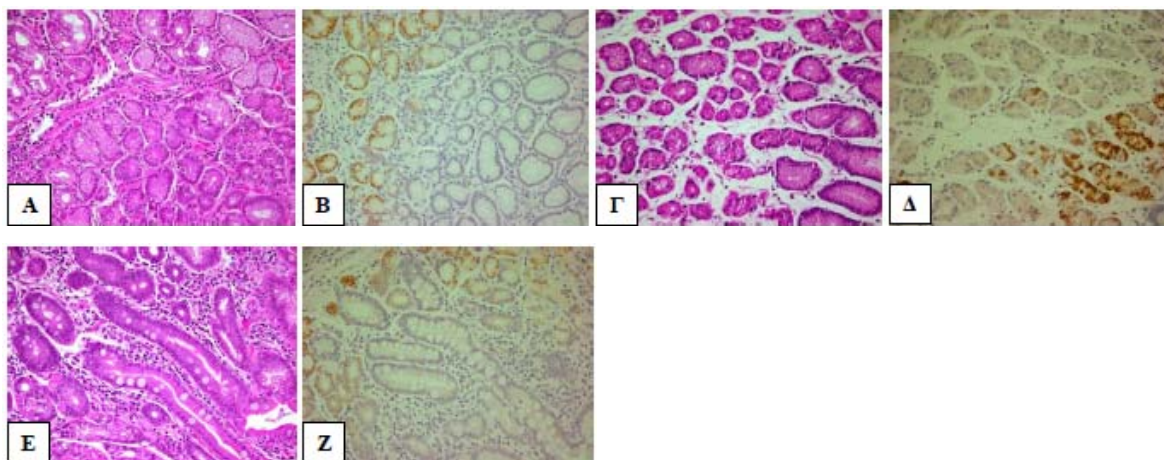
Πίνακας 5: Έκφραση της MUC5AC.

		MUC5AC				P value	
		Σύνολο	Αρνητική		Θετική		
Ηλικία (67)	<68 έτη	63	33	52,4%	30	47,6%	0,86
	>=68 έτη	58	29	50,0%	29	50,0%	
Ηλικία (68)	<=68 έτη	68	37	54,4%	31	45,6%	0,47
	>68 έτη	53	25	47,2%	28	52,8%	
Φύλο	Γυναίκες	52	28	53,8%	24	46,2%	1,00
	Άνδρες	84	44	52,4%	40	47,6%	

Τύπος	Διάχυτος	51	22	43,1%	29	56,9%	0,031
	Εντερικός	62	41	66,1%	21	33,9%	
	Μικτός	14	7	50,0%	7	50,0%	
	Βλεννώδης	8	2	25,0%	6	75,0%	
Τύπος (1-3)	Διάχυτος	51	22	43,1%	29	56,9%	0,046
	Εντερικός	62	41	66,1%	21	33,9%	
	Μικτός	14	7	50,0%	7	50,0%	
Τ στάδιο	Πρώιμο	21	9	42,9%	12	57,1%	0,35
	Προχωρημένο	115	63	54,8%	52	45,2%	
Κατάσταση λεμφαδένων	Αρνητικοί	33	22	66,7%	11	33,3%	0,11
	Θετικοί	104	51	49,0%	53	51,0%	

2.5 Έκφραση της MUC6

Όσον αφορά τον φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο, παρατηρείται ανοσοέκφραση της MUC6 στα βλεννοπαραγωγά, πυλωρικού τύπου αδένια και σε κύτταρα των εξειδικευμένων αδενίων του σώματος, ενώ δεν παρατηρείται ανοσοθετικότητα στα γαστρικά βοθρία. Η εντερική μετάπλαση είναι αρνητική.



Εικόνα 11: Έκφραση της MUC6 στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο [φυσιολογικό άντρο (Α και Β), φυσιολογικό σώμα (Γ και Δ)] και σε θέση εντερικής μετάπλασης (Ε και Ζ), όπου δεν παρατηρείται ανοσοθετικότητα.

Όσον αφορά τα νεοπλάσματα, ανοσοθετικότητα παρατηρείται στο 19,9% αυτών και ανοσοθετικότητα στις λεμφαδενικές μεταστάσεις στο 3,8%. Παρατηρήθηκε συχνότερη ανοσοέκφραση στους ασθενείς με ηλικία μεγαλύτερη από τα 68 έτη (=μέση ηλικία) ($p=0.012$), ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με το φύλο, το βάθος διήθησης (πρώιμο/προχωρημένο) και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό ανοσοθετικότητας μεταξύ των κατηγοριών: διαχύτου

τύπου 7,8%, εντερικού τύπου 30,6%, μικτά 15,4%, βλεννώδη 25,0%, $p=0.025$ (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Έκφραση της MUC6.

		MUC6				P value	
		Σύνολο	Αρνητική		Θετική		
Ηλικία (67)	<68 έτη	62	55	88,7%	7	11,3%	0,012
	>=68 έτη	58	40	69,0%	18	31,0%	
Ηλικία (68)	<=68 έτη	67	59	88,1%	8	11,9%	0,012
	>68 έτη	53	36	67,9%	17	32,1%	
Φύλο	Γυναίκες	52	44	84,6%	8	15,4%	0,38
	Άνδρες	83	64	77,1%	19	22,9%	
Τύπος	Διάχυτος	51	47	92,2%	4	7,8%	0,025
	Εντερικός	62	43	69,4%	19	30,6%	
	Μικτός	13	11	84,6%	2	15,4%	
	Βλεννώδης	8	6	75,0%	2	25,0%	
Τύπος (1-3)	Διάχυτος	51	47	92,2%	4	7,8%	0,009
	Εντερικός	62	43	69,4%	19	30,6%	
	Μικτός	13	11	84,6%	2	15,4%	
Τ στάδιο	Πρώιμο	20	15	75,0%	5	25,0%	0,55
	Προχωρημένο	115	93	80,9%	22	19,1%	
Κατάσταση λεμφαδένων	Αρνητικοί	33	25	75,8%	8	24,2%	0,46
	Θετικοί	103	84	81,6%	19	18,4%	

2.6 Έκφραση της Κερατίνης 19

Όσον αφορά τον φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο, παρατηρείται ανοσοέκφραση της κερατίνης 19 σε λίγα κύτταρα στην περιοχή της ζώνης πολλαπλασιασμού. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση σε καταστάσεις με υπερπλασία των γαστρικών βοθρίων καθώς και άλλοτε άλλου βαθμού ετερογενής, αυξημένη έκφραση, στις θέσεις εντερικής μετάπλασης.

Όσον αφορά τα νεοπλάσματα, ανοσοθετικότητα παρατηρείται στο 74,8% αυτών και ανοσοθετικότητα στις λεμφαδενικές μεταστάσεις στο 78,5%. Παρατηρήθηκε συχνότερη ανοσοέκφραση στους ασθενείς με ηλικία μεγαλύτερη από τα 68 έτη (=μέση ηλικία) ($p=0.007$), ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με το φύλο, το βάθος διήθησης (πρώιμο/προχωρημένο) και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις. Παρατηρήθηκε στατιστικά

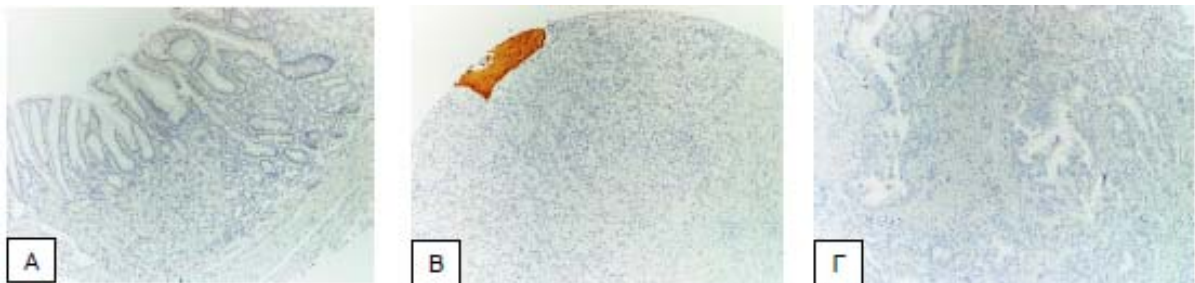
σημαντική ανοσοθετικότητα μεταξύ των κατηγοριών: διαχύτου τύπου 68,0%, εντερικού τύπου 87,1%, μικτά 53,8%, βλεννώδη 50,0%, $p=0.009$ (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Έκφραση της κερατίνης 19.

		Κερατίνη 19				P value	
		Σύνολο	Αρνητική		Θετική		
Ηλικία (67)	<68 έτη	62	22	35,5%	40	64,5%	0,007
	>=68 έτη	58	8	13,8%	50	86,2%	
Ηλικία (68)	<=68 έτη	67	25	37,3%	42	62,7%	<0,001
	>68 έτη	53	5	9,4%	48	90,6%	
Φύλο	Γυναίκες	51	16	31,4%	35	68,6%	0,21
	Άνδρες	83	17	20,5%	66	79,5%	
Τύπος	Διάχυτος	50	16	32,0%	34	68,0%	0,009
	Εντερικός	62	8	12,9%	54	87,1%	
	Μικτός	13	6	46,2%	7	53,8%	
	Βλεννώδης	8	4	50,0%	4	50,0%	
Τύπος (1-3)	Διάχυτος	50	16	32,0%	34	68,0%	0,009
	Εντερικός	62	8	12,9%	54	87,1%	
	Μικτός	13	6	46,2%	7	53,8%	
Τ στάδιο	Πρώιμο	20	7	35,0%	13	65,0%	0,28
	Προχωρημένο	114	27	23,7%	87	76,3%	
Κατάσταση λεμφαδένων	Αρνητικοί	33	7	21,2%	26	78,8%	0,65
	Θετικοί	102	27	26,5%	75	73,5%	

2.7 Έκφραση της Κερατίνης 14

Τόσο στο φυσιολογικό βλεννογόνο όσο και στα μελετηθέντα νεοπλάσματα δεν καταγράφηκε ανοσοέκφραση της κερατίνης 14.



Εικόνα 12: Απουσία έκφρασης της κερατίνης 14 τόσο στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο με εστιακή εντερική μετάπλαση (Α), όσο και σε δύο αδenoκαρκινώματα (Β, Γ). Μικρή ταινία πολύστιβου πλακώδους επιθηλίου οισοφάγου με ανοσοθετικότητα (=εσωτερικός μάρτυρας).

2.8 Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των γλυκοπρωτεϊνών MUC και της κερατίνης 19

Η έκφραση της MUC1 παρουσιάζει οριακά αντίστροφη συσχέτιση με την έκφραση της MUC5AC ($p=0.04$) καθώς και αντίστροφη συσχέτιση με την έκφραση της κερατίνης 19 ($p=0.002$). Μεταξύ των υπολοίπων μεταβλητών δεν παρατηρούνται στατιστικές συσχετίσεις ($p>0.05$) (Πίνακας 8) .

Πίνακας 8

	MUC1	MUC2	MUC5AC	MUC6	KRT19
MUC1		0,42	0,040	0,16	0,002
MUC2	0,42		0,27	0,36	0,28
MUC5AC	0,040	0,27		0,083	0,43
MUC6	0,16	0,36	0,083		0,22
KRT19	0,002	0,28	0,43	0,22	

2.9 Ανάλυση των νεοπλασμάτων με βάση τον ανοσοφαινότυπο που προκύπτει από την συνδυασμένη έκφραση των γλυκοπρωτεϊνών MUC

Τα περιστατικά με γαστρικό φαινότυπο αποτελούν τη συχνότερη κατηγορία της μελέτης μας, με 65 περιστατικά (47,8%) να ανήκουν στην κατηγορία αυτή, ενώ εντερικό φαινότυπο παρουσιάζουν 11 περιστατικά (8,1%), μικτό φαινότυπο 30 περιστατικά (22,1%) και μηδενικό φαινότυπο επίσης 30 περιστατικά (22,1%) (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Νεοπλασματικοί ανοσοφαινότυποι.

Φαινότυπος (136/154 ασθενείς)	N	%
Γαστρικός	65	47,8
Εντερικός	11	8,1
Μικτός	30	22,1
Μηδενικός	30	22,1

Δεν παρατηρήθηκε κάποια σχέση μεταξύ των φαινοτύπων και της ηλικίας, του φύλου, του τύπου του καρκινώματος και των λεμφαδενικών μεταστάσεων.

3. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, που αποτελεί το αντίκειμενο αυτής της διπλωματικής εργασίας, καταγράφηκε και ταξινομήθηκε σε σχέση με την έκφραση γλυκοπρωτεϊνών της οικογένειας MUC (MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6) και των κερατινών 14 και 19 μια αρκετά μεγάλη σειρά γαστρικών καρκινωμάτων, ενώ κατασκευάστηκαν 36 κύβοι παραφίνης με ιστικές μικροσυστοιχίες (TMAs) από τα περιστατικά αυτά, για μελλοντική μελέτη. Κύριο μειονέκτημα στη φάση αυτή, αποτελεί η απουσία δεδομένων σχετικών με την κλινική πορεία και την επιβίωση των ασθενών.

Η έκφραση της MUC1 (μεμβρανικού τύπου) γλυκοπρωτεΐνης έχει συσχετιστεί σε προηγούμενες μελέτες με χειρότερη πρόγνωση, τόσο σε σειρές γαστρικών καρκινωμάτων, όσο και σε διάφορους άλλους τύπους αδενοκαρκινωμάτων (Yonezawa S et al, 2008; Utsunomiya T et al, 1998). Στη σειρά των ασθενών μας, ποσοστό 29,2% των αδενοκαρκινωμάτων παρουσιάζει MUC1 ανοσοθετικότητα, συχνότερα τα εντερικού σε σχέση με τα διαχύτου τύπου καρκινώματα, χωρίς να έχει βρεθεί κάποια θετική ή αρνητική σχέση με τα λοιπά κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών. Σε σχέση με την γλυκοπρωτεΐνη MUC1 θα πρέπει επιπλέον να επισημανθεί το γεγονός ότι αποτελεί αντιγόνο σχετιζόμενο με καρκίνο (tumor associated antigen) και ως εκ τούτου στόχο για ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Αυτό συμβαίνει γιατί η εξωμεμβρανική/εξωκυττάρια περιοχή (domain) του μορίου αποτελείται από επαναλαμβανόμενη (20-150 φορές) αλληλουχία αμινοξέων, η οποία παρουσιάζει αυξημένο βαθμό γλυκοζυλίωσης σε καρκινώματα και προκαρκινωμάτωσης καταστάσεις, με ταυτόχρονη υπερέκφραση σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς (Beatty PL and Finn OJ, 2013). Επιπλέον, στα φυσιολογικά κύτταρα, η έκφραση της MUC1 παρουσιάζει συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης, περιορισμένη στο προς τον αυλό των αδενίων τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ στα καρκινικά κύτταρα περιγράφεται διαταραχή αυτού του προτύπου, με έκφραση σε όλη την μεμβρανική έκταση (Barratt-Boyes SM, 1996). Αντίστοιχη διαταραχή στην έκφραση της MUC1 παρατηρήθηκε στο 29,2% των περιστατικών αυτής της μελέτης.

Η γλυκοπρωτεΐνη MUC2 η οποία αποτελεί δείκτη εντερικής προέλευσης/διαφοροποίησης και η ανοσοθετικότητα της οποίας καθορίζει τον εντερικό ανοσοφαινότυπο των γαστρικών καρκινωμάτων, εκφράζεται στο 31,2% των νεοπλασμάτων, στην παρούσα μελέτη. Η έκφραση της σχετίζεται με μικρότερη πιθανότητα λεμφαδενικής νόσου ($p=0.019$) στοιχείο το οποίο είναι συμβατό με τα

βιβλιογραφικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η έκφραση της MUC2 σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση (Yonezawa S et al, 2008; Utsunomiya T et al, 1998).

Όσον αφορά τις γλυκοπρωτεΐνες MUC5AC και MUC6, οι οποίες αποτελούν δείκτες γαστρικής προέλευσης/διαφοροποίησης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση τους μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών καρκινωμάτων (διάχυτος τύπος, εντερικός τύπος, μικτός τύπος, βλεννώδη, $p=0.031$ για την MUC5AC και $p=0.025$ για την MUC6), χωρίς να αναδεικνύεται κάποια σχέση της έκφρασης τους με τους βασικούς προγνωστικούς δείκτες, δηλαδή το βάθος διήθησης και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση των κερατινών 14 και 19, οι οποίες βιβλιογραφικά φαίνεται να εκφράζονται σε μητρικά/βλαστικά κύτταρα (stem cells) (Larouche D et al, 2010). Έκφραση της κερατίνης 14 δεν παρατηρήθηκε τόσο στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο, όσο και σε κανένα από τα περιστατικά που μελετήθηκαν. Το εύρημα αυτό είναι συμβατό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου έκφραση της κερατίνης αυτής περιγράφεται στην πλειοψηφία των καρκινωμάτων εκ πλακωδών κυττάρων, ενώ γενικά τα αδενοκαρκινώματα διαφόρων οργάνων, είναι αρνητικά (Chu PG and Weiss LM, 2002).

Η κερατίνη 19, η οποία είναι η κερατίνη με το χαμηλότερο μοριακό βάρος, εκφράζεται στο γαστρικό βλεννογόνο σε λίγα επιθηλιακά κύτταρα στην περιοχή της ζώνης πολλαπλασιασμού (neck/isthmus), στην περιοχή δηλαδή όπου βρίσκονται και τα μητρικά/βλαστικά κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου (Mills JC, 2011) και θεωρείται γενικά ένας δείκτης πρώιμης φάσης στην πορεία διαφοροποίησης της επιθηλιακής σειράς (Chun-Mao H et al, 2007). Στις θέσεις εντερικής μετάπλασης και σε περιοχές με υπερπλασία των γαστρικών βοθρίων στα πλαίσια γαστρίτιδας, το ποσοστό των ανοσοθετικών στην κερατίνη 19 κυττάρων, αυξάνεται. Όσον αφορά τα καρκινώματα της μελέτης μας, ένα μεγάλο ποσοστό (74,8%) είναι θετικό στην κερατίνη αυτή, καθώς επίσης και ένα μεγάλο ποσοστό (78,8%) των λεμφαδενικών μεταστάσεων. Το τελευταίο αυτό στοιχείο έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως πιο ευαίσθητος δείκτης λεμφαδενικής μεταστατικής νόσου και ως εκ τούτου πιο αποτελεσματικής σταδιοποίησης, μέσω της ανίχνευσης mRNA της κερατίνης 19 σε επιχώριους λεμφαδένες (Suo J et al, 2006). Η στατιστικά συχνότερη ανοσοθετικότητα στους ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 68 ετών φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της συχνότερης ανοσοθετικότητας στα εντερικού τύπου καρκινώματα (διάχυτου τύπου=68%, εντερικού τύπου=87,1%, μικτού τύπου=53,8%, βλεννώδη=50%, $p=0.009$)

τα οποία είναι συχνότερα σε αυτό το φάσμα ηλικιών, σε σχέση με τα διαχύτου και μικτού τύπου.

Συμπερασματικά, η ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου με βάση την έκφραση των γλυκοπρωτεϊνών MUC αποτελεί μία ιστογενετικού τύπου προσέγγιση και είναι πιθανό να βοηθήσει στην ταυτοποίηση βιοδεικτών (biomarkers), με προγνωστική και/ή προβλεπτική αξία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπόβαθρο και Σκοπός: Οι βλεννοπρωτεΐνες της οικογένειας MUC παρουσιάζουν συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο (MUC1, MUC5AC, MUC6) και στην εντερική μετάπλαση (MUC2) και αποτελούν δείκτες προέλευσης/διαφοροποίησης για τα καρκινώματα του γαστρεντερικού σωλήνα και του παγκρέατος/χοληφόρων. Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε σε μία σειρά γαστρικών καρκινωμάτων, η έκφραση των ανωτέρω γλυκοπρωτεϊνών καθώς και των κερατινών 14 και 19 και συσχετίστηκε με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Ασθενείς και Μέθοδοι: Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 154 περιπτώσεις ασθενών με αδενοκαρκίνωμα στομάχου, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε γαστρεκτομή το χρονικό διάστημα 2002-2011 και υλικά των οποίων υπήρχαν στα αρχεία του Β' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν». Δημιουργήθηκαν 36 κύβοι παραφίνης με ιστικές μικροσυστοιχίες και έγιναν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τους ανωτέρω δείκτες.

Αποτελέσματα: Όλες οι γλυκοπρωτεΐνες MUC καθώς και η κερατίνη 19 παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφρασή τους μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών καρκινωμάτων (διάχυτα, εντερικού τύπου, μικτά, βλεννώδη). Επιπλέον, η έκφραση της MUC2 σχετίζεται με μικρότερη πιθανότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Συζήτηση: Η ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου με βάση την έκφραση των γλυκοπρωτεϊνών MUC αποτελεί μία ιστογενετικού τύπου προσέγγιση και είναι πιθανό να βοηθήσει στην ταυτοποίηση βιοδεικτών, με προγνωστική και/ή προβλεπτική αξία.

SUMMARY

Background and Aim: MUC family glycoproteins are expressed in a specific pattern in normal gastric mucosa (MUC1, MUC5AC, MUC6) and intestinal metaplasia and constitute markers of origin/differentiation for gastric as well as for pancreatobiliary carcinomas. In the present study, the expression of MUC glycoproteins as well as of Keratins 14 and 19 was evaluated and correlated with the clinical and pathological characteristics of the patients

Patients and Methods: One hundred and fifty four patients with adenocarcinoma of the stomach enrolled the study, for which archival tissue blocks from surgical specimens were available and retrieved from the archives of the 2nd Department of Pathology, University of Athens, School of Medicine. Thirty-six tissue microarrays blocks were constructed and tissue sections were stained with specific antibodies.

Results: All MUC glycoproteins as well as keratin 19 were differentially expressed between different tumor types (diffuse, intestinal, mixed, colloid). Increased MUC2 expression was correlated with a significant lower potential of lymph node metastases.

Discussion: The classification of gastric cancer according to glycoproteins MUC differential expression constitutes a lineage specific approach of gastric carcinogenesis and could provide the basis for the identification of biomarkers with prognostic and/or predictive value.

Γ. Βιβλιογραφία

Barratt-Boyes SM. (1996). Making the most of mucin: a novel target for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 43:142-151.

Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL et al. (2008). Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 135: 91-99.

Basturk O, Farris III AB, Adsay NV (2010). Immunohistology of the Pancreas, Biliary Tract, and Liver. In Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic applications*. Saunders 3rd edition, p.541-576.

Beatty PL and Finn OJ (2013). Preventing cancer by targeting abnormally expressed self-antigens: MUC1 vaccines for prevention of epithelial adenocarcinomas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1284:52-56.

Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C (2008). Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements. *Aliment Pharmacol Ther* 28: 689-703.

Bouvard V, Baan R, Straif K, Groose Y, Secretan B, El Ghissassi F et al. (2009). A review of human carcinogenesis-Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10: 321-322.

Brenner H, Arndt V, Bode G, Stegmaier C, Ziegler H, Stumer T (2002). Risk of gastric cancer among smokers infected with *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer* 90: 1720-1726.

Carneiro F (1997). Classification of gastric carcinomas. *Curr Diagn Pathol* 4: 51-59.

Chu PG and Weiss LM (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms, *Histopathology* 40:403-439.

Chun-Mao H et al. (2007). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermal-like cells in vitro. *Differentiation* 75:292-298.

Correa P (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 52: 6735-6740.

Correa P, Houghton J (2007). Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133: 659-672.

Craanen ME, Blok P, Dekker W, Ferwerda J, Tytgat GN (1992). Subtypes of intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*. *Gut* 33: 597-600.

Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M et al. (eds) (2007). *Cancer Incidence in Five Continents*. IARC: Lyon, France.

Epplein M, Noruma AM, Hankin JH, Blaser MJ, Perez-Perez G, Stemmermann GN et al. (2008). Association of *Helicobacter pylori* infection and diet on the risk of gastric cancer: a case –control study in Hawaii. *Cancer Causes Control* 19: 869-877.

Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM (2010). *Globocan 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. IARC Cancer Base No.10, 1027-5614. IARC, Lyon.

Figueiredo C, van Doorn LJ, Nogueira C, Soares JM, Pinho C, Figueira P et al. (2001). *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol* 36: 128-135.

Gonzalez CA, Jackszyn P, Pera G, Agudo A, Bingham S, Palli D et al. (2006). Meat intake and risk of stomach and esophageal adenocarcinoma within the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 98: 345-354.

Goseki N, Takizawa T, Koike M (1992). Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut* 33: 606-612.

Hisamichi S, Sugawara N (1984). Mass screening for gastric cancer by X-ray examination. *Jpn J Clin Oncol* 14: 211-223.

Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C et al. (1993). Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 53: 641-651.

Houghton J, Stoicov C, Noruma S, Rogers AB, Carlson J, Li H et al. (2004). Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306: 1568-1571.

Hussein NR, Mohammadi M, Talebkhan Y, Doraghi M, Letley DP, Muhammad MK et al. (2008). Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in *H. pylori*-associated disease. *J Clin Microbiol* 46: 1774-1779.

International Agency For Research on Cancer (2003). IARC Handbooks on Cancer Prevention. Fruit and Vegetables. IARC: Lyon, France.

International Agency of Research on Cancer (2004). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans Vol 83. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC: Lyon, France.

Jung SW, Sugimoto M, Graham DY, Yamaoka Y (2009). *homb* status of *Helicobacter pylori* as a novel marker to distinguish gastric cancer from duodenal ulcer. *J Clin Microbiol* 47: 3241-3245.

Kaneko S, Yoshimura T (2001). Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. *Br J Cancer* 84: 400-405.

Kang H, An HJ, Song GY, Kim TH, Heo JH, Ahn DH, Kim G (2012). Notch3 and Jagged2 contribute to gastric cancer and MUC2 and MUC5AC expression, *Histopathology* 61: 576-586.

Khoury T, Tan D, Wang J, Intengan M (2006). Inclusion of MUC1 in panel of immunohistochemical markers is useful for distinguishing between endocervical and endometrial mucinous adenocarcinoma, *BMC Clinical Pathology* 6:1.

Kondo K (2002). Duodenogastric reflux and gastric stump carcinoma. *Gastric Cancer* 5: 16-22.

Larouche D et al. (2010). Identification of epithelial stem cells in vivo and in vitro using keratin 19 and BrdU. *Methods Mol Biol* 585:383-400.

Lauren P (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64: 31-49.

Lauwers GY (2004). Epithelial Neoplasms of the Stomach. In Odze RD, Goldblum JR, Srawford JM, editors. *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas*. Saunders, p. 409-427.

Lauwers GY, Carneiro F, Graham DY, Cudaro MP et al. (2010). Gastric Carcinoma. In Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. *WHO Classification of Tumors of the Digestive System*. IARC: Lyon, p. 46-58.

Levi E, Klimstra DS, Andea A et al. (2004). MUC1 and MUC2 in pancreatic neoplasia. *J Clin Pathol* 57: 456-462.

Ley C, Mohar A, Guamer J, Herrera-Goepfert R, Figueroa LS, Halperin D et al. (2004). *Helicobacter pylori* eradication and gastric preneoplastic conditions: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 4-10.

Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N et al. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation, *Science* 297: 573-578.

Mera R, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuelo MB, Camargo MC et al. (2005). Long term follow up of patients treated for Helicobacter pylori infection. Gut 54: 1536-1540.

Mills JC (2011). Gastric epithelial stem cells. Gastroenterology 140:412-424.

Ming SC (1977). Gastric carcinoma. A pathobiological classification. Cancer 39: 2475-2485.

Miyahara R, Niwa Y, Matsuura T, Maeda O, Ando T, Ohmiya N et al. (2007). Prevalence and prognosis of gastric cancer detected by screening in a large Japanese population: data from a single institute over 30 years. J Gastroenterol Heratol 22: 1435-1442.

Moll R, Divo M, Langbein L (2008). The human keratins. Biology and pathology, Histochem Cell Biol 129: 705-733.

Mulligan RM (1972). Histogenesis and behavior of gastric carcinoma. Pathol Annu 7: 349-415.

Nakamura K, Sugaro H, Takagi K (1968). Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. Gann 59: 251-258.

Nishimura R. et al. (2013). Precursor-derived versus *de-novo* carcinogenesis depends on lineage-specific mucin phenotypes of intramucosal gland-forming gastric neoplasms, Histopathology 63:616-629.

Odenbreit S, Swoboda K, Barwig I, Ruhl S, Boren T, Koletzko S et al. (2009). Outer membrane protein expression profile in Helicobacter pylori clinical isolates. Infect Immun 77: 3782-3790.

Ogiwara H, Sugimoto M, Ohno T, Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY et al. (2009). Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the

Helicobacter pylori vacA gene in cases of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol* 47: 3493-3500.

Ohta H, Noguchi Y, Takagi K, Nishi M, Kajitani T, Kato Y (1987). Early gastric carcinoma with special reference to macroscopic classification. *Cancer* 60: 1099-1106.

Parkin DM (2006). The global health burden of infection –associated cancers in the year of 2002. *Int J Cancer* 118: 3030-3044.

Plummer M, van Doorn LJ, Franceschi S, Kleter B, Canzian F, Vivas J et al. (2007). *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated genotype and gastric precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 99: 1328-1334.

Purkis PE et al. (1990). Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci* 97:39-50.

Quiao YL, Dawsey SM, Kamangar F, Fan JH, Abnet CC, Sun XD et al. (2009). Total and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. *J Natl Cancer Inst* 101: 507-518.

Quiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira AM, Oliveira CA, Magalhaes PP et al. (1998). *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer* 78: 135-139.

Reis CA et al. (1999). Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) expression. *Clin Cancer Res* 59:1003-1007.

Rekhtman N, Biskop Ja (eds) (2011). Immunostains: Introduction. In *Quick Reference Handbook for surgical pathology*, p.4-5.

Rugge M, Cassaro M, Leandro G, Baffa R, Avellini C, Bufo P et al. (1996). *Helicobacter pylori* in promotion of gastric carcinogenesis. *Dig Dis Sci* 41: 950-955.

Sanduleanu S, Jonkers D, de Bruine A, Hameeteman W, Stockbrugger RW (2001). Changes in gastric mucosa and luminal environment during acid-suppressive therapy: a review in depth. *Dig Liver Dis* 33: 707-719.

Shikata K, Kiyohara Y, Kubo M, Yonemoto K, Ninomiya T, Shiota T et al. (2006). A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: the Hisayama study. *Int J Cancer* 119: 196-201.

Sinning C, Schaefer N, Standop J, Hirner A, Wolff M (2007). Gastric stump carcinoma –epidemiology and current concepts in pathogenesis and treatment. *Eur J Surg Oncol* 33: 133-139.

Suo J et al. (2006). K-19 mRNA RT-PCR in detecting micrometastasis in regional lymph nodes of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12(32):5219-5222.

Tobias J, Hochhauser D (2010). Cancer of the oesophagus and stomach. In: Tobias J, Hochhauser D, editors. *Cancer and its management*. 6th ed. Wiley-Blackwell: Oxford, UK, p. 254-268.

Tsukashita S, Kushima R, Masamichi B, Sugihara H, Hattori T (2001). MUC gene expression and histogenesis of adenocarcinoma of the stomach, *IntJCancer* 94: 166-170.

Utsunomiya T, Yonezawa S, Sakamoto H, et al. (1998). Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: its relationship with the prognosis of the patients, *Clin Cancer Res* 4: 2605-2614.

Wick MR, Hornick JL (2010). Immunohistology of soft tissue and osseous neoplasms. In Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic applications*. Saunders 3rd edition, p.84-86.

Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE et al. (2004). *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 291: 187-194.

Yonezawa S, Goto M, Yamada N et al. (2008). Expression profiles of MUC1, MUC2, and MUC4 mucins in human neoplasms and their relationship with biological behavior. *Proteomics* 8: 3329-3341.