Izraženost survivina u karcinomu želuca i metastaskim limfnim čvorovima

Ćupurdija, Kristijan

Doctoral thesis / Disertacija

2011

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:923353

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Kristijan Ćupurdija

Izraženost survivina u karcinomu želuca i metastatskim limfnim čvorovima

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena na Klinici za kirurgiju i Zavodu za kliničku i eksperimentalnu patologiju Kliničke bolnice Dubrava.

Voditelj rada: Doc.dr. sc. Matija Horžić, dr. med.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoru, Doc. dr. sc. Matiji Horžiću na podršci i pomoći pri izradi disertacije, ali i pri svakodnevnom radu na Klinici proteklih godina.

Zahvaljujem se djelatnicima Klinike za kirurgiju te djelatnicima Zavoda za kliničku i eksperimentalnu patologiju Kliničke bolnice Dubrava koji su sudjelovali u liječenju i dijagnostičkoj obradi bolesnika čiji su klinički podaci i uzorci tkiva korišteni u ovom istraživanju.

Posebno veliko HVALA mr.sc. Milki Ožegović i pokojnom Dragi Plazaniću, dr.med.

Dugujem veliku zahvalu kolegicama i kolegama koji su sudjelovali u prikupljanju i obradi kliničkih podatka korištenih u istraživanju.

Zahvaljujem se Akademiku Danielu Rukavini i ostalim djelatnicima Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na tehničkoj pomoći, ali i stečenom predznanju koje je bilo neophodno za izradu ove disertacije.

Zahvaljujem se roditeljima, bratu i njegovoj obitelji, rodbini i prijateljima na podršci, razumijevanju i toleranciji.

Vrijednost ove disertacije ocijeniti će vrijeme i struka. Kakva god ocjena bude, disertacija je rezultat rada i truda kojima su me naučili moji roditelji, Zorka i Milan.

Zato disertaciju posvećujem njima,

mojim roditeljima ...

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Epidemiologija karcinoma želuca 1

1.1.1. Incidencija i mortalitet 1

1.1.2. Etiološki čimbenici 4

1.1.3. Patogeneza 8

1.1.4. Helicobacter pylori i karcinom želuca 11

1.1.4.1 Epidemiologija infekcije s Helicobacter Pylori 11

1.1.4.2 Patologija infekcije s Helicobacter Pylori 13

1.1.4.3 Čimbenici virulencije i patogeneza 14

1.2. Patologija i klasifikacija karcinoma želuca 20

1.3. Liječenje karcinoma želuca 26

1.3.1. Rani ili superficijalni karcinom želuca 31

1.4. Survivin 33

1.4.1. IAP molekule i apoptoza 33

1.4.2 Survivin – uloga u nastanku i razvoju tumora 36

1.4.3 Funkcija i regulacija 39

1.4.4. *Splice* varijante 45

1.4.5. Survivin u netumorskim tkivima 47

1.4.6. Survivin i karcinom želuca 49

2. HIPOTEZA 54

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 55

4. MATERIJALI, METODE I PLAN ISTRAŽIVANJA 56

4.1. Materijali 56

4.2. Metode 57

4.2.1. Patohistološka analiza..... 57
4.2.2. Imunohistokemijsko obilježavanje survivina u uzorcima tkiva..... 57
4.2.3. Analiza podataka iz medicinske dokumentacije..... 59
4.2.4. Statistička analiza..... 60
4.3. Plan istraživanja..... 60
5. REZULTATI..... 62
5.1. Deskriptivna statistika bolesnika oboljelih od karcinoma želuca 62
5.2. Izraženost survivna u ispitivanim tkivima 71
5.3. Usporedba izraženosti survivina u tkivima primarnog tumora i metastatskim limfnim čvorovima..... 78
5.4. Usporedba izraženosti survivina i kliničkopatoloških karakteristika karcinoma želuca..... 84
5.5. Analiza utjecaja pojedinih kliničkopatoloških karakteristika i izražavanja survivina na 5-godišnje preživljenje bolesnika..... 89
6. RASPRAVA..... 104
7. ZAKLJUČCI..... 113
8. SAŽETAK..... 114
9. SUMMARY..... 115
10. LITERATURA..... 116
11. ŽIVOTOPIS..... 162

POPIS KRATICA

cag (PAI) - od engleski *cytotoxin-associated gene pathogenicity island*

eNOS- od engleski *endothelial nitric oxide synthase*

DNA- od engleski *deoxiribonucleic acid*

RNA – od engleski *ribonucleic acid*

VacA - od engleski *vacuolating toxin A*

BabA- od engleski *blood group antigen-binding adhesin*

OipA od engleski *outer inflammatory protein*

COX-2 - ciklooksigenaza 2

HGF - od engleski *hepatocyte growth factory*

EGF - od engleski *epidermal growth factor*

TGF - od engleski *transforming growth factor*

HP- Helicobacter pylori

VEGF -od engleski *vascular endothelial growth factor*

BMDC - od engleski *bone marrow-derived mesenchymal cells*

IAP -od engleski *inhibitors of apoptosis*

XIAP- od engleski *X-linked IAP*

NAIP - od engleski *neuronal apoptosis inhibitor protein*

TNF- od engleski *tumor necrosis factor*

BIR - od engleski *baculovirus IAP repeat*

NF-κB - od engleski. *nuclear factor kappa B*

CK2- od engleski *casein kinaze 2*

NES -od engleski *nuclear export signals*

WHO –od engleski *World Health Organisation*

BRCA 2 – od engleski *Breast Cancer 2 susceptibility protein*

HNPCC –od engleski *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*

ESD – endoskopka submukozna disekcija

EMR – endoskopska mukozna resekcija

SMAC/DIABLO –od engleski *second mitochondria-derived activator of caspases*

APC – od engleski *Adenomatous Polyposis Coli*

TCF – od engleski *T Cell Factor*

HTLV-1 – od engleski *Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1*

PBS – od engleski *puffered bovine saline*

1. UVOD

1.1. Epidemiologija karcinoma želuca

1.1.1 Incidencija i mortalitet

Karcinom želuca zauzima četvrto mjesto u incidenciji malignih bolesti na svjetskoj razini, a predstavlja drugi najveći uzrok smrti povezan s karcinomima (1, 2).

Svake godine se u svijetu otkrije oko 900 000 do 1 000 000 novih slučajeva, a oko 700 000 ljudi umire od posljedica te bolesti. Unatoč napretku u dijagnostici i liječenju karcinoma želuca, 5 godišnje preživljenje izvan Japana je i dalje oko 20% (3-5) .

Epidemiološka istraživanja otkrila su razlike u incidenciji i mortalitetu karcinoma želuca obzirom na dob, spol, anatomsku lokalizaciju, rasno i geografsko podrijetlo, socioekonomski status, prehrambene i štetne navike, izloženost infekciji s Helicobacter pylori i drugo.

Prema podacima WHO (*World Health Organization*), više od 70% slučajeva karcinoma želuca se javlja u zemljama u razvoju, a polovica svjetske incidencije je u istočnoj Aziji (Kina)(4). Japan ima najveću incidenciju adenokarcinoma želuca u svijetu (69,2 novih slučajeva na 100 000 muškaraca i 28,6 nova slučaja na 100 000 žena) (6). Slično je i u Koreji (7, 8), a slijede Kina, Istočna Europa, Centralna i Južna Amerika (8, 9). Najniža incidencija raka želuca je u Sjevernoj Americi (<3,7 slučaja na 100 000 stanovnika), zapadnoj Europi, Australiji i Novom Zelandu (6). U SAD-u, incidencija je niska, a stopa smrtnosti iznosi 5,2 na 100 000 stanovnika (1). Ukupna incidencija u Europi iznosi 12-15 na 100 000 stanovnika (1, 2).

Najveći mortalitet je u Istočnoj Aziji (28,1 /100 000 u muškaraca, 13,0 /100 000 u žena) , slijede Centralna i Istočna Europa te Centralna i Južna Amerika. Najniži mortalitet je u Sjevernoj Americi (2,8 za muškarce , odnosno 1,5 za žene)(6).

Karcinom želuca je rijedak prije 40-ih godina života, nakon čega se incidencija povećava te se vršak javlja u 7. i 8. desetljeću života za oba spola (2, 10, 11). Naime, karcinom želuca češće se javlja u muškaraca (omjer incidencije muškarci : žene = 2:1 u populaciji visokog rizika, odnosno 3:2 u populaciji niskog rizika). (8, 9)

Postoje rasne razlike pa je tako u SAD-u, incidencija kod stanovništva bijele rase dvostruko manja u odnosu na ostalu populaciju.

Karcinom želuca bio je vodeći uzrok smrti od zloćudne bolesti početkom 20. stoljeća, međutim iz nepoznatih razloga incidencija se konstantno smanjivala od 1930. godine. U svijetu postoje značajne razlike u incidenciji, prevalenciji i stopi mortaliteta, međutim od 1950-ih godina u svjetskim razmjerima se incidencija karcinoma želuca i stopa mortaliteta progresivno smanjuje kako u područjima s visokom tako i u područjima s niskom incidencijom bolesti, a osobito u razvijenim zemljama (2, 12). Ova pojava objašnjava se poboljšanjem životnih uvjeta i promjenama navika prehrane nego što je ona rezultat samog liječenja bolesti.

Značajne svjetske varijacije u incidenciji karcinoma želuca navode na pretpostavke o velikom utjecaju okoliša na njegovo nastajanje. Zanimljivo je da dolazi do smanjivanja rizika za nastanak karcinoma kod ljudi koji migriraju iz populacija visokog rizika, kao što je Japan, u područja s niskom incidencijom, kao što je SAD (13). To daje naslutiti da je utjecaj okoliša tijekom ranog života važan čimbenik za određivanje rizika za nastanak karcinoma želuca, ali isto tako drugi okolišni ili kulturni čimbenici mogu imati daljnji utjecaj u predispoziciji za nastanak karcinoma želuca tijekom života.

Epidemiološke studije pokazale su razlike ne samo po dobi, spolu, geografskom području već i prema anatomskoj lokalizaciji tumora kao i histološkim tipovima karcinoma.

Danas je poznato da se incidencija i mortalitet karcinoma proksimalnog dijela želuca ili kardije te incidencija karcinoma distalnog želuca razlikuju. Ova dva podtipa karcinoma želuca

imaju različitu epidemiologiju i patogenezu, premda o uzrocima razlika postoje brojna pitanja i dvojbe. Iako se ukupna incidencija karcinoma želuca smanjuje, incidencija karcinoma proksimalnog dijela želuca i kardije je u porastu od 1970-ih godina, osobito u muškoj populaciji u zemljama Zapada, za razliku od karcinoma distalnog dijela želuca čija je incidencija u padu (1, 14-17). Proksimalni karcinom želuca (koji ima težu prognozu) je sličan adenokarcinomu ezofagusa s obzirom na spol, rasu i socijalni status te se smatra da predstavlja različiti biološki entitet. Karcinomi kardije želuca učestaliji su 5 puta kod muškaraca u odnosu na žene, a dva puta su učestaliji kod bijelaca (18). Karcinomi kardije imaju znatno slabiju prognozu u usporedbi sa karcinomima distalnog dijela želuca, sa slabijim 5-godišnjim preživljenjem i većim operacijskim mortalitetom (6).

Jedna od najčešće korištenih podjela karcinoma želuca je prema histološkom tipu koju je objavio Lauren 1965. godine (19) na intestinalni (dobro diferencirani) koji se javlja u 50% slučajeva, difuzni (nediferencirani) u 33% slučajeva te mješani ili neklasificirani tip, koji čini 17 %. Intestinalni tip povezan je sa gastritisom u korpusu želuca, atrofijom želuca i intestinalnom metaplazijom, dok je difuzni tip povezan sa gastritisom cijelog želuca, bez atrofije. Intestinalni tip je češći kod muškaraca, crnaca i starijih dobnih skupina, dok difuzni tip ima jednaku raspodjelu po spolu, a češći je kod mlađih osoba (19, 20). Inestinalni tip dominira u područjima visokog rizika, kao što je Istočna Azija, Istočna Europa, Centralna i Južna Amerika te je predmet svjetskih varijacija incidencije karcinoma želuca. Difuzni tip ima ujednačenu geografsku distribuciju (21). Smatra se da je do smanjivanja incidencije karcinoma želuca došlo zbog smanjivanja incidencije intestinalnog podtipa karcinoma korpusa želuca (22), kako u visoko, tako i u nisko rizičnih populacija, dok se incidencija difuznog podtipa, osobito sa stanicama prstena pečatnjaka, povećavala u većini nisko rizičnih populacija (gdje danas dominira difuzni podtip) i čak u nekih visoko rizičnih populacija (23).

Karcinom kardije uglavnom je difuznog tipa dok je distalni karcinom želuca uglavnom intestinalnog tipa (24, 25) Većina karcinoma želuca u pacijenata starijih od 40 godina intestinalnog su podtipa, dok je agresivniji difuzni podtip češći u mlađih pacijenta (6, 24, 25). Osim incidencije, unazad nekoliko desetljeća, u većini zemalja svijeta u opadanju je i mortalitet (26). Ukupno gledano, u zemljama s većom incidencijom, stopa preživljenja je veća u odnosu na zemlje s manjom incidencijom (27). Ova povezanost je uglavnom posljedica razlike koja dolazi od lokalizacije tumora u želucu (6). Također, programi probira u područjima visokog rizika doveli su do smanjenja mortaliteta. U Japanu, gdje se provodi program masovnog probira i karcinom otkriva u ranim stadijima, stopa mortaliteta je pala za više od pola u odnosu na rane 70-te godine prošlog stoljeća (6). Mortalitet naime uvelike ovisi o dubini zahvaćanja stijenke u trenutku dijagnoze pa stopa 5. godišnjeg preživljenja za karcinom želuca koji je ograničen na mukozu iznosi 95%. Nasuprot tome, u SAD-u se malo karcinoma želuca otkriva u ranom stadiju, što daje 5. godišnje preživljenje od manje od 20 % (28-30). Slično je i u europskim zemljama, gdje se stopa 5. godišnjeg preživljenja kreće od 10% do 20% (3, 27).

U Republici Hrvatskoj incidencija karcinoma želuca u poslijednjih 10-ak godina iznosi oko 1200 slučajeva dok je smrtnost između 900 i 1000. U Hrvatskoj je 2003. godine incidencija karcinoma želuca u oba spola bila 26.5 na 100 000 stanovnika (muškarci 34.2/100 000; žene 19.3/100 000), sa najvećom pojavnošću između 80-84 godine života (31).

1.1.2. Etiološki čimbenici

S izuzetkom Japana, incidencija karcinoma želuca je obrnuto proporcionalno povezana sa socioekonomskim statusom koji vjerojatno odražava čitav niz socijalnih, kulturnih i prehrambenih čimbenika te utjecaja zanimanja.

Nekoliko je čimbenika prehrane i navika povezano s incidencijom karcinoma želuca te je tako u korelaciji s visokim unosom soli te konzumacijom usoljene, konzervirane ili dimljene ribe ili mesa te unosom nitrata, nitrita i sekundarnih amina (32). Vjeruje se da povezanost leži u činjenici da je navedena hrana jedan od uzročnika atrofičnog gastritisa i izvor nastanka karcinogenih N – nitroso spojeva (11). Policiklički aromatski ugljikovodici u takvoj hrani mogu biti kancerogeni, a nitrati i nitriti se mogu pretvoriti u poznate aktivne karcinogene N-nitrozamine. Pretpostavlja se da sol ima ulogu u razvoju kroničnog atrofičnog gastritisa te da može povećati mutagenost hrane koja sadrži nitrate i nitrite i djelovati kao ko-karcinogen. U Hisayama studiji, koja je pratila unos soli i pojavu karcinoma želuca, utvrđena je jaka veza između pojačanog unosa soli, Helicobacter pylori infekcije i atrofičnog gastritisa. (33). U smanjenju svjetske incidencije karcinoma želuca, vjerojatno je ulogu imalo i povećano konzumiranje hrane koja je konzervirana putem hlađenja i smrzavanja te je na taj način došlo do izbjegavanja uzimanja ovih kancerogena. Drugi čimbenici prehrane koji povećavaju rizik od nastanka karcinoma želuca uključuju hranu s malo masti i proteina te malo vitamina A i C. Mnoge studije su pokazale da je prehrana bogata sirovim povrćem, voćem i vlaknima te vitaminima A i C povezana s niskim rizikom nastanka karcinoma želuca. Kod populacije koja uzima velike količine voća i povrća pokazano je smanjenje rizika nastanka karcinoma želuca za 30-50% (34). I askorbinska kiselina i beta karoten koji se nalaze u svježem voću i povrću djeluju kao antioksidansi. Kalcij, vitamin A i vitamin C smatraju se protektivnim čimbenicima želučane sluznice jer mogu spriječiti konverziju nitrita u N–nitrozamine (11, 34). Poznato je da je lokalna koncentracija vitamina C smanjena u pacijenata inficiranih s HP (35, 36). U slijedu karcinogeneze od atrofičnog gastritisa do metaplazije, gubitak parijetalnih stanica rezultira podizanjem želučanog pH. Dolazi do proliferacije bakterija koje reduciraju nitrate te se kod visokog pH stvaraju nitriti koji mogu

doći u interakciju sa drugim spojevima koji sadržavaju dušik te sa drugim karcinogenim spojevima.

Pušenje cigareta također povećava relativni rizik od nastanka karcinoma proksimalog želuca za 2-3 puta (37), međutim konzumacija alkohola izgleda da nema utjecaja na povećanje rizika.

Iako je većina karcinoma želuca sporadična, oko 8% do 10% sadrži nasljednu komponentu.(35) Tako se karcinom želuca ponekad javlja u obiteljima sa mutacijom gena p53 (Li-Fraumeni sindrome) i BRCA2 (38).

Nasljedni difuzni karcinom želuca javlja se u 1% do 3% slučajeva, a uzrok leži u mutaciji gena CDH1 na kromosomu 16q22, za prepisivanje stanične adhezijske molekule E-cadherina što vodi do autosomno-dominantne predispozicije za razvoj karcinoma želuca sa penetracijom od oko 70% (36, 38-41). Obzirom da je rizik od nastanka visok Huntsman i sur.(36) predlažu profilaktičku gastrektomiju po identifikaciji mutacije ovog gena ili kontrolne gastroskopije svakih 6 mjeseci (42-44).

Drugi čimbenici koji su povezani s povećanim rizikom za nastanak karcinoma želuca su kronični atrofični gastritis (npr. perniciozna anemija, toksični i čimbenici prehrane, prijašnje operacije na želucu sa refluksom žuči), hipertrofična gastropatija (Metenierova bolest), polipi želuca , niski socioekonomski status te pretilost (11, 34).

Karcinom želuca može se razviti i kod sindroma nasljednog nepolipoznog karcinoma kolona (HNPCC) kao i dio sindroma gastrointestinalnih polipa uključujući obiteljsku adenomatoznu polipozu i Peutz-Jegers sindrom (35).

Između 5% i 10% slučajeva karcinoma želuca povezano je s infekcijom Epstein-Barr virusom (EBV). Ovi karcinomi obilježeni su metilacijom DNA promotorske regije različitih gena što smanjuje njihovu ekspresiju i time vodi nastanku tumora. U barem nekoliko slučajeva opisano je sprječavanje ekspresije E-cadherin gena putem metilacije promotora.

Karcinomi povezani sa EBV imaju posebna kliničkopatološka obilježja uključujući predominaciju kod muškaraca, lokalizaciju na kardiji želuca, limfocitnu infiltraciju, difuzni tip histologije te moguće povoljniju prognozu (45, 46).

Ostali čimbenici koji se dovode u vezu s nastankom karcinoma želuca jesu ranija resekcija želuca , a vjerojatno uzrok leži u refluksu žučnog sadržaja te kroničnoj upali sluznice. Rizik je povećan kod pacijenata operiranih zbog ulkusa želuca u odnosu na one operirane zbog ulkusa duodenuma, ali se pravi rizik za razvoj karcinoma želuca izgleda precjenjuje.(47)

Polipi želuca se obično nalaze kao slučajan nalaz prilikom endoskopije u 2-3% slučajeva. Polipi fundusnih žlijezda čine 47% svih polipa želuca te ne pokazuju maligni potencijal. Tipično, prezentiraju se kao multiple, 2-3 mm velike sesilne lezije u korpusu i fundusu, najčešće u zdravoj sluznici želuca. Većina slučajeva je sporadična, ali se može javiti u 53% pacijenata sa obiteljskom adenomatoznom polipozom, tj. Gardnerovim sindromom. Premda polipi sami za sebe nisu neoplastični, retrospektivne studije su pokazale prisustvo kolorektalnih neoplazija u do 60% pacijenata sa polipima fundusnih žlijezda(48).

Hiperplastični polipi su među najčešćim polipima i čine 28-75% svih polipa želuca. Lezije su tipično manje od 1,5 cm te nastaju na podlozi kroničnog atrofičnog gastritisa u 40-75% slučajeva. Najčešće kronični atrofinčni gastritis jest sekundaran infekciji HP čija eradikacija može dovesti do regresije polipa. Premda hiperplastični polipi nisu neoplastični, povremeno se mogu razviti displastične promjene. Pravi adenokarcinom se nalazi u 2% hiperplastičnih polipa. Kada se poronađu, indicirana je endoskopska polipektomija u svrhu histološkog pregleda. (48)

Adenomatozni polipi pokazuju određeni rizik malignosti. Čine 10% svih polipa želuca, te su najčešće antralni, sesilni, pojedinačni te erodirani. Adenomi se mogu prezentirati kao tubularni, tubulovilozni ili vilozni. Adenokarcinom želuca se može naći u 21% slučajeva s

povećanim rizikom kod većih polipa vilozne građe. Polipi veći od 4 cm u promjeru mogu sadržavati karcinom u 40% slučajeva. Fokalni karcinomi pronađeni su u 6% ravnih tubularnih adenoma te u 33% viloznih i tubuloviloznih adenoma. Nadalje, prisustvo adenoma želuca je pokazatelj poovećanog rizika za stvaranje adenokarcinoma u drugim dijelovima želuca. (48)

Kao jedan od glavnih etioloških čimbenika rizika nastanka karcinoma želuca i prekursorskih lezija u poslijednja dva desetljeća istražuje se infekcija sa bakterijom Helicobacter pylori (49, 50), međutim ne može se tvrditi da je samostalan uzročnik njegova nastanka (51) . Ipak, obzirom na brojne dokaze o povezanosti , u daljnjem tekstu se detaljnije obrađuje .

1.1.3. Patogeneza

Pretpostavlja se da adenokarcinom želuca nastaje kroz nekoliko stupnjeva procesa kancerogeneze. U njegovom nastanku vjerojatno postoji interakcija genetskih predispozicija, prehrambenih navika, infekcija te drugih čimbenika okoliša. Pri tome naslijeđene ili stečene genetske komponente u staničnom supstratu dolaze kroz određeno vrijeme pod utjecaj različitih okolišnih (npr. prehrambenih) čimbenika. To rezultira nakupljanjem genetskih mutacija koje se na kraju fenotipski manifestiraju kao prekancerozne lezije (kronični atrofični gastritis, adenomi želuca, intestinalna metaplazija i displazija želuca) te konačno karcinom (24, 52, 53) koje se mogu javljati sekvencionalno, ali i neovisno jedna o drugoj (54).

Correa i sur. predložili su multifaktorijalni model patogeneze intestinalnog tipa karcinoma želuca koji se mijenjao s nadolazećim spoznajama (24, 53). Proces je kontinuirana progresija lezija sluznice koja se javlja kroz dva ili tri desetljeća. Započinje akutnim površinskim gastritisom koji progredira u kronični aktivni neatrofični gastritis te potom u kronični multifokalni atrofični gastritis s razvojem intestinalne metaplazije, potom displazije te

konačno karcinoma. Procjenjuje se da 10% pacijenata s kroničnim atrofičnim gastritisom razvija karcinom želuca tijekom perioda od 15 godina. Međutim, gastritis je široko rasprostranjen u populaciji, a u većini slučajeva nema daljnje progresije osim ako želudac nije izložen drugim faktorima. Javlja se regeneracija sluznice, ali ako gastritis perzistira, sluznica želuca progresivno ide u atrofiju i može se djelomično zamijeniti intestinalnim tipom epitela (intestinalna metaplazija) što može progredirati preko displazije u malignu promjenu (48).
Atrofija i intestinalna metaplazija su multifokalne, a kao i gastritis najprije se javljaju na angularnom pregibu na spoju sluznice antruma i korpusa .

Intestinalna metaplazija označena je pojavom intestinalnog epitela izvan crijeva. Ova najčešća prekancerozna lezija povezana s karcinomom želuca obično se povezuje s intestinalnim podtipom iako se može naći i u pacijenata s difuznim podtipom (48).
Podjela intestinalne metaplazije koja kombinira morfološka obilježja te histokemijski pregled sluzi klasificira metaplaziju u tri tipa. Histokemijski, mucini normalne želučane sluznice su pH neutralni, dok se kod intestinalne metaplazije pojavljuju kiseli mucini koji pak mogu biti sijalični ili sulfatirani. Tip 1 odnosi se na zrele apsorpcijske stanice koje nalikuju stanicama sluznice tankog crijeva te sadrže većinu probavnih enzima i sijalomucine. Tip 2 je prijelazni oblik i odnosi se na nezrele apsorpcijske stanice sa želučanim i intestinalnim mucinima te malom količinom probavnih enzima. Tip 3 predstavlja obrazac intestinalne metaplazije koja nalikuje sluznici kolona sa mutiplim nepravilnim kapljicama sluzi u citoplazmi uz odsutan četkasti rub (55), a sadrži sulfatirane mucine (56). Tip 3 nosi najveći rizik od maligne transformacije, što je u skladu sa zapažanjima da je uznapredovali stadij te da nosi veći rizik od nastanka karcinoma želuca u odnosu na obrazac tankog crijeva, premda relativni rizik razvoja karcinoma želuca u pojedinih tipova intestinalne metaplazije još nije u potpunosti određen (57, 58).

Kako gastritis progredira prema kronicitetu dolazi do smanjenja broja parijetalnih stanica i stanica koje izlučuju pepsinogen te posljedičnog smanjenja mnogih endokrinih stanica u korpusu i antrumu želuca.

Koristan pokazatelj uznapredovalosti atrofije /metaplazije je određivanje serumske razine pepsinogena (59). Pepsinogen I secerniraju glavne i mukozne stanice vrata u žlijezdama korpusa i fundusa dok se pepsinogen II secernira iz ovih, ali i stanica piloričkih žlijezda kao i Brunnerovih žlijezda (60). Značajan pad serumskog pepsinogena I povezan je sa jakom atrofijom sluznice korpusa. Prema jednoj japanskoj studiji, atrofija želuca se može dijagnosticirati kada je serumska razina pepsinogena I manja od 70μg/l i kada je omjer razina pepsinogena I i pepsinogena II manja od 3.0 (61).

U korpusu, atrofija zahvaća stanice koje normalno seceniraju epidermalne i transformirajuće faktore rasta koji su mitogeni uključeni u cijeljenje sluznice, što može imati utjecaja na normalnu regeneraciju sluznice. Smanjenje egzokrine sekrecije želučane kiseline uz prateći porast želučanog pH dovodi do kolonizacije lumena želuca mikroorganizmima. Posljedičan rast bakterija rezultira daljnjom ozljedom sluznice direktno ili putem bakterijske produkcije nitrita i N-nitrozamina iz nitrata iz hrane.

Displazija se može podijeliti u displazije niskog, srednjeg i visokog stupnja . Obzirom da se intraepitelna displazija visokog stupnja razvija u karcinom želuca u 60% do 85% slučajeva, često se smatra ranim karcinomom želuca i indikacijom za operaciju (53, 62-67).

Relativno se malo zna o patogenezi difuznog tipa karcinoma želuca. Pretpostavlja se da ovom tipu karcinoma prethode dva tipa prekanceroznih lezija: ne-metaplastička displazija i globusna displazija. Obje lezije nastaju nakon mutacije jedne stanice u prethodno normalnoj sluznici želuca(48).

Molekularne promjene koje se događaju pri progresiji normalne želučane sluznice prema malignim promjenama još uvijek nisu do kraja poznate. Pretpostavlja se da se genska

nestabilnost, aktivnost telomeraza, te mutacija p53 gena događa rano u nastajanju malignog procesa, dok se kasnije javlja prekomjerna ekspresija epidermalnog faktora rasta i aktivacija onkogena.

Nedavno je identificirano nekoliko genskih alteracija povezanih s karcinomom želuca. Ove promjene mogu se klasificirati kao aktivacije onkogena, inaktivacije tumor-supresorskih gena, smanjenje stanične adhezije, reaktivacije telomeraze te prisutnost mikrosatelitne nestabilnosti. C-met protoonkogen je receptor za hepatocitni čimbenik rasta te je često pojačano izražen u karcinomu želuca kao i k-sam i c-erbB2 onkogeni. Inaktivacija tumor supresorskih gena p53 i p16 pronađena je u karcinomima i difuznog i intestinalnog tipa, dok je mutacija gena adenomatozne polipoze kolona (APC) češća u intestinalnom tipu karcinoma želuca. Nadalje, smanjenje ili gubitak stanične adhezijske molekule E-cadherina može se naći u približno 50% karcinoma difuznog tipa(36, 39-41). Mikrosatelitna nestabilnost se može naći u približno 20-30% karcinoma želuca intestinalnog tipa. Mikrosateliti su segmenti DNA u kojima se kratak (1-5 nukleotida dugačak) uzorak ponavlja nekoliko puta. Mikrosatelitna nestabilnost označena je dobivanjem ili gubitkom ponavljajućih sekvenci u mikrosatelitnim alelima matičnih stanica, vodeći ka ekspanziji klona koja je tipična za neoplazmu.

1.1.4. Helicobacter pylori i karcinom želuca

1.1.4.1 Epidemiologija infekcije s Helicobacter pylori

Epidemiološki podaci govore da je preko 90% karcinoma želuca povezano sa Helicobacter pylori (HP) infekcijom.

HP je spiralno oblikovana, mikroaerofilna , gram–negativna bakterija dimenzija 3.5x0.5 mikrona. Infekcija s HP najčešća je kronična bakterijska infekcija u ljudi (50% svjetske populacije je inficirano) (68). HP uzrokuje aktivni kronični gastritis u svih zaraženih

pacijenata, a klinički značajne bolesti želučani i dudenalni ulkusi, MALT limfomi i karcinom želuca predstavljaju krajnji rezultat infekcije u samo 20% inficiranih (69-71).

Zemlje sa visokom stopom karcinoma želuca tipično imaju visoku prevalenciju infekcije s HP, te smanjivanje prevalencije HP u razvijenim zemljama prati smanjivanje incidencije karcinoma želuca (72, 73). Izuzetak je Afrika gdje je infekcija s HP česta, dok karcinom želuca ostaje i dalje rijedak.

Infekcija s HP najvjerojatnije se događa u djetinjstvu fekooralnim putem i prijenosom s drugih osoba, te kontaminiranom hranom i vodom (74, 75), a osoba postaje doživotni nosioc. Prevalencija je blisko povezana sa socioekonomskim faktorima kao što su prenapučenost i loši sanitarni uvjeti života (76-80).

Povezanost kronične infekcije i razvoja karcinoma želuca danas se smatra dokazanom (81-84). 1994. godine , International Agency for Research on Cancer (IARC) i WHO klasificrala je HP kao tip I (definitivni) karcinogen u ljudi (85).

IARC procjenjuje da je oko 36 % slučajeva karcinoma želuca u razvijenim zemljama te 47% slučajeva u zemljama u razvoju povezano sa HP (85). Procjenjuje se da je oko 65 do 80% svih karcinoma želuca , izuzev karcinoma kardije uzrokovano infekcijom s HP (86-89). Međutim , poznato je da samo 1% zaraženih razvija karcinom želuca (90).

Po otkriću povezanosti infekcije s HP i karcinoma želuca uslijedile su brojne kliničke studije.

Rezultati različitih studija o reverzibilnosti atrofije i/ili intestinalne metaplazije nakon eradikacije nisu usklađeni. Većina autora pokazuje reverzibilnost atrofije , ali ne i intestinalne metaplazije (91-93). Jedna od značajnijih je i ona u kojoj su Fukase i sur.(94) u prospektivnoj, randomiziranoj, placebo kontroliranoj studiji sa 272 pacijenta u svakoj skupini pokazali značajno smanjenje rizika od razvoja metakronog karcinoma želuca nakon eradikacije HP. Studija je iz etičkih razloga prekinuta , a na temelju rezultata, Japansko društvo za istraživanje

HP promjenilo je preporuke za terapiju HP te je sada eradikacija preporučena za sve inficirane pacijente (95).

Vjerojatno najjači dokazi o ovoj povezanosti dolaze iz prospektivne studije na 1 526 pacijenta iz Japana kod kojih se karcinom želuca razvio u 2.9% inficiranih, a niti u jednog nezaraženog ispitanika (96).

Više studija je pokazalo da je HP povezan jednako i s intestinalnim i s difuznim tipom karcinoma želuca (97), a epidemiološke studije pokazuju da je infekcija s HP više povezana s distalnim, a manje s proksimalnim tipom karcinoma želuca (98, 99). U razvijenim zemljama, opadanje incidencije infekcije HP i incidencije karcinoma koji ne zahvaća kardiju dijametralno je suprotno brzom povećanju incidencije karcinoma kardije (100). Druge studije pokazale su značajnu obrnuto proporcinalnu povezanost između infekcije , osobito CagA+ sojevima i razvojem karcinoma kardije i jednjaka (101, 102). U zapadnim zemljama gdje opada prevalencija sa HP, incidencija GERB-a (gastroezofagealna refluksna bolest) i njegovih sekvela se povećava . Studije su pokazale da jaki atrofični gastritis i smanjena produkcija želučane kiseline povezana sa infekcijom s HP značajno smanjuje rizik od nastanka GERB-a (103-106). Međutim, nedavne studije nisu sa sigurnošću dokazale da eradikacija HP povećava rizik nastanka ezofagitisa i karcinoma kardije (107-114). Tako protektivni učinak HP protiv karcinoma kardije ostaje pitanje za diskusiju .

1.1.4.2. Patologija infekcije s Helicobacter pylori

Infekcija s HP povezana je s raznim kliničkim entitetima uključujući karcinom želuca i ulkus duodenuma. HP uvijek uzrokuje gastritis. Tip i intenzitet gastritisa određuje klinički ishod. Ukupna prevalencija HP infekcije je 28.7% u površinskom gastritisu, 57.7% u erozivnom gastritisu, 80.8% u ulkusu želuca te 52.4% u ranom karcinomu želuca. (115)

Postoje tri glavna fenotipa gastritisa .

1. Običan, benigni gatsritis .Ovaj fenotip je najčešći te je karakteriziran blagim pangastritisom sa malim oštećenjem funkcija sekrecije kiseline. Obično se vidi kod asimptomatskih pojedinaca koji ne razvijaju ozbiljniju gastrointestinalnu bolest

2. Tip duodenalnog ulkusa kojeg izražava 15 % inficiranih, dominantan je u području antruma želuca s gastritisom niskog stupnja u području korpusa želuca. Zadržana je normalna ili je čak povišena sekrecija želučane kiseline i vrlo rijetko razvijaju karcinom želuca. Postoji jaka upala antruma, visoka razina gastrina, visoka sekrecija kiseline te defekt inhibicijske kontrole sekrecije želučane kiseline. Pacijenti oboljevaju od duodenalnog ili prepiloručkog ulkusa

3. Fenotip karcinoma želuca. Karateriziran je izraženim gastritisom u području korpusa želuca, multifokalnom atrofijom sluznice, intestinalnom metaplazijom te hipoklorhidrijom. Ovaj tip zahvaća oko 1 % inficiranih, razvija se kao direktan rezultat kronične upale inducirane infekcijom i povećava rizik od karcinoma želuca. Fenotip je karakteriziran niskom sekrecijom kiseline, visokom razinom gastrina, niskom razinom pepsinogena I i niskim omjerom pepsinogen I/II, hipo ili anklorhidrijom (116, 117).

1.1.4.3. Čimbenici virulencije i patogeneza

Većina zaraženih ostaje asimptomatska bez ikakvih kliničkih posljedica. Kofaktori , koji dovode do povećanog rizika od razvoja karcinoma kod zaraženih, uključuju bakterijske faktore virulecije, proupalne faktore domaćina i okolišne čimbenike .

Prema modelu karcinogeneze i istraživanjima Correa i sur., u svezi karcinoma želuca, infekcijom s HP započinje progresivan niz lezije želučane sluznice od kroničnog gastritisa , atrofije sluznice, intestinalne metaplazije , displazije i konačno adenokarcinoma (118).

Jedan od prvih zabilježenih čimbenika virulencije jest unipolarna flagela koja bakteriji omogućava brzo prodiranje iz lumena želuca u mukozu te na taj način izbjegavanje okoliša s

niskim pH (119, 120). Nadalje, HP producira enzime poput ureaze kako bi održala neutralan pH u mikrookolišu lumena želuca. Mađutim , glavne čimbenike virulencije kodira skupina gena *cag* (PAI) (od eng. *cytotoxin-associated gene pathogenicity island*), a uključuje čimbenike virulencije kao što su CagA protein, VacA (od eng. *vacuolating toxin A*), BabA (od eng . *blood group antigen-binding adhesin*), OipA (od eng. *outer inflammatory protein*) te IceA (od eng. *induced by contact with epithelium*). Vjerojatno je najvažniji faktor virulencije upravo CagA te je poznato da se rizik od karcinoma povećava sa infekcijom s ovim sojem (121, 122).

U zapadnim zemljama , oko 60% HP čini CagA + soj(123), dok u Japanu skoro 100% sojeva posjeduje funkcionalan CagA (124, 125).

Stanice želučanog epitela prepoznaju CagA kao signalnu molekulu što u konačnici dovodi do indukcije signaliranja putem MAP kinaze, rezultirajući abnormalnom staničnom proliferacijom i pomicanjem epitelnih stanica želuca(126-128). Nadalje, dolazi do pucanja međustaničnih veza (129) zbog interakcije sa receptorom za hepatocitni faktor rasta i E-cadherinom (što narušava E cadherin /beta-cathenin kompleks), adapterskim proteinom GRB-5 te kinazom PAR1(130). Ove interakcije dovode do gubitka staničnih veza i polariteta što vodi indukciji proupalnog i mitogenog odgovora što može imati važnu ulogu u karcinogenezi. Daljnji tijek uključuje transkripciju gena uključenih u intestinalnu diferencijaciju kao što su cdx1 i muc2 mucinske gene koji uzrokuju transdiferencijaciju od želučanih prema intestinalnim epitelnim stanicama (131).

Hp Cag A + sojevi stimuliraju epitelne stanice želuca na ekspresiju i oslobađanje velikih količina proupalnih citokina kao što su interleukin-8 (IL-8) kako *in vivo* tako i *in vitro(132, 133)* .

Još jedan čimbenik virulencije koji je prisutan u svih sojeva HP je i vacA(od.eng. *vacuolating cytotoxin gene*), koji kodira vakuolizirajući citotoksin A(134-136). Ovaj pak ima

višestruke učinke na epitelne stanice što rezultira indukcijom nastanka vakuola u staničnoj membrani stanica želučanog epitela , oštećenju stanice i povećanju stanične permeabilnosti te prije modulaciji apoptoze nego oslobađanju proupalnih citokina . Nadalje , VacA povezan je sa promjenama arhitekture citoskeleta kroz modifikaciju gena i oštećenja gena staničnog ciklusa(136, 137). OipA (od eng. outer membrane inflammatory protein) je membranski protein HP koji je, kada je izražen zajedno sa CagA, povezan sa pojačanim upalnim odgovorom u želučanoj sluznici (138, 139).

Za virulenciju bakterije neophodna je adherencija za stanicu domaćina te adherencija bakterije HP za sluznicu želuca uključuje specifične bakterijske adhezine i receptore domaćina u koje spadaju fukozilirani antigeni ABO krvih grupa te Lewis b antigen(140-142). BabA (od eng. blood group antigens binding adhesin) je protein na membrani HP koji veže Lewis b antigen, ABO antigene i sialyl-Lewis x/a antigene (143). Tkiva koja ne posjeduju antigen Lewis b ne mogu vezati bakteriju HP. Ovaj nalaz ukazuje da učinak HP može biti smanjen kod pacijenata s krvnim grupama A i B u usporedbi s pacijentima krvne grupe 0.

PCR –om su analizirani geni virulencije HP i pokazano je da varijante koje koeksprimiraju CagA, VacAs1 i babA gene (trostruko pozitivni sojevi) značajno pogoršavaju upalu te mogu biti povezani sa duodenalnim ulkusom i karcinomom želuca u zemljama Zapada (144).

Čimbenici domaćina povezani s povećanim rizikom karcinoma želuca uključuju polimorfizam gena koji vodi visokoj ekspresiji proinflamatornog citokina interleukin-1β (145, 146). Time se povećava rizik od nastanka karcinoma želuca i njegovih prekursorskih lezija u prisutnosti HP infekcije koja povećava njegovu razinu. Genetski čimbenici koji utječu na ekspresiju IL-1β možda određuju zašto neki pojedinci inficirani s HP razvijaju karcinom želuca za razliku od ostalih.

HP značajno smanjuje bioraspoloživost vitamina C čime dolazi do oštećenja antioksidacijske sposobnosti sluznice. Također , nakon infekcije s HP dolazi do snažne aktivacije i

nakupljanja neutrofila u želučanoj sluznici koji produciraju inducibilinu sintetazu dušičnog oksida (iNOS) (od eng. *inducible nitric oxide synthase*) te oslobađaju dušični oksid i reaktivne metabolite kisika ,kao šo su superoksid i hidroksilni ioni koji oštećuju DNA što je praćeno mutacijom i malignom transformacijom (141)

Jedan od čimbenika domaćina za koji se čini da ima učinka na razvoj karcinoma želuca u kroničnoj infekciji s HP je i gastrin za koji se zna da stimulira proliferaciju stanica želučanog epitela i stanica karcinoma(147). Hipergastrinemija koja prati razvoj karcinoma želuca u eksperimentalnih životinja bila je povezana sa jakom ekspresijom određenih čimbenika rasta , COX-2-prostaglandin sustavom i antiapoptotskim proteinima kao što su survivin i Bcl2 , što je vodilo proliferaciji mutiranih atrofičnih stanica, jakoj angiogenezi te stvaranju karcinoma želuca (100, 147, 148).

Kultivirane stanice epitela želuca (KATOIII) pokazuju ekspresiju gena za gastrin i njegove receptore te podižu razinu antiapoptotskih molekula Bcl-2 i survivina te ukupno preživljenje (149). Ito i sur. (150) potvrdili su da pacijenti sa karcinomom želuca imaju značajno povišene razine gastrina u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu (147). Nadalje , gastrin stimulira ekspresiju gena i proteina COX-2 i HGF u kulturama stanica(149). Tako , infekcija s HP može doprinjeti karcinogenezi indukcijom ekspresije gastrina i COX-2 koji mogu stimulirati rast tumora , angiogenezu i smanjivanje apoptoze.

Ciklooksogenaza (COX) je ključni enzim koji metabolizira arahidonsku kiselinu u prostanoide koji predstavljaju važne biološke medijatore. Postoje tri izoenzima COX-1,

COX-2 i COX-3. Jaka ekspresija COX-1 javlja se u normalnoj sluznici želuca dok su mRNA za COX-2 te sam protein nedetektabilni u normalnim tkivima , ali postaju jako izraženi u aktiviranim makrofagima i drugim stanicama na mjestu upale kao i malignomima u ljudi i životinjskim modelima karcinogeneze (147, 149-152, 153.) COX-2 je mutagen u *in vitro* uvjetima te jaka ekspresija COX-2 može inhibirati apoptozu i povećati invazivnost malignih

stanica (152-155). Infekcija sa CagA+HP podiže ekspresiju COX-2 u karcinomu želuca ljudi te ekspresiju receptora za PGE2 kao i samog proteina u kulturama stanica karcinoma želuca i *in vivo* (151, 152, 156).

HP može aktivirati NFkB koji je oksidant-senzitivan regulator transkripcije inducibilne ekspresije gena upale kao što je COX -2 koji regulira rast i proliferaciju humanog karcinoma želuca (153-158). Kako je pojačana ekspresija COX-2 praćena jakim otpuštanjem prostaglandina, osobito PGE2 to može pridonijeti progresiji kronične upale i rastu tumora. PGE2, najjače izražen u limfocitima T u mukozi želuca na granici normale mukoze i tumorskih stanica , može imati centralnu ulogu u prostanoidima potaknutom stvaranju tumora(154). Glavni čimbenik koji potiče ekspresiju COX-2 je čini se gastrin koji može potaknuti ekspresiju čimbenika rasta kao što je HGF (od. eng. hepatocyte growth factor) i antiapoptostkih proteina kao što su BCL2 i survivin . Nadalje , vezanje HGF na receptor (C-Met) pojačava progresiju karcinoma želuca i podiže razinu ekspresije COX-2 (156).Tako gastrin koji se otpušta u velikim količinama nakon infekcije s HP uvelike pridonosi ekspresiji proupalnog COX-2-prostaglandin sustava i antiapoptotskih proteina i time rastu karcinoma .

Osim gastrina, postoji još nekoliko drugih čimbenika rasta eksprimiranih u karcinogenezi potaknutoj infekcijom HP u želucu. Opisana je povećana ekspresija gena u sluznici te oslobađanje u lumen EGF (od.eng epidermal growth factor) i TGF-α (od eng. transforming growth factor-alpha) kao i drugih čimenika rasta u pacijenata oboljenih od karcinoma želuca inficiranih sa HP, a te promjene se normaliziraju nakon eradikacije bakterije. Nadalje, nađena je povezanost nastanka karcinoma želuca u pacijenata inficiranih s HP sa jakom ekspresijom u sluznici želuca i oslobađanjem HGF, TGF- α te promjenjenom ragulacijom apoptotskih proteina Bax/Bcl-2(159-162). C-Met gen, proto-onkogeni član obitelji molekula receptora za čimbenike rasta s tirozin kinazom pojačano je izražen u preko 46% slučajeva karcinoma želuca. Pojačana ekpresija njegova liganda, HGF je nađena u 67%

slučajeva karcinoma želuca (160). HP aktvira C-Met te na taj način potiče stvaranje karcinoma želuca (163, 164).

U karcinogenezu povezanu sa infekcijom s HP uključeni su IL-8 i VEGF kao i dušični oksid (NO) dobiven putem prekomjerno eksprimirane inducibilne dušik oksid sintetaze (iNOS) barem u dijelu stimulacije angiogeneze(160).

Ohshimura i sur. (165) ukazuju da kronična upala kao ona inducirana s HP u sluznici želuca aktivira iNOS i brojne druge enzime kao što su mijeloperoksidaze , NADPH oksidaze, eozinofilne peroksidaze koji stvaraju brojne reaktivne spojeve kisika i dušika koji mogu oštetiti DNA i RNA vodeći prema povećanju mutacija i pridonoseći procesu višestupanjske karcinogeneze. Kod uznapredovalog karcinoma želuca postoji uska korealcija između ekspresije iNOS i VEGF (166) .Visoke razine NO uobičajene su kod većine karcinoma, a arginaza se natječe s iNOS za arginin katalizirajući njegovu hidrolizu u ornitin i ureu.(167) Sustav iNOS-NO kod sluznice inficirane s HP te osobito kod karcinoma porijeklom od HP podupire teoriju karcinogeneze od Correa (118, 168) da upalne promjene želučane sluznice započete s HP rezultiraju iz djelovanja brojnih reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva te se karcinogeneza može smatrati za rezulatat oksidativnog stresa.

Postoji hipoteza kako karcinom želuca nastaje iz karcinomskih matičnih stanica ili progenitorskih stanica (66) , a nedavno je opisan drugi mogući izvor karcinomskih matičnih stanica, uglavnom iz mezenhimalnih stanica deriviranih iz koštane srži – BMDC (od. eng. *bone marrow-derived mesenchymal cells*) tijekom istraživanja na mišjem modelu karcinoma želuca induciranog s HP (66).

Ove BMDC izgleda da posjeduju široku plastičnost i mogu migrirati kroz periferne organe kao rezultat njihova oštećenja ili upale. Put diferencijacije i regulacija rasta ovih stanica može ovisiti o lokalnim uvjetima . Kronična upala s HP privlači BMDC u sluznicu sa deplecijom

rezidentnih želučanih matičnih stanica . Nakon ulaska i smještaja u upaljenu sluznicu BMDC brzo rastu i pretvaraju se u stanice karcinoma. (66).

Unatoč novim spoznajama o razlikama u karcinogenezi pojedinih oblika karcinoma želuca, genetske razlike između karcinoma želuca povezanih s HP i nepovezanih s HP nisu potvrđene izuzev u slučajevima nasljednih oblika bolesti.

1.2. Patologija i klasifikacija karcinoma želuca

95% svih malignoma želuca su adenokarcinomi. Drugi histološki tipovi uključuju karcinom skvamoznih stanica, adenoakantome, karcinoide, gastrointestinalne stromalne tumore i limfome. Postoje mnoge patohistološke klasifkacije koje su pokušale na osnovu morfoloških makroskopskih i mikroskopskih karakteristika napraviti klasifikaciju na pojedine podtipove.

Prvu klasifikaciju na osnovu makroskopskog izgleda dao je Borrman 1926., koja se i danas koristi u endoskopiji. On opisuje 5 tipova karcinoma želuca na osnovi makroskopskog izgleda: polipoidni karcinom (Borrman tip I), ulcerirajući karcinom s oštro ograničenim rubovima i bez infiltracije (Borrman II), ulcerirajući i infiltrirajući karcinom bez jasnih granica (Borrman III) i difuzno infiltrirajući karcinom (Borrman IV). U Borrman tip V spadaju karcinomi želuca koji po karakteristikama ne spadaju u niti jednu od prethodno navedenih grupa. Tip I polipoidnog karcinoma ima široku bazu i jasno je omeđen od okolnog tkiva. Tip II ulcerirajućeg karcinoma ima jasno ograničene rubove i često ga nije moguće diferencirati od benignih ulkusa, barem prema makroskopskom izgledu. Tip III ima plitke rubove i raširenu submukoznu infiltraciju koja prodire kroz mišićni sloj do seroze. Tip IV difuznog karcinoma slabo je ograničen od okolnog tkiva te prodire kroz sve slojeve želuca u svim smjerovima. Tip IV prodire mnogo dalje nego što se

vidi okom i što se može palpirati. Tip IV koji uključuje čitav želudac naziva se i linitis plastica. Od ukupnog broja karcinoma želuca 10% otpada na tip I. Tip III je najčešći tip karcinoma želuca. (48)

Prvu histološku klasifikaciju dao je 1942. godine Borders, koja klasificira karcinome želuca u odnosu na stupanj stanične diferencijacije bez obzira na makroskopski izgled ili kliničku sliku. Ova klasifikacija opisuje 4 stupnja. Stupanj 1 predstavlja one karcinome koji po staničnom rasporedu odgovaraju normalnim žlijezdama želuca, međutim stanice imaju više i veće jezgre. U stupnju 2 stanice su i dalje organizirane slično kao i u žlijezdama, ali nemaju više onakvu preciznu staničnu organizaciju kao što se vidi u stupnju 1. Vidljive su individualne stanične razlike. Jezgre su velike i hiperkromatske te se mogu vidjeti mitoze. U stupnju 3 vidljiva je sluznična organizacija stanica, no mnogo manja nego u stupnju II, a veličina jezgara mnogo više varira. U stupnju IV ne vidi se glandularni oblik ni diferencijacija stanica te stanice imaju nepravilan izgled i hiperkromatske jezgre. Mogu se vidjeti gigantske stanice i stanice prstena pečatnjaka. (48)

Godine 1965. Lauren daje histološku klasifikaciju sa jasnom epidemiološkom, etiološkom, patološkom i prognostičkom značajnosti na intestinalni i difuzni tip. Ova klasifikacija ostaje najčešće korištena patohistološka klasifikacija karcinoma želuca. Intestinalni podtip ima žljezdanu strukturu koja sliči karcinomu kolona sa upalnom staničnom infiltracijom te čestom intestinalnom metaplazijom. Karakterizira ga uglavnom dobra diferencijacija. Tipično nastaje na podlozi prekanceroznih lezija kao što su atrofični gastritis i intestinalna metaplazija. Upravo su za ovaj podtip Correa i sur. (24) predložili model patogeneze od gastritisa do karcinoma. Muškarci su češće zahvaćeni ovim podtipom, a incidencija intestinalnim tipom povećava se s godinama te je dominanti tip u geografskim područjima visokog rizika (20, 21).

Difuzni tip ima slabu diferencijaciju , ne pokazuje formiranje žlijezda već se sastoji od sitnih nakupina malih uniformnih stanica i stanica poput prstena pečatnjaka. Pokazuje širenje kroz submukozu, ima manju upalnu infiltraciju te rano metastazira. Širi se lokalno i limfogeno. Obično ne nastaje na podlozi atrofičnog gastritisa, češći je kod žena i mlađih osoba. Povezuje se sa osobama kvne grupe A i nasljednom komponentom. Češće su intraperitoneealne metastaze te ima lošiju prognozu(19).

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je godine 1990. donijela klasifikaciju karcinoma želuca baziranu na morfološkim karakteristikama u 5 glavnih kategorija : adenokarcinom, adenoskvamozni karcinom, skvamozni karcinom, nediferncirani karcinom i neklasificirani. Adenokarcinomi se dalje dijele na 4 tipa prema obrascu rasta na papilarni, tubularni, mucinozni i tip stanica pečatnjaka. Svaki tip se dodatno dijeli s obzirom na stupanj diferencijacije. Premda se ova klasifikacija dosta koristi ima nekoliko loših strana (npr. ne klasificira značajan dio karcinoma želuca, a mnogi karcinomi želuca spadaju u dvije ili više kategorija), a što je i značajnije, nema veliki klinički značaj po pitanju liječenja pacijenata. (48)

Premda postoje brojne klasifikacije, danas je u najširoj uporabi TNM klasifikacija na osnovu koje se uznapredovalost bolesti dijeli u 4 stadija koji su povezani s liječenjem i prognozom bolesti.

Sistem stupnjevanja karcinoma želuca mijenjao se mnogo puta te nije jednak u SAD-u, Evropi i Aziji. 1960. godine Union Internationale Contra la Cancrum (UICC), American Joint Committee on Cancer (AJCC) i Japanese Research Society for Gastric Cancer (JRSGC) razvili su i objavili sustav stupnjevanja koji se od onda nezavisno mijenjao i nadograđivao više puta. 1988. godine UICC i AJCC dali su zajednički sustav klasifikacije želučanog

karcinoma. Kirurško stupnjevanje u skladu s TNM klasifikacijom također je prihvatio i JRSGC.(48)

Osnovni čimbenik koji utječe na TNM klasifikaciju vezano za primarni tumor (T) je stupanj penetracije stjenke želuca. Veličina i smještaj primarnog tumora od manjeg su značaja u određivanju T kategorije i procjene prognoze. Korist postojećeg sustava klasifikacije ograničava ne uzimanje u obzir mjesta porijekla tumora (proksimalni u odnosu na distalni) te identifikaciju intestinalnih odnosno difuznih tipova. Čimbenik zahvaćenosti limfnih čvorova (N) sada se odnosi na broj zahvaćenih limfnih čvorova , a čimbenik metastaza na prisustvo ili odsustvo metastaza u druge organe. Stupnjevanje u svrhu prognoze osobito je teško jer prognoza ovisi o terapijskim naporima, bilo kirurškim bilo konzervativnim, koji nisu uzeti u obzir u sistemima stupnjevanja. Iz tog razloga sve se više koristi klasifikacija rezidualnog tumora (R) kao dodatak TNM klasifikaciji. Ovu klasifikaciju uveo je Hermanek 1994. godine i ona uzima u obzir rezidualni tumor u području primarnog tumora i regionalnih limfnih čvorova kao i rezidualni tumor u udaljenim mjestima nakon kirurške resekcije. Tako se sa R0 označava potpuno odstranjenje tumora, s mikroskopski negativnim rubovima resekcije, R1 označava uklanjanje makroskopski vidljivog tumora sa pozitivnim mikroskopskim rubovima a R2 označava nepotpuno uklanjanje makroskopski vidljivog tumora.

Trenutno važeća verzija TNM klasifikacije je 7. revizija TNM klasifikacije (Tablica 1), a donosi promjene u smislu pridavanja još veće važnosti broju zahvaćenih limfnih čvorova kao i dubine invazije tumora kroz stjenku pa su sada kriteriji stroži.

TNM klasifikacija stadija karcinoma želuca (7. revizija, 2010.)	
Primarni tumor (T)	
Tis	Karcinom in situ, intraepitelni tumor
T1	T1a lamina propria T1b submukoza
T2	muskularis propria
T3	Infiltracija subseroze (ranije T2b)
T4	T4a penetracija seroze (ranije T3) T4b okolne strukture
Metastaze u limfnim čvorovima (N)	
N0	Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
Nx	Nije moguće odrediti N stadij
N1	1-2 regionalna čvora (ranije 1-6)
N2	3-6 regionalna čvora (ranije 7-15)
N3	Više od 7 regionalnih čvorova N3a 7-15 N3b više od 15
Udaljene metastaze (M)	
M0	Bez udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze

Tablica1. TNM klasifikacija karcinoma želuca, UICC, 7. revizija, 2010.

Na osnovu TNM kasifikacije određuje se stadij bolesti radi određivanja i praćenja liječenja i prognoze bolesti. (Tablica 2).

	T1	T2	T3	T4a	T4b
N0	IA	IB	IIA	IIB	IIIB
N1	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB
N2	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
N3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IIIC

- IV stadij: bilo koji T i N s M1

Tablica 2. Stadiji karcinoma želuca, UICC, 7. revizija, 2010.

Zahvaljujući velikoj prevalenciji karcinoma želuca u Japanu, mnoge spoznaje o ovoj bolesti vezano za nastanak, dijagnostiku i liječenje dolaze upravo iz Japana, a standardi se donekle razlikuju u odnosu na zemlje Evrope i Amerike.Jedna od posebnosti jest i klasifikacija . U japansku klasifikaciju uključeno je nekoliko važnih prognostičkih faktora. Lokacija primarnog tumora određena je prema podjeli želuca u tri različite anatomske regije na osnovu podjele velike i male krivine na tri jednako udaljene točke: gornja (c) trećina (fundus i kardija), srednja (m) trećina (korpus) i donja (a) trećina (antrum).(169, 170) (171)Lokacija tumora određuje širinu resekcije želuca te ima utjecaja na klasifikaciju drenažnog limfnog sustava. Primarni karcinom stupnjevan je ne samo prema stupnju zahvaćanja stjenke želuca, već i prema obrascu infiltracije u subserozu i serozu. Nadalje, izgled primarnog tumora podijeljen je prema Borrman-ovoj klasifikaciji. Opisuje se 16 različitih anatomskih lokacija regionalnih limfnih čvorova, a oni se kombiniraju u 4 kategorije (N1-N4) s obzirom na

anatomsku poziciju i mjesto primarnog tumora. Koje su od 16 pojedinačnih anatomskih grupa limfnih čvorova uključene u N1, N2, N3 i N4 kategoriju, u potpunosti zavisi o mjestu primarnog tumora(171, 172).Važno je napomenuti da klasifikacija po japanskom sustavu (N1-N4) nije usporediva s podjelom prema TNM sustavu od N0-N3.(173) Prema TNM klasifikaciji N kategorija označava broj metastatskih limfnih čvorova , dok se prema japanskoj klasifikaciji N kategorijom označavaju skupne limfnih čvorova koje su različite za pojedine primarne lokacije tumora. Invazija N4 čvorova japanskog sustava stupnjevanja i limfnih čvorova drugdje u abdomenu označava se kao udaljene metastaze (M1) prema japanskom sustavu (173).

1.4. Liječenje karcinoma želuca

Premda je kirurška resekcija jedini način liječenja koji nudi mogućnost izlječenja pacijentima oboljelih od karcinoma želuca, proširenost resekcije koju zahtjeva potencijalna kurativna operacija te opseg limfadenektomije i dalje je predmet rasprave. Preoperacijski se donosi odluka o karakteru kirurškog liječenja dok se intraoperacijski donosi odluka o samoj metodi.

Cilj radikalnog kirurškog liječenja je odstraniti tumor sa sigurnim mikroskopskim granicama te potencijalno zahvaćene limfne čvorove. Operacija kod koje se tumor ne odstranjuje u potpunosti ne poboljšava prognozu bolesti te se mora smatrati palijativnim zahvatom. Smatra se da je potrebno obzirom na histološki tip prema Laurenu imati kirurške granice od 5 cm odnosno 10 cm za intestinalni odnosno difuzni tip te odstraniti najmanje jednu etažu limfnih čvorova iznad one potencijalno zahvaćene (169).

Za karcinome distalne trećine želuca može se učiniti ili subtotalna resekcija želuca ili gastrektomija. Mnoge studije su proučavale ulogu gastrektomije u odnosu na subtotalnu

resekciju želuca u liječenju karcinoma želuca. Većina ovih studija zaključila je da gastrektomija koja je neophodna da bi se dobili adekvatni resekcijski rubovi ne poboljšava stopu preživljenja pacijenata, ali može povećati stopu postoperativnog morbiditeta. Karcinomi srednje trećine gotovo uvijek zahtijevaju gastrektomiju dok karcinomi proksimalnog dijela želuca zahtijevaju distalnu ezofagektomiju kao dodatak gastrektomiji. (48)

O izboru opsega limfadenektomije i danas se vodi rasprava. Limfni čvorovi u koje se drenira limfa iz želuca mogu se podijeliti na perigastrične (lijeve i desne kardijalne, uz veliku i malu krivinu te supra i infrapilorički), paragastrične (uz lijevu želučanu arteriju, uz zajedničku jetrenu arteriju, uz lijenalnu arteriju, limfni čvorovi hilusa slezene, uz jetrenu arteriju te uz celijačni trunkus) i udaljene (hepatoduodenalni, stražnji pankreasni, uz korijen mezenterija, paraezofagealni te dijafragmalni). Obzirom na navedene skupine definira se i disekcija limfnih čvorova kao D1, D2, i D3 (ovdje su uključeni i paraaortalni limfni čvorovi). U Japanu, resekcija želuca i okolnih limfnih čvorova opisuje se kao R0 do R4. R0 resekcija uključuje gastrektomiju sa nepotpunom disekcijom N1 limfnih čvorova. R1 resekcija uključuje kompletno odstranjivanje svih N1 limfnih čvorova. R2, R3 i R4 resekcija uključuju gastrektomiju uz kompletno odstranjivanje N2, N3 i N4 limfnih čvorova. Mora se napomenuti da grupe limfnih čvorova koje su uključene u R1 do R4 resekcije variraju u skladu sa lokacijom primarnog tumora jer N1 do N4 limfni čvorovi zavise od lokacije primarnog tumora(detaljnije u prethodnom poglavlju). Profilaktička resekcija limfnih čvorova, kod kojih se proširenost resekcije grupa limfnih čvorova povećava za jedan nivo od nivoa verificiranog limfatičkog širenja (npr. R>N) je rutinska praksa u Japanu (169).

Za razliku od Japana, u zapadnim zemljama, grupe limfnih čvorova nisu definirane položajem primarnog tumora već samo anatomskom lokalizacijom. Nadalje, kirurzi u SAD-u i drugim zapadnim zemljama rijetko izvode proširenu profilaktičku limfadenektomiju.

Umjesto toga, zajedno sa reseciranim preparatom odstranjuju se perigastrični limfni čvorovi. U zapadnim zemljama R0 resekcija se odnosi na nepotpuno odstranjenje perigastričnih limfnih čvorova. R1 resekcija podrazumijeva gastrektomiju sa kompletnim odstranjivanjem svih perigastričnih limfnih čvorova. R2 resekcija odnosi se na gastrektomiju sa resekcijom svih perigastričnih limfnih čvorova te svih limfnih čvorova uzduž glavnih arterija želuca. R3 resekcija označava R2 resekciju zajedno s odstranjivanjem limfnih čvorova uzduž trunkus celijakusa te R4 označava R3 resekciju zajedno s odstranjivanjem paraaortalnih limfnih čvorova.(48)

Japanski autori objavili su značajno bolje preživljenje kod proširenih limfadenektomija (170, 172, 174, 175). Na zapadu, retrospektivne studije, kao i one prospektivne, randomizirane na ograničenom broju pacijenata nisu uspjele dokazati prednost D2 nad D1 limfadenektomijom. Jedine dvije velike prospektivne randomizirane studije o D1 i D2 proširenoj resekciji želuca i limfadenektomiji u ne-japanskog stanovništva su nizozemska studija(176) i British Medical Research Council (177) studija. Ova zadnja uključila je 780 pacijenata s karcinomom želuca koji su slučajnim odabirom bili podvrgnuti ili gastrektomiji s limitiranom disekcijom N1 limfnih čvorova (D1, 380 pacijenta) ili gastrektomiji sa proširenom N2 disekcijom limfnih čvorova (D2, 331 pacijent). Na nesreću, usprkos ozbiljnim pokušajima standardizacije kirurškog zahvata, dogodile su se brojne devijacije od standardnog protokola što je rezultiralo prikrivanjem bilo koje jasne razlike između dvije operativne procedure. Pacijenti podvrgnuti D2 limfadenektomiji imali su značajno veće stope morbiditeta (43% : 25%) i mortaliteta (10% : 4%) nego pacijenti koji su podvrgnuti D1 limfadenektomiji, dok je stopa petogodišnjeg preživljavanja u obje grupe pacijenata bila slična (45% : 47%). Autori su zaključili da njihovi rezultati ne podupiru rutinsku primjenu D2 limfadenektomije u nizozemskih pacijenata sa karcinomom želuca. Britanska studija od 400 pacijenata slično randomiziranih također je pokazala značajno veći

morbiditet (46% : 28%) i mortalitet (13% : 6,5%). , dok je petogodišnje preživljenje bili slično (33% : 35%) Autori su zaključili da veća stopa mortaliteta u pacijenata koji su podvrgnuti D2 limfadenektomije može poništiti bilo kakav pozitivan učinak na preživljavanje dobiven izvođenjem D2 procedure.

Potrebno je, međutim, naglasiti da u obje studije (nizozemska i britanska) opseg limfadenektomije nije bio adekvatno standardiziran, te je umjesto standardne D1 limfadenektomije u stvari gotovo redovito provođena tzv. proširena D1 limfadenektomija (kod koje se odstranjuju paragastrični limfni čvorovi i limfni čvorovi uz lijevu želučanu arteriju), dok u nekim slučajevima D2 limfadenektomija nije bila potpuna. Uz to, obzirom na broj pacijenata i operatera te trajanje studija, prosječan broj operacija po operateru godišnje iznosio je oko 1 (178).

Daljnje analize navedenih studija ipak su pokazale (177, 179, 180) prednosti proširenih limfadenktomija , kao i studije koje su uslijedile (181-185), a bez povećanja postoperativnog mobiditeta i mortaliteta. Retrospektivne studije nisu pokazale pozitivan učinak D3 limfadenektomije na preživljavanje u odnosu na D2 limfadenektomiju te za sada ta tema predstavlja predmet diskusije (186).

Iz razloga što su limfni čvorovi u hilusu slezene te uzduž splenične arterije često histološki potvrđivani kao pozitivni, neko vrijeme se izvodila rutinska splenektomija. Međutim, profilaktička splenektomija nije pokazala poboljšanje preživljavanja pacijenata sličnog stadija i povećava stopu morbiditeta kurativne gastrektomije(187). Resekcija distalnog pankreasa također nije pokazala da poboljšava stopu preživljavanja već povećava stopu morbiditeta kurativne resekcije. Iz razloga što splenektomija i distalna pankreatektomija mogu rezultirati značajnim dodatnim komplikacijama ne bi se trebale rutinski izvoditi (188). Međutim, resekcija susjednih organa (uključujući slezenu i pankreas) indicirana je kod direktne invazije primarnim tumorom.

Jedna od velikih studija koja je analizirala rezultate kirurškog liječenja u SAD-u je ACS (American College of Surgeons) studija na 18,365 pacijenata sa karcinomom želuca, a rezultati su slični drugim studijama provedenim u zapadnim zemljama (189).

Gastrični i perigastrični limfni čvorovi uključeni su u disekciju u samo 47% - 49 % slučajeva te su bili zahvaćeni karcinomom u 67%. Znatno manji broj pacijenta podvrgnut je disekciji ekstragastričnih limfnih čvorova uključujući celijačne (14%), limfne čvorove uz zajedničku hepatičnu arteriju (6%) te splenične (8%). Metastaze su bile prisutne u 57% celijačnih limfnih čvorova te u 37% kako spleničnih tako i limfnih čvorova uz zajedničku hepatičnu arteriju. Za cijelu studijsku grupu 30-dnevni operativni mortalitet bio je 7,2%. Ukupna stopa preživljenja nakon resekcije je bila 19% (50%, 29%, 13% te 3% za pacijente sa TNM stadijima I, II, III i IV). Pacijenti sa stadijem I gdje je tumor uključivao srednju trećinu želuca, a koji su imali čiste resekcijske rubove imali su najbolju stopu petogodišnjeg preživljenja (61%). Samo 14% pacijenata podvrgnuto je disekciji celijačnih limfnih čvorova što je minimalna limfadenektomija potrebna za japansku R2 resekciju.

Usporedba sa retrospektivnim podacima prikupljenim iz 56 japanskih centara ističe prognostičke i klasifikacijske razlike. Podaci ACS-a pokazuju manju incidenciju stupnja I (17% u odnosu na 34%) te veću incidenciju stupnja III i IV (66% : 52%) Za svaki stupanj posebno, kao i opća stopa petogodišnjeg preživljenja operiranih pacijenata bila je mnogo veća u Japanu (56% : 19%). Rezultati ACS-ove studije također su lošiji od onih iz pojedinih institucija iz SAD-a, ali vjerojatnije su reprezentativniji s obzirom na čitav SAD. (189)

Premda iz Japana dolaze ohrabrujući podaci gdje se adjuvantna kemoterapija smatra standardom te se započinje neposredno tijekom poslijeoperativnog perioda ili čak intraoperativno, u zapadnim zemljama se adjuvantna terapija nakon kurativne resekcije nije pokazala korisnom u terapijskim protokolima koji su testirani do danas. Trenutno se adjuvantna kemoterapija karcinoma želuca ne može preporučiti van pažljivo kontroliranih

kliničkih studija.(190) S druge strane, preliminarni rezulutati studija s adjuvantnom kemoradioterpijom ukazuju na određene koristi za pacijente , osobito one za neadekvatnom D2 limfadenektomijom, Zbog razočaravajućih rezultata koji su dobiveni do sada, vezano za postoperativnu adjuvantnu kemoterapiju, u zapadnim zemljama preoperativna neoadjuvantna kemotarapija dobiva sve veću pažnju kako bi se smanjio stadij uznapredovalosti tumora. Rezultati nekoliko studija o neoadjuvantnoj kemoterapiji su dostupni, ali se učinak preoperativne kemoterapije na dugoročno preživljavanje još nije procijenio (191, 192).

1.3.1 Rani ili superficijalni karcinom želuca

1962. godine japansko gastroenetrološko endoskopsko društvo postavilo je koncept ranog karcinoma želuca (lezija koja se odnosi na mukozu i submukozu) kao različiti entitet od uznapredovalog karcinoma želuca (lezija koja uključuje muscularis propriu i dublje). Mora se napomenuti da iako izraz rani karcinom želuca nosi vremenske konotacije, to se odnosi na karakteristike primarne lezije bez obzira da li je došlo do vaskularne invazije ili su prisutne metastaze u limfnim čvorovima. Iz tog razloga predloženo je korištenje izraza superficijalni karcinom želuca umjesto rani, kako bi se točnije opisale histopatološke karakteristike lezije i izbjegla zabuna u slučajevima kada je došlo do vaskularne invazije ili metastaza u limfne čvorove kod karcinoma želuca ograničenog na mukozu i submukozu (174).

Japanska klasifikacija ranog karcinoma želuca na osnovu makroskopske morfologije tumora se široko prihvatila (premda nije u korelaciji s prognozom) jer služi kao osnova komunikacije između radiologa, endoskopičara, kirurga i patologa. Klasifikacija uključuje tri osnovna tipa. Protrudirajući ili polipoidni (tip 1), superficijalni (tip 2) te ekskavirajući (tip3). Površinski tip se dalje dijeli u tri podtipa: uzdignuti (2a), ravni (2b) i duboki (2c) Danas se smatra da je rani karcinom želuca oblik bolesti koji je u visokom postotku izlječiv nakon adekvatne resekcije.

Međutim, prepoznavanje takvog oblika bolesti kao zasebne forme bolesti ili kao različitog biološkog entiteta još uvijek je predmet rasprave (181).

Neka od njih su endoskopska submukozna disekcija (ESD) i endoskopska mukozna resekcija (EMR) dijatermijskim nožem, s kojima se uspješno mogu liječiti rani diferencirani karcinomi želuca manji od 2 cm. Do sada se pokazalo kako rani karcinom želuca nema veliku sposobnost stvaranja skip-metastaza te se uz ESD radi laparoskopska disekcija limfnih čvorova (LLND-laparoscopic lymph node dissection) kako bi se izbjegle opsežnije operacije i na vrijeme otkrile potencijalne metastaze u limfnim čvorovima. U slučaju metastaza u limfnim čvorovima se pristupa standardnoj gastrektomiji sa proširenom disekcijom limfnih čvorova (181, 193, 194).

S druge strane , neki autori za rane karcinome želuca preporučaju R2 resekcija kao standardnu operaciju jer približno 10% ovih karcinoma ima metastaze u limfnim čvorovima. Incidencija je direktno ovisna o dubini invazije - od 0,6% do 11% (srednja vrijednost 3%) za mukozne karcinome te 1% - 27% (srednja vrijednost 20%) za submukozne karcinome. R1 resekcija smatra se prikladnom u tretmanu samo lezija koje su ograničena na mukozu i manje od 10 mm u maksimalnom promjeru. Petogodišnje preživljavanje nakon resekcije ranog karcinoma želuca varira između 70% i 95% u zavisnosti od prisutnosti metastaza u limfnim čvorovima. Na nesreću, u SAD-u i drugim zapadnim zemljama rani karcinom želuca predstavlja samo 10-15% svih slučajeva karcinoma želuca. (48)

1.4. Survivin

1.4.1. IAP molekule i apoptoza

Poremećaj fiziološke apoptoze smatra se za ključni korak u nastanku tumora premda sam mehanizam nije do kraja razjašnjen. U regulaciji apoptoze sudjeluje čitav niz molekula s pro i anti apoptotskim svojstvima. Uz poznatu skupinu molekula koje pripadaju porodici Bcl-2 proteina uključenih u ove mehanizme u posljednje vrijeme predmet je istraživanja i skupina molekula nazvana IAP (od eng. *inhibitors of apoptosis*) koje uglavnom imaju ulogu u antiapoptotskim mehanizmima (195).

Apoptoza je mehanizam stanične smrti uzrokovan aktivacijom kaspaza , skupine unutarstaničnih cisteinskih proteaza koje cijepaju supstratne molekule na mjestu aspartatne kiseline (196). Kaspaze se unutar stanica nalaze u inaktivnom obliku, a aktiviraju se na različite stimuluse stanične smrti. Putem proteolotičke kaskade kaspaze su funkcionalno međusobno povezane pri čemu jedna početna kaspaza cijepa slijedeću u nizu i na taj način ju aktivira te ova postaje enzimatski aktivna prema slijedećoj inaktivnoj kaspazi u nizu (197, 198).

IAP inhibiraju najmanje dva glavna puta aktivacije kaspaza 1) mitohondrijski, koji uključuje citokrom c te 2) put aktivacije smrtonosnim receptorima TNF (od eng. tumor necrosis factor). IAP imaju utjecaja i na treći put u kojem granzim B direktno aktivira kaspazu 3 (199, 200).

Mitohondrijski ili unutarnji put aktivacije kaspaza započinje otpuštanjem citokroma c iz mitohondrija koji se inače nalazi između unutarnje i vanjske membrane mitohondrija odakle se na različite proapoptotske stimuluse otpušta u citosol (195). Tada se veže na molekulu Apaf-1 koju tako aktivira te ona potom aktivira prokaspazu 9 koja cijepa prokaspazu 3 u aktivni oblik (201, 202).

Put aktivacije smrtonosnim receptorima započinje s TNF skupinom citokinskih receptora koja uključuje Fas (CD95), DR4 (Trail-R1) i TNF-R1 (CD120a). Nakon aktivacije ligandom koji se vezuje za vanstaničnu domenu, smrtonosni receptori aktiviraju smrtonosnu domenu Fadd/Mort-1. Nakon vezivanja za smrtonosni receptor Fas vezana smrtonosna domena veže kaspazu 8 (203, 204), te formira signalni kompleks za indukciju stanične smrti za koji se vezuju molekule kaspaze 8 što vodi do dimerizacije kompleksa i njegove aktivacije. Cijepanje kaspaze 8 pojačava stabilnost dimeriziranog oblika (205) . Aktivna kaspaza 8 otpušta se u citosol gdje aktivira daljnje efektorske kaspaze (206, 207). Unutarnji i vanjski put konvergiraju prema aktivaciji efektorskih kaspaza kao što je kaspaza 3 koja aktivira unutarstanične proteine potrebne za indukciju finalnih stadija stanične smrti. Ova dva puta nisu potpuno odvojena te se molekule jednog puta nalaze u drugom i obrnuto (208-210).

Molekule skupine IAP inhibiraju kaspaze 3, 7, i 9 te tako sprječavaju apoptozu (198, 211). Do danas je identificirano 8 molekula koje pripadaju humanoj IAP . IAP molekule su grupirane u ovu obitelj na temelju prisutnosti jedne do tri BIR domene (od eng. baculovirus IAP repeat) , regije od oko 70 aminokiselina koja može vezati cink. Iako je BIR karakteristika IAP skupine molekula, sve molekule sa BIR domenom nemaju antiapoptotska svojstva (212-215). IAP skupina proteina može sadržavati i RING ili CARD (caspase activation recruitment domain) domenu (198). IAP molekule se dijele u tri klase na osnovu prisutnosti RING domene i homologije BIR domena (216).

Klasa 1 ima homologne BIR domene i RING skupinu. Najviše istražena molekula ovoj klasi je XIAP (od eng. X-linked IAP) , sadrži 3 BIR domene (217), veže se i inhibira kaspaze 3, 7 i 9, ali ne i kaspazu 8 (207, 218). Protein klase 2 , NAIP (od eng. neuronal apoptosis inhibitor protein) ima tri BIR domene, ali nema RING skupinu (219). NAIP je izražen u jetri odraslog čovjeka, placenti središnjem živčanom sustavu . Inhibira kaspaze 3 i 7 , ali ne i 1, 4, 5 ili 8

(220). Članovi klase 3 , kao što je survivin , sadrže samo jednu BIR domenu te nemaju RING skupinu.

Inhibicija kaspaza je najbolje istraženi mehanizam kojim IAP sprječavaju apoptozu. Dokazano je da rekombinantna XIAP inhibira kaspazu 3,7 i 9 ali ne i kaspazu 8. *In vitro*, pojačana ekspresija XIAP kod 293T stanične linije prevenira BAX-om i FAS-om inducirano aktiviranje prokaspaze 3 i apoptozu (221). Učinak XIAP-a ide preko BIR domena, gdje BIR2 domena inhibira kaspaze 3 i 7 , a BIR3 RING domena inhibira kaspazu 9. (195) Nadalje, istraživanja su pokazala da IAP skupina molekula može inhibirati apoptozu i djelovanjem na progresiju staničnog ciklusa, dijeljenje stanice i provodnju signala .

IAP molekule imaju i ulogu u diobi stanice U stanicama sisavaca, survivin se nalazi na mjestu mitotskog aparata uključujući B tubulin, mikrotubule, centrosome i kinetohore (222-224). Inhibicija survivina protutijelima dovodi do odgođene metafaze i nastanka mitotskih stanica sa kraćim i manje zgusnutim mitotskim vretenom (222, 224).

Postoje dokazi da IAP molekule služe kao regulatori staničnog ciklusa. Pojačana ekspresija XIAP zadržava stanicu u G_0-G_1 fazi staničnog ciklusa(225). Survivin je također uključen u regulaciju staničnog ciklusa te je kod HeLa stanica gotovo nedektabilan u fazi G_1, a podiže se oko 5 odnosno 40 puta u S, odnosno G_2-M fazi ciklusa(224).

Nadalje, IAP proteini imaju ulogu u staničnom signaliranju aktivirajući NF-κB (od eng . nuclear factor-κB).

Regulacija IAP molekula ide od razine gena, mRNA , do samog proteina. Od velikog su interesa endogeni inhibitorni proteini jer pretstavlju prototip za stvaranje budućih terapijskih kemijskih inhibitora . Regulacijski proteini najprije su nađeni na modelu

Drosophile, te kasnije na humanom modelu gdje su nazvani SMAC/DIABLO i HTRA2(226, 227).

Humani SMAC i HTRA2 su mitohondrijski proteini koji se otpuštaju zajedno sa citokromom c tijekom prsnuća mitohondrija. Kod otpuštanja, cijepaju se u aktivni oblik u kojem se vežu za IAP molekule na mjestu BIR domene te tako sprječavaju njihovo vezanje sa kaspazama (228-231). Survivin pripada IAP porodici molekula, u većini zrelih tkiva se ne može detektirati, međutim jako je izražen u karcinomskom tkivu. Reguliran je staničnim ciklusom, te je uključen u kontrolu mehanizma apoptoze te diobe stanice.

1.4.2. Survivin – uloga u nastanku i razvoju tumora

Survivin je najmanja molekula u obitelji IAP molekula (232), a od njegova otkrića i kloniranja gena 1997. godine neprestani je predmet istraživanja različitih polja biomedicinskih znanosti.

Ubrzo nakon otkrića, postavilo se pitanje prave funkcije survivina u stanicama sisavaca. Prekomjerna ekspresija survivina u različitim stanicama povezana je sa inhibicijom stanične smrti, a njegovo blokiranje dovodi, osobito u tumorskim stanicama, do spontane stanične smrti i pojačavanja učinka drugih stimulatora apoptoze (233). Njegova ekspresija je nađena i u normalnim stanicama, ali u maloj količini i tijekom G2/M faze staničnog ciklusa, (234),dok se u tumorskim stanicama nalazi i tijekom interfaze (235, 236). Molekularni mehanizam kojim je survivin uključen u sprječavanje apoptoze i staničnu diobu intenzivno se istražuje u karcinomskim stanicama (237).

Survivin jer strukturni homodimer koji sadrži jednu BIR domenu te karboksi terminalnu zavojnicu (238), bez drugih posebnih proteinskih domena (232). Regulacija ekspresije gena je kompleksna te uključuje višestruke puteve transkripcijske i post

transkripcijske kontrole. Kod ljudi, gen se nalazi na kromosomu 17 te je podložan alternativnom *splicingu* pa na taj način daje višestruke proteinske izoforme (239). Transkripcijski je kontroliran staničnim ciklusom sa vrškom ekspresije tijekom mitoze (240, 241). Opisani su i primjeri ekspresije neovisne o staničnom ciklusu, osobito kao odgovor na stimulaciju čimbenicima rasta i citokinima (242). Postoje također i mehanizmi post transkripcijske modulacije razine survivina , osobito u tumorskim stanicama . Novostvoreni protein se postranskripcijski regulira degradativnim i nedegredativnim mehanizmima (243, 244) ubikvitacijom i deubikvitacijom kao i fosforilacijom putem kinaza uključujući Cdk1 (245), Aurora B (246) i protein kinazu A (247). Postranskripcijski mehanizmi važni su za stabilnost survivina te u kontroli prijenosa proteina između različitih subcelularnih odjeljaka .

Pojačano izražavanje survivina u gotovo svim tumorima u komparaciji s normalnim tkivima dovelo je do zaključka da survivin definitivno ima ulogu u rastu tumora te vjerojatno u više točaka karcinogeneze od inicijacije do metastaziranja.(233). Izražavanje je povezano i s ishodom bolesti , odnosno rezistencijom prema terapiji, agresivnom obrascu razvoja te kraćem preživljenju.

Međutim, survivin nije izražen samo u karcinomima, već se nalazi u velikim količinama i u tkivim tijekom fetalnog razdoblja što govori da je važan za homeostazu normalnih tkiva (248). Pokusi na mišjim modelima kojima su izbačeni geni za survivin pokazali su ili prekomjernu apoptozu (249); (250), mitotičke defekte sa katastrofičnim posljedicama (251) ili oboje (252). U svakom slučaju potpuni izostanak survivina nije spojiv sa normalnim razvojem tkiva. To je donijelo oprez u razvoj terapije karcinoma bazirane na blokiranje survivina zbog potencijalnog rizika prema normalnim tkivima (253).

Postavlja se pitanje zašto se molekularni antagonisti survivina , barem oni testirani do sada dobro podnose *in vivo*? (254), Takvi anatagonisti , uključujući i blokirajuću RNA pokazali su učinak na tumorske stanice sprječavajući proliferaciju stanica ,uzrokujući mitotske defekte

te započinjujući sponatnu apoptozu dok su uglavnom bezopasni za normalne stanice na mišjem modelu (233). Slično su pokazala i istraživanja na pacijentima , pa je tako represor transkripcije survivina YM155 dao dobre rezultate uz manje nuspojave. (255), (256).

Objašnjanje za ovakav učinak vjerojatno leži u različtim interakcijama survivna u tumorskim i normalnim stanicama(254)

Nadalje, moguće je da su zapravo proteini, odnosno geni, s kojima survivin dolazi u interakcije , zapravo „karcinomski geni“ kao što su na primjer čaperoni Hsp90 (Fortugno (257) i Hsp60 (258) koji su pojačano izraženi u tumorima.

Ovi navodi dokazani su na eksperimentalnim modelima gdje je blokiranje proteina uzrokovalo smrt tumorskih, bez utjecaja na zdrave stanice(258, 259) .

Slično se vjerojatno događa i kod interakcije survivina sa mitotskim molekulama. Nekoliko molekula iz ovih puteva, uključujući Auroru i Cdk1 kinaze često se pojačano izražavaju u karcinomu. Interakcija između survivina i Ran-GTP signalnog puta može objasniti kvalitativne razlike signalnih puteva kod tumora i normalnih stanica. Survivin može ući u interakciju sa signaliranjem putem Ran-GTP vezujući se za njegovu efektorsku molekulu Crm1 (260) ili direktno , fizičkim povezivanjem s Ran-GTP u S fazi te ponovo u mitozi . Kompleks survivin-Crm1 sudjeluje u transportu kinetohora , dok je survivin-Ran-GTP interakcija potrebna za pravilno stvaranje vretena povećavajući lokalnu koncentraciju čimbenika spajanja vretena TPX2 na mikrotubulima.

Ovaj proces je važan jer je formiranje vretena putem Ran-GTP ovisno o daljnjim efektorskim molekulama koje djeluju kao „ karcinomski geni“ (261).

U skladu s pretpostavkama , akutna ablacija Ran-GTP u tumorskim stanicama rezultira smanjenom razinom survivina i jakim mitotoskim defektima ,osobito na nivou formiranja vretena te apoptozi neovisnoj o p53 ili Bcl2 (262).

Suprotno, ablacija Ran-GTP u normalnim stanicama nije oštetila mitozu i nije imala efekta na vijabilnost stanica (262).

Prema navedenom, barem su neke od molekularnih interakcija i puteva survivina ostvarene putem regulacijskih molekula koje su same za sebe odgovorne za nastanak ili rast karcinoma, a koje su u komparaciji sa normalnim tkivima, jako izražene u karcinomima (254). Takve signalne mreže ili nisu stvorene ili su stvorene na kvalitativno drugačiji način u normalnim tkivima na način da uključuju druge efektorske molekule. Ovo je u prilogu sa konceptom da tumorske stanice postaju ovisne o nekim putevima signaliranja(263,) iako raspon do kojeg ta ovisnosti o signalnim putevima zadržava maligni fenotip kao i uloga u preživljavanju tumorskih stanica nasuprot diferencijaciji *in vivo*, nije još izražena (264). Da li su stanice tumora ovisne o putu signaliranja survivinom nije do kraja istraženo , ali takvo objašnjenje može objasniti pojavu da antagonisti survivina imaju limitiranu toksičnost u normalnim tkivima uprkos bazičnoj ulozi u staničnoj homeostazi (254).

1.4.3. Funkcija i regulacija

Survin funkcionira kao inhibitor stanične smrti i to tijekom interfaze i tijekom diobe stanice, a ovisan je o međumolekularnom djelovanju sa drugim molekulama- kofaktorima (247). Dok XIAP inhibira kaspaze 3, 7 i 9 kroz direktne interakcije, mehanizam kojim suvivin inhibira kaspaze je manje poznat. Istraživanja su pokazala da survivin i nije direktni inhibitor kaspaza (238), za što se smatra da je glavni mehanizam IAP posredovanog očuvanja života stanica (198). Prema nekim studijama (265, 266) , survivin se veže i inhibira aktivne kaspaze 3 i 7, ali ne i kaspazu 8. S druge strane, neke studije (267) nisu uspjele dokazati interakciju survivina i kaspaze 3 . Marusawa i sur. (268) su objavili da survivin inhibira aktivnu kaspazu 9, ali ne i 3 i 7 te da je za inhibiciju kaspaze 9 potreban kofaktor. Novija

istraživanja su pokazala da izuzev XIAP molekule, većina molekula iz IAP skupine , pa tako i survivin nisu direktni fiziološki antagonisti kaspaza *in vivo* (269)

Nadalje , na modelu crva kojem je izbačen gen za survivin, nije došlo do poremećaja u staničnoj smrti već fenotipa aberantne mitoze (270). Sličnim istraživanjima otkriveno je kako je survivin neophodan za mitozu te je vezan za višestruke aspekte mitotskog aparata i nezamijenjiv u nekoliko koraka dijeljenja stanice (240),(241).

Zbog svoje kompleksne biologije survivin je postao predmetom interesa kao „karcinomski gen“ (233). Pretpostavka da je survivin uključen u proces nastanka karcinoma dolazi iz pronalaska njegove jake izraženosti u karcinomima, uključujući i onih sa niskim mitotskim indeksom, kao i tkivima tijekom razvoja, dok je izraženost u neproliferirajućem tkivu odraslih niska ili nedetektabilna (253). 1998. godine Kawasaki i sur. (271) otkrili su povezanost jake izraženosti survivina i smanjenog indeksa apoptoze u bcl-2 pozitivnom i bcl-2 negativnom kolorektalnom karcinomu, dok su Chen i sur.(272) otkrili pozitivnu korelaciju s proliferacijom stanica što navodi na zaključak o povezanosti s oba mehanizma. Nadalje, također u kolorektalnom karcinomu, pokazana je pozitivna povezanost sa stupnjem stanične displazije te gustoće mikrovaskularizacije (273, 274). Istraživanja na staničnim linijama kolorektalnog karcinoma ukazuju da produkt APC gena nishodno regulira izraženost survivina inhibicijom signaliranja preko beta- katenina i TCF molekule te da njegova mutacija dovodi do obrnutog procesa (275).

Prisutnost survivina utvrđena je također i na staničnim linijama HTLV-1 limfoma te stanicama akutne T limfocitne leukemije što ukazuje povezanost s virusima induciranom tumorigenezom (276).

Molekularni mehanizam pojačane ekspresije nije pronađen u smislu mutacije ili polimorfizma koji bi selektivno inducirali transkripciju gena za survivin u tumorskim stanicama. Gubitak tumor supresorskih gena, uglavnom p53 ili s druge strane pojačana ekspresija onkogena, na

primjer mutiranog Ras, rezultira aberantnim povećanjem promotora transkripcije (233). Premda i dalje zadržava periodičnost staničnog ciklusa, kod mitoze ovo uzrokuje snažno povećanje ekspresije survivina u interfazi stanice što može biti važno za antipoptotske mehanizme u razvijanju tumora , kao što ukazuju *in vivo* pokusi na transgeničnom mišjem modelu (277).

Pretpostavlja se da survivin obnaša višestruke funkcije jer se može vezati za druge proteine te može imati zasebnu lokalizaciju unutar različitih staničnih odjeljaka. Pretpostavlja se da ova odvojenost survivina u različitim staničnim odjeljcima predstavlja obrazac različitih nezavisno reguliranih funkcija . Postoje istraživanja koja podupiru ovu pretpostavku.

Tako se survivin može naći u jezgri stanice u interfazi. Funkcija survivina u jezgri ili njegovo prognostičko značenje nije u potpunosti razjašnjeno. Pretpostavlja se da je surivin unutar jezgre uključen u proces mitoze, dok onaj u citoplazmi, odnosno mitohondrijima ima ulogu u zaštititi stanice od apoptoze.

Nedavna istraživanja ukazuju da je nuklerana frakcija molekule imunokemijski i post translacijski jedinstvena (278), vjerojatno nema antiapoptotska svojstva (279) te je podložna transportu iz jezgre vezujući se za Crm1, efektorsku mokelulu Ran-GTP signalnog puta (260). Vezivanje ide putem sekvence unutar survivna bogate leucinom nazvane NES (od eng. Nuclear export sigmals) koja se nalazi između BIR domene i karboksi terminalnog kraja (280). Crm-1 ovisan transport survivna iz jezgre učinkovit je za monomer survivina dok se vjerojatno dimer survivina ne može učinkovito transportirati iz jezgre. (281) (282) *Splice* varijante survivina deltaEx3 i 2alfa ne posjeduju NES te se uglavnom ne nalaze u citoplazmi (283). Ovaj mehanizam prijenosa survivivna iz jezgre u citoplazmu je, čini se, od velikog značaja jer se na taj način može stvoriti velika koncentracija survivina u citoplazmi , odnosno u mitohondrijima (284). To je potvrđeno i eksperimentima gdje je jedino ova komponenta survivna mogla efikasno spriječiti apoptozu induciranu kemo i redioterapijom (260, 285).

Velika frakcija survivina u citosolu tumorske stanice je u ravnoteži sa transportnim putevima koji kontroliraju izlazak survivina iz jezgre (282) ili oslobađanjem iz mitohondrija ovisnim o stimulaciji (286).

Survivin se u većim količinama može locirati na mitotoskom aparatu tijekom diobe stanice . Ovdje dolazi do višestrukih proteinskih interakcija uključujući direktno vezivanje survivina sa polimeriziranim mikrotubulima (240),(241) . Važna funkcija survivina , a to je sudjelovanje u procesu mitoze, vjerojatno se može objasniti prisustvom u posebnom staničnom odjeljku. Ključni trenutak u procesu mitoze je i vezivanje proteina za transport kromosoma INCENP, Borealin i Aurora B za kinetohore (241) što je proces ovisan o survivinu (287),(288). Kompleks za transport kromosoma nužan je za bi-aleno spajanje kromatida i orijentaciju (289), formiranje bipolarnog vretena (290),(291), aktivaciju provjere spajanja vretena (292) i završetak citokineze (293).

Postoji nekoliko signalnih puteva i proteinskih interakcija gdje centralnu ulogu ima survivin, a koji osiguravaju pravilan učinak kompleksa za transport kromosoma.

Survivin koordinira jedinstveni strukturalni poredak kompleksa za transport kromosoma i stvaranje jedinstvene funkcionalne jedinice (281). Prvi mehanizam koji usmjerava kompleks na centromere uključuje cikličku ubikvitaciju i deubikvitaciju survivina enzimom hFAM (244). Drugi put uključuje višestruke fosforilacije sa suprotnim učincima. Tako fosforilacija survivina na Thr34 mitotskom kinazom Cdk1 stabilizira survivin u prometafazi i metafazi protiv razgradnje u proteosomima i pojačava antiapoptotski prag u stanicama koje prolaze mitozu (245). S druge strane fosforilacija survivina na Thr117 Aurora B kinazom (294) smanjuje afinitet za interakciju sa centromernim kromatinom (246, 295).

Konačno , ovi putevu uključuju interakciju survivina i Crm1 (296) što zahtijeva prisustvo leucinom bogatu nuklearnu eksportnu sekvencu (NES) survivina (297), koja se preklapa sa veznim mjestom za druge proteine transportnog kompleksa (281). Pretpostavlja se da

interakcija survivin-Crm1 također utječe na pravilno usmjeravanje kompleksa na kinetohore (298) .

Treće mjesto na kojem se survivn može locirati su mitohondriji, osobito u tumorskim stanicama (247) , nakupljajući se kako u mitohondrijskom međumembranskom prostoru(286) tako i u matriksu organele. Survin u mitohondrijima , osobito onaj smješten u međumembranskom prostoru (286), ima čini se, ulogu u inhibiciji apoptoze. Iako nema prepoznatljivu mitohondrijsku sekvencu , survin se aktivno unosi u njih (258), a mehanizam vjerojatno uključuje vezivanje za cistosolne prenosioce (257),(299) . Među prenosioce spadaju protein toplinskog šoka Hsp90, koji se vezuje na mitohondrijski Tom70 recepetorski sustav (300), te proteine koji djeluju putem Tom20 receptorskog sustava (301). Nakon ulaska u miotohondrije survivin dolazi u interakciju sa drugim pratiocem Hsp60 koji je izgleda potreban za ponovno zauzimanje prave strukture nakon prolaska kroz membranu mitohondrija (258) .Nakon ulaska u međumembranski prostor survivin se veže za propapototski mediator SMAC (302). Iako uloga ovog kompleksa nije do kraja razjašnjenna , pretpostavlja se da mitohondrijski survivn odvaja SMAC od XIAP molekule (303), ili sprječava njegovo otpuštanje iz mitohondrija (304). Nadalje, pokazalo se da različiti stimulatori stanične smrti induciraju oslobađanje survivina iz mitohondrija u citosol (286). gdje se vezuje u kompleks sa XIAP molekulom što dovodi do stabilizacije XIAP protiv razgradnje u proteasomoma i kooperativne inhibicije aktivnosti kaspaza(305) što se dovodi u vezu sa pojačanim rastom tumora *in vivo (286)*

Survivin se u reguliranju citokineze može povezati i sa još jednim proteinom iz IAP skupine nazvanim BRUCE (306), a više je članova IAP skupine nađeno u kompleksima koji mogu biti važni u inhibiciji apoptoze *in vivo* (307). Regulacija ovih vezivanja, a time i funkcije ide preko procesa fosforilacije . Tako je u slučaju survivin-XIAP kompleksa, fosforilacija protein kinazom A dovodi do smanjenog vezivanja. Fosforilacija protein kinazom A mijenja mjesto

vezivanja sa XIAP-om što dovodi do gubitka vezivanja te smanjivanja antiapoptotskog učinka i neefikasnog tumorskog rasta (247). Proces se događa u citosolu, ali ne i u mitohondrijima. Osnova ove različite subcelularne fosforilacije je nepoznata , ali može biti zbog prisustva protein fosfataze 2A unutar mitohondrija koja efikasno defosorilira protein kinazom A fosforiliran survivin na Ser20 (247).

Nedavno objavljeni rezultati studije na HeLa stanicama pokazali su da se funkcija survivina regulira i fosforilacijom putem CK2 (od eng . casein kinaze 2)

CK2 regulira mitotsku i apoptotsku funkciju survivina fosforilacijom na mjestu T48 koje se nalazi unutar BIR domene . Fosforilacija regulira unutarstaničnu lokaciju survivina tijekom interfaze te na taj način i njegovu antiapoptotsku aktivnost . Kada je prekomjerno izražen u interfazi, survivin je uglavnom u citoplazmi gdje i može obavljati funkciju zaštite stanice od apoptoze, ali uz prethodu fosoforilaciju s CK2. (308-311) te vjerojatnio čitav niz interakcija.

Vjerojatno fosforilacija T 48 posreduje vezivanje na druge proteine kao što je XIAP (305) ili sprječava vezivanje za Smac/ DIABLO(312) .

Fosforilacija survivina na T48 utječe i na povezivanje sa dijelom mitotskog aparata, molekulom borealinom. Za završetak mitoze survivin mora biti fosforiliran na poziciji T 48 kako bi zauzeo svoju homodimernu strukturu.

Trenutno dostupni podaci govore da dominantno izražavanje survivina u citoplazmi ima citoprotektivni učinak u tumorskim stanicama, dok survivin u jezgri može ukazivati na suprotno . Prema tome , moglo bi se zaključiti da postoji smanjena aktivnost survivina u smislu zaštite tumorskih stanica od apoptoze kod pacijenata oboljelih od tumora sa predominacijom nuklearnog survivina , što bi u konačnici moglo značiti dobru prognozu. Predominacija nuklearnog survivina je zaista potvrđena kao dobar prognostički čimbenik za mnoge tipove tumora , premda neka istraživanja govore suprotno (235, 236, 260). Ova razlika može biti povezana sa tipovima tumora i/ili biopsija (prije ili poslije terapije) ili sa razlikama

u kriterijima korištenima za određivanje pripadnosti jezgri ili citoplazmi. Kako se ravnoteža između citoplazmatskog i nuklearnog survivna može smatrati pokazateljem ‘‘aktivnog survivina’’ neki autori smatraju da bi bilo dobro kvantificirati ne samo apsolutnu razinu ekspresije već također i relativnu unutarstaničnu lokalizaciju(284)

Za evaluaciju i usporedbu prognostičkog značaja dinamike survivina potrebna je standardizacija imunohistokemijskih tehnika. Molekularne osnove zašto survivin u nekim tumorima zauzima pretežno mjesto u jezgri , a ne u citoplazmi i obrnuto nisu do kraja poznate te zahtijevaju daljna istraživanja.

1.4.4. *Splice* varijante

1999. godine otkrivene su četiri varijante proteina koje se dobiju alternativnim cijepanjem pre-mRNA(313). Osim survivina divljeg tipa koji je dominantni produkt transkripcije, postoje još survivin – ΔxE3 (ili DxE3), survivin -2B te survivin-3B(314). Istraživanjima na staničnim linijama i solidnim tumorima pokazano je da se varijanta survivin –ΔxE3 pretežno nalazi u jezgri, dok se varijanta survivin -2B pretežno nalazi u citoplazmi te imaju obrnute uloge progresiji tumora i/ili tomorigenezi (315-317). Neke studije ukazale su da je omjer izraženosti survivin-2B/survivin značajno veći kod karcinoma kolona, međutim taj je omjer bio povezan s boljom prognozom te je omjer ekspresije u stadiju III i IV bio manji nego u stadiju I i II (318), ukazujući na negativnu ulogu survivin-2B varijante u progresiji karcinoma. Kod pacijenata oboljelih od „non small“ karcinoma pluća visoke razine survivin-2B povezane su sa boljom prognozom dok su visoke razine survivin-ΔxE3 povezane s pacijentima koji su umrli zbog recidiva bolesti (319) .

Međutim , mehanizmi kojima survivin-2B i survivin-ΔEx3 različito utječu na razvoj karcinoma su nepoznati, dijelom i zbog toga što do kraja nije poznata njihova subcelularna lokalizacija. Mahotka i sur. (315) su inicijalno pokazali lokalizaciju survivin-2B u

citoplazmi HepG2 stanične linije. Daljnje analize potvrdile su lokalizaciju survivin-2B u mitohondrijima (320) ,međutim, moguća je varijacija unutar različitih tipova stanica. Nadalje , kada stanice krene u proces apoptoze, teško je lokalizirati ovu varijantu unutar mitohondrija, već se zbog kondenzacije stanice i stanične jezgre tijekom apoptoze survivin-2B uglavnom nalazi unutar jezgre stanice u apoptozi . Moguće objašnjenje mehanizma kojim survivin-2B inducira apoptozu je blokiranje izlaska mitohondrijskog survina u citosol neophodnog za blokiranje apoptoze inhibicijom kaspaze 9 (305).

Nekoliko nezavisnih istraživača pokazalo je lokalizaciju survivin-ΔEx3 u jezgri stanice (321-323). Međutim, Caldas i sur (323) pokazali su da dok je većina survivin-DEx3 unutar jezgre , jedan dio se nalazi u u mitohondrijima, ali ne i u citosolu. Nadalje, lokalizacija ove varijante postoji i unutar jezgrice (322) gdje se brzo razgrađuje putem ubikvitina te su sekvence potrebne za lokalizaciju unutar jezgrice potrebne i za anti apoptotsku funkciju što otvara nova pitanja i zahtijeva daljnja istraživanja.

Imunofluorescentnim mikroskopom je pokazano da se u interfazi HeLa stanica survivin-ΔEx3 nalazi i unutar mitohondrija i unutar jezgre , dok se kod stanice u mitozi survivin-ΔEx3 translocira i lokalizira uz diobeno vreteno.

Do danas su otkrivene i nove splice varijante i to survivin-DptEx2/3 koji se uglavnom nalazi unutar jezgre i kromosomske DNA što ukazuje na drugačiju funkciju ove varijante. Nadalje, nađena je i varijanta survivin-2a koja ulazi u interakcije sa survivinom i veže se za centromere(324). Konačno, varijanta survivin-3B je prvotno nađena u koštanoj srži pacijenata s mijelodisplazijom ili akutnom mijeloičnom leukemijom(325) te staničnim linijama humanog karcinoma kolona i želuca (314), a funkciju joj je potrebno dalje istražiti. Vegran i sur.(326)su izvjestili da je varijanta survivin-3B jače izražena u karcinomu dojke te je u korelaciji sa mutacijom gena p53 gene što sugerira ulogu u inhibiciji apoptoze.

1.4.5. Survivin u netumorskim tkivima

Postoje brojna istraživanja o izražavanju i ulozi survivina u tumorskim tkivima , dok je malo studija objavljeno vezano za ulogu survivina u normalnim tkivima .Iako ekspresija survivina nije nađena u većini normalnih tkiva odraslih osoba, ipak je dokazana u nekim tkivima kao što je sluznica kolona(327), placenta(328), koštana srž (329) i keratinociti bazalnog sloja kože(330) . Na mišjem modelu utvrđena je ekspresija survivina tijekom G2/M faze staničnog ciklusa tijekom regeneracje jetre, a pojačana ekspresija survivina u normalnom tkivu mišje jetre pojačava proliferaciju stanica (331). Survivin ima također ulogu u cijeljenju ozljede stijenke krvnih žila (332). Stimulacija ekspresije survivina putem PDGF u glatkim mišićnim stanicama potiče vijabilnost stanica , dok narušavanje funkcije survivina u glatkim mišićnim stanicama sprječava formiranje neointimalnog sloja arterije nakon ozljede (332). Regulacija apoptoze predstavlja važan medicinski problem jer je ključna u stanjima kao što su ishemijsko-perfuzijska ozljeda bubrega (333) i apoptoza neurona kao što je slučaj kod Alzheimerove bolesti(334).

Survivin je u malim količinama nađen i u normalnoj sluznici želuca i to uglavnom u citoplazmi žlijezdanih stanica unutarnjih regija same žlijezde, dok je razina izrazito mala ili odsutna u površinskoj mukozi gastričnih foveola(335). Nadalje, pokazano je na tkivu želuca i staničnim linijama da se razina smanjuje nakon infekcje s HP što je u skladu sa nastankom atrofije.

Daljnja istraživanja o ulozi surviivna u normalnim tkivima mogla bi donijeti uvid u ulogu apoptoze u raznim bolestima te omogućiti razvoj terapijskih strategija u liječenju ne-malignih bolesti.

Nakon spoznaja o funkcijama survivina postavljena je hipoteza da survivin pridonosi homeostazi matičnih stanica (253, 254). Naime, studije su pokazale da je survivin neophodan za očuvanje vijabilnosti hematopoetskih progenitorskih stanica (250, 336). Ovaj mehanizam

može imati direktan učinak u bolesti ljudi jer je deplecija koštane srži u mijelodisplastičnom sndromu povezana sa metilacijom i prestankom transkripcije gena za survivin te smanjenim izražavanjem survivina u hematopoetskim progenitorskim stanicama(337). Ekspresija survivina potvrđena je i u mezenhimalnim , neuronskim i kožnim progenitorskim stanicama(338-340) .

Regulacija ekspresije ide vjerojatno putem signaliranja Wnt/β-kateninom (341), koji uključuje prepoznavanje diskretnog elementa vezivanja T-staničnog čimbenika 4 (TCF-4-binding) u pomotoru survivina. Pojačana ekspresija β-katenina povećava razinu survivina i podržava survivinom posredovano održavanje staničnog ciklusa (342) .

Wnt/β-katenin ima veliku ulogu u homeostazi hematopoetskih progenitorskih stanica (343) kao i u mehanizmima preživljavanja kao što je inhibicija apoptoze uzrokovane zraženjem (344, 345).

Drugi mehanizam koji može kontrolirati ekspresiju survivina u matičnim stanicama je Stat-3 (242) koji pridonosi citoprotekciji putem survivina u različitim vrstama tumora (346); (347).

Postavlja se pitanje da li postoji sličan način reguliranja survivina u karcinomskim matičnim stanicama. Eksperimentalni modeli još nisu uspostavljeni , međutim, poznato je da jedan drugi razvojni gen u karcinomskim matičnim stanicama tzv. Notch podiže raznu survivina (348). Sličnio kao i kod signaliranja putem Wnt(342), nedavne studije pokazale su da je survivin pod direktnim transkripcijskim djelovanjem Notch ovisne ekspresije gena što uključuje prepoznavanje RPB-Jκ vezujućih mjesta na promotoru survivina (349). Notch signalni putevi često su poremećne regulacije u karcinomu (350), pridonoseći transformaciji stanice (351), ekspresiji onkogena (352), poremećaju dinamike staničnog ciklusa (353), angiogenezi (354) i poticanju anti-apoptotskih mehanizama (355). Postoje dokazi, osobito u karcinomu dojke (356)), da je ovaj put važan za održavanje karcinomskih matičnih stanica

(357),osobito u patogenezi duktalnog karcinoma i*n situ* (358) i to kod estrogen receptor (ER)-negativnih , ali ne i ER-pozitivnih tipova karcinoma (359).

Potrebna su istraživanja kako bi se definirali potencijalni putevi nastanka karcinoma koji funkcioniraju unutar matičih stanica. (253).

1.4.6. Survivin i karcinom želuca

Prisutnost survivina u stanicama karcinoma želuca po prvi je put na razini proteina pokazana 1998. godine (360), korištenjem poliklonskih protutijela te na razini mRNA 2000. godine (361). Izraženost survivina u metastatskim limfnim čvorovima do danas nije istraženo. Prema nekim istraživanjima, u nekoliko tipova tumora ,visoka razina ekspresije survivina u karcinomu u korelaciji je s agresivnijom biologijom tumora(362). Kao prognostički čimbenik izraženost survivina je značajno povezana sa lošim kliničkim ishodom u karcinomu jetre (363), kolorektuma(364), dojke(365), pluća(366) i jednjaka (367).

Do danas je objavljeno nekoliko istraživanja o povezanosti survivina i karcinoma želuca, međutim s oprečnim rezultatima vezano za razinu izraženosti (360, 368),(361, 369) i povezanosti s kliničkopatološkim obilježjima (370, 371).

Ranije studije na karcinomu želuca imunohistokemijskom ili RNA analizom su pokazale stopu izraženosti između 34.5% i 82.0%(370, 372). Iako postoje iznimke (373), većina autora navodi da je izražavanje survivina u korelaciji sa slabijim preživljenjem pacijenata te da pridonosi kemorezistenciji karcinoma želuca (374).

Jedan od prvih radova (372) korištenjem RT PCR -a pokazao je ekspresiju survivina u 68% slučajeva karcinoma želuca kao i u , doduše manjem postotku (27%) želučane sluznice rođaka iz prvog koljena oboljelog. Nadalje, ekspresija survivina nađena je i u 22% nekanceroznog tkiva smještenog uz tumor, ali nije zabilježena u normalnoj , udaljenoj

sluznici želuca . Nije nađena korelacija s niti jednim standardnim kliničkopatološkim obilježjem.

Nedavno je objavljeno nekoliko studija koje se bave ovom problematikom. Tako su 2009. Song i sur. (375) koristeći se poliklonskim protutijelima i imunohistokemijskim obilježavanjem pokazali na tkivima karcinoma želuca pacijenata u III stadiju bolesti prisutnost survivina samo u karcinomskim stanicama i to pretežno u jezgri, dok su u uzorcima normalne sluznice samo zametne stanice smještene u vratu žlijezda pokazivale pozitivnost. Međutim, autori su u ovom radu pokazali pozitivnost samo 40,1 % uzoraka karcinoma želuca, uzimajući u obzir da su pozitivnim uzorcima označavali samo ukoliko je više od 10% stanica izražavalo survivin. Jedino su za veličinu tumora uspjeli dokazati značajnu povezanost sa razinom izraženosti, dok nije bilo povezanosti s drugim kliničkopatološkim obilježjima. Preživljenje pacijenata sa pozitivnom izraženošću survivina bilo je statistički značajno kraće od onih svrstanih u survivin negativnu skupinu što survivin čini lošim nezavisnim prognostičkim čimbenikom(375)

Nedavno istraživanje, također iz 2009. pokazalo je na razini mRNA za survivin izoliranog iz ukupnih mononuklearnih stanica periferne krvi pacijenata oboljelih od karcinoma želuca ekspresiju kod gotovo svih pacijenta , pozitivnu korelaciju sa prva tri stadija bolesti, povezanost te značaj razine mRNA za survivin kao lošeg prognostičkog čimbenika. Slično istraživanje pokazalo je da je razina survivina u cirkulirajućim karcinomskim stanicama nezavisan predskazatelj recidiva. (376)

Zanimljivo je i istraživanje u kojem su autori imunohistokemijskim obilježavanjem poliklonskim zečjim protutijelima određivali razinu izraženosti u karcinomu i prekarcinomskim lezijama sluznice. Ovdje su pak za pozitivne smatrani oni uzorci koji su imali vidljivo bojanje na najmanje 5 % stanica. (377) Stopa pozitivnih stanica kod intestinalne metaplazije iznosila je 53.4%, displazije 59.4% te karcinoma želuca 65.3%, što je bilo

značajno više od stope izraženosti u normalnoj sluznici želuca od 11.2%, P< 0.01. Razina izraženosti se postepeno povećavala od dobro diferenciranog adenokarcinoma (41.7%), preko umjereno diferenciranog adenocarcinoma (58.3%) do slabo diferenciranog adenocarcinoma (75.6%) sa značajnom korelacijom , *r*k = 0.279, *P* < 0.01. Nadalje, od kliničkopatoloških obilježja, izraženost u difuznom tipu (74.6%) bila je značajno veća nego ona u intestinalnom tipu (51.3%). Također, kod karcinoma sa metastazama u limfnim čvorovima, 76.9% je bilo pozitivno na survivin dok je kod onih bez metastaza bilo 41.2%, *P* < 0.01. Slično, Xiao i sur (377, 378) su našli da su stope pozitiviteta ekspresije survivina kod tumora sa metastazama (kod metastaza u limfne čvorove 86.2%, kod jetrenih i ovarijalnih metasatza 100%) značajno veće nego u tumora bez metastaza (64.3%).

Povezanost je nađena i RT-PCR-om stanica u peritonealnoj tekućini pacijenata oboljelih od karcinoma, a razina izraženosti značajno je korelirala sa dubinom invazije karcinoma, metastazama u limfne čvorove i TNM Rezultati su pokazali da je 98% klinički evidentnih peritonealnih metastaza pokazalo ekspresiju survivina (379)

Nekoliko studija pokazalo je da VEGF inducira ekspresiju survivina na endotelnim stanicama tijekom remodeliranja i angiogeneze (380-382), a na životinjskom modelu je pokazano da survivin potiče angiogenezu (383). Međutum, Lee i sur. nisu uspjeli na tkivu karcinoma želuca dokazati povezanost izraženosti VEGF i survivina, ali su dokazali povezanost veće izraženosti survivina sa većom razinom mikrovaskularne gustoće. Nadalje, pokazali su izraženost survivina u samo 50% uzoraka tkiva ,a razina je bila u značajanoj korelaciji sa veličinom tumora, dubinom invazije, metastazama u limfne čvorove, stadijem tumora i lošijim preživljenjem(371)

Deng i sur. našli su survivin također u oko 50% uzoraka tkiva te pozitivnu korelaciju sa metastazama u limfne čvorove i dobrom diferencijacijom tumora. Nisu našli korelaciju sa preživljenjem (384). Što se tiče diferenciranosti tumora i survivina Li i suradnici dobili su

obrnute rezultate, dok su imali 76% pozitivnih uzoraka te pozitivnu korelaciju s TNM stadijem (385).

Povezanost izraženosti survivina i klasifikacije po Laurenu nađena je i u istraživanju na uzorcima karcinom želuca od kojih je imunohistokemijski 48,2% označeno kao pozitivno na survivin. Treba naglasiti da su autori uzimali kao parametar pozitivnosti uzorke koji su imali više od 30% pozitivnih stanica. U ovom istraživanju nađena je, za razliku od ranije navedenog , značajno veća stopa izraženosti survivina kod intestinalnog tipa u odnosu na difuzni . Nije pokazana povezanost sa ostalim kliničkopatološkim obilježjima.(368) Slične rezultate dobili su i autori u jednom od prvih radova vezanih za ovu problematiku(370)

O izraženosti survivina unutar pojedinih staničnih odjeljaka u stanicama karcinoma želuca postoji mali broj radova . Imunofluorescentnim obilježavanjem Okada i sur. pokazali su prisustvo survivina u jezgri u 82% slučajeva, a citoplazmatskog u 88 % slučajeva što govori u prilog velikog broja uzoraka koji su imali istovremenu izraženost survivina u oba stanična odjeljka. Gledano odvojeno, survivin koji se nalazi u jezgri povezan je sa manjom incidencijom vaskularne invazije, slabijom diferencijacijom te boljim preživljenjem , dok citoplazmatska lokalizacija survivina nije pokazala povezanost sa preživljenjem niti kliničkopatološkim parametrima(373).

Kod karcinoma želuca povezanog s EBV javlja se jača izraženost survivina u tkivu karcinoma u odnosu na izraženot u karcinomu koji nije vezan za EBV(386) Isti autori navode pretežnu izraženost survivina u citoplazmi stanica te jednaku izraženost kod oba tipa karcinoma prema Laurenovoj podjeli kod EBV varijante, dok kod EBV negativnog karcinoma želuca postoji slabija izraženost survivina u difuznom tipu.

O povezanosti karcinoma želuca i survivina govore i istraživanja u kojima je blokiranjem prepisivanja gena za survivin na staničnim linijama karcinoma želuca došlo do inhibicije njihova rasta .

Danas postoje istraživanja sa velikim rasponom izraženosti survivina kao i velikim razlikama u povezanosti sa kliničkopatološkim obilježjima gdje pojedina istraživanja nalaze korelaciju s jednim, dok druga istraživanja nalaze koreaciju s drugim obilježjima, iako većina govore u smislu lošije kliničke slike , međutim i tu postoje kontradikcije.

Pristnost pojedinih *splice* varijanti survivina također je istraživana i u karcinomu želuca. Tako su Meng i sur na uzorcima tumora i susjedne morfološki zdrave mukoze RT PCR-om pokazali prisutnost divljeg tipa u 100% uzoraka karcinoma , survivin-2b varijante u 78.5% te survivinDx3 kod 64% uzoraka . S druge strane, u morfološki zdravoj sluznici zabilježeni su postoci od 58%, 29.1% te 15.2 % za divlji tip, odnosno varijantu 2b i Dx3(387)

Uspoređujući kliničkopatološke parametre i ekspresiju pojedinih varijanti survivina dobili su značajno manju izražavanost survivin-2b kod III i IV stadija bolesti u odnosu na I i II te negativnu korelacija sa dubinom invazije tumora i stupnjem diferencijacije. Nije nađena povezanost drugih varijanti survivina sa kliničkpatološkim obilježjima tumora što je bilo u skladu s ranijim istraživanjima (388, 389). S druge strane nađena je jedino korelacija divljeg tipa sa preživljenjem u smislu lošeg prognostičkog čimbenika (387).

O izražavanju survivina u metastatskim limfnim čvorovima postoji tek nekoliko radova.

Wang i sur su 2004. godine objavili rad u kojem su uz pomoć RT PCR-a analizirali izraženost survivina u karcinomskim stanicama primarnog tumora iz 30 uzoraka, morfološki normalne sluznice na 10 cm od tumora te metastatskim limfnim čvorovima, dobivenima laserskom mikrodisekcijom. 80 % uzoraka primarnog tumora pokazivalo je izraženost survivina, 23% uzoraka morfološki normalne stanice te 95% uzoraka iz mestastkih limfnih čvorova. Nema podataka o količini survivina unatar pojedinih skupina, a zanimljivo je da nije nađena korelacija s niti jednim kliničkopatološkim parametrom.(390)

2. HIPOTEZA

Pretpostavka ovog istraživanja je da u tkivu primarnog tumora kao i u metastatskim limfnim čvorovima pacijenata oboljelih od karcinoma želuca postoji pojačana izraženost survivina te da je razina izraženosti povezana s kliničkom slikom oboljelih te patohistološkim obilježjima tumora.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je odrediti razinu izraženosti survivina u tkivu karcinoma želuca, kako u primarnom tumoru, tako i u metastatskim limfnim čvorovima te istražiti povezanost izraženosti s kliničkom slikom oboljelih te patohistološkim karakteristikama tumora.

4. MATERIJALI, METODE I PLAN ISTRAŽIVANJA

4.1 Materijali:

1. Uzorci tkiva primarnog adenokarcinoma želuca, metastatskih limnih čvorova te histološki normalne sluznice želuca fiksirani u 10 % puferiranom formalinu te uklopljeni u parafin, korišteni u ovom istraživanju dobiveni su iz arhive Kliničkog odjela za patologiju KB Dubrava.

   Studija je obuhvatila 114 uzastopnih pacijenta operiranih u KB Dubrava zbog histološki verificiranog adenokarcinoma želuca u razdoblju od 1994. do 2001. godine za koje postoje potpuni klinički i histološki podaci te podaci o preživljenju. U studiji su analizirana tkiva primarnog karcinoma želuca bolesnika sa i bez metastaza u regionalne limfne čvorove uz istovremeno određivanje izraženosti survivina i u metastazama.

   Nadalje, analizirana su tkiva stjenke želuca od 20 pacijenata operiranih u istom razdoblju radi neke druge bolesti ili stanja , a čiji su uzorci tkiva želuca dobiveni operacijskim zahvatom. U ovoj skupini patohistološkim pregledom nađena je isključivo normalna morfologija želučane sluznice.

   Uzorci tkiva identificirani su prema jedinstvenom broju biopsije iz otpusne patohistološke dijagnoze. Nakon identifikacije provjerena je tehnička ispravnost tkiva uklopljenog u parafin.

2. Kemikalije za imunohistološko obilježavanje uključujući standardizirani komplet kemikalija za imunohistološko bojanje (LSAB kit, DAKO, kat.br. K0690), 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromogen (DAKO, kat.br.: 3465), mišje monoklonsko protutijelo na protein humanog survivina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, kat.br.: sc-17779) te kontrolno nespecifično protutijelo istog izotipa kao i primarno (mišji IgG2a, DAKO, kat.br.:X0943).

3. Silanizirana predmetna stakalca.
4. Podaci o kliničkim manifestacijama tumora dobiveni su iz postojeće medicinske dokumentacije iz arhive Kliničke bolnice Dubrava.
5. Ukupno preživljenje bolesnika određeno je na osnovu podataka iz Registra za rak Republike Hrvatske. (391-393)

4.2. METODE

4.2.1. Patohistološka analiza

Uzorci tkiva uklopljenih u parafin izrezani su mikrotomom na debljinu od 4 mikrometra te su potom obojani standardnom metodom hemalaun-eozin. Na tako dobivenim preparatima određena je patohistološka dijagnoza te prognostički pokazatelji karcinoma želuca. Ispitivanim uzorcima tkiva primarnog tumora specijalist patolog je odredio histološki tip prema Laurenovoj klasifikaciji (intestinalni, difuzni i mješani), diferenciranost (slabo, srednje, dobro diferencirani tumori i nediferencirani) , mucinoznu komponentu (bez mucina, manje od 50% mucinoznih stanica, više od 50% mucinoznih stanica) te postojanje vaskularne, perineuralne i limfatičke infiltracije. Kod uzoraka tkiva limfnog čvora ispitao je prisutnost metastatskih tumorskih stanica. Ukoliko se radilo o pozitivnom limfnom čvoru, iz istog uzorka tkiva napravljeni su dodatni rezovi za imunohistokemijsko obilježavanje survivina.

4.2.2. Imunohistokemijsko obilježavanje survivina u uzorcima tkiva

Nakon patohistološke analize, dodatni razovi uzoraka tkiva (primarnog karcinoma i pozitivnog limfnog čvora) zalijepljeni su na silanizirana predmetna stakalca, osušeni na zraku te pohranjeni na $+4^{o}C$ do imunohistokemijskog obilježavanja. Pripremljeni preparati su deparafinizirani uranjanjem u otopine ksilola i gradirane otopine etanola nakon čega su zagrijavani u mikrovalnoj pećnici u citratnom puferu kako bi se otkrili denaturirani antigeni.

Uslijedilo je blokiranje endogene peroksidaze inkubiranjem rezova s 3% otopinom vodikovog peroksida (H_2O_2). Nakon svake inkubacije u daljnjem postupku preparati su ispirani uranjanjem u otopinu PBS –a 3 puta u trajanju od 5 minuta . Nakon blokiranja endogene peroksidaze blokirano je nespecifično vezanje inkubacijom u 5 % otopini serumskih proteina humanog porijekla. Preparati su potom inkubirani s primarnim mišjim monoklonskim protutijelima na molekulu survivina (mišja protu humana protutijela) u razrijeđenju 1:500 kroz 60 minuta. Nakon ispiranja, inkubirani su sa sekundarnim protutijelom vezanim s biotinom prema naputku proizvođača standardnog seta (LSAB kit, DAKO, kat.br. K0690). Sekundarna protutijela se pritom vežu na Fc fragment primarnih protutijela. Potom su preparati inkubirani sa streptavidin peroksidazom pri čemu dolazi do specifičnog vezivanja biotina i streptavidina. Reakcija je vizualizirana inkubacijom s DAB kromogenom koji je supstrat za enzim peroksidazu. Pri reakciji dolazi do taloženja kromogena smeđe boje u stanici na kojoj se nalazi obilježavani antigen, u ovom slučaju survivina.

Kao negativne kontrole metode korišten je isti postupak pri čemu je izostavljeno primarno protutijelo ili je umjesto njega korišteno nespecifično protutijelo istog izotipa kao i primarno, u istoj koncentraciji.

Potom su preparati obojati s hemalaunom i eozinom kako bi se bolje vizualizirale stanične strukture.

4.2.3. Određivanje izraženosti survivina u tkivu

Analiza je učinjena svjetlosnim mikroskopom te je za svaki uzorak učinjeno 15 mikrofotografija različitih vidnih polja na povećanju mikroskopa 400x. Izraženost survivina kvantificirana je određivanjem broja pozitivnih kromogenom obilježenih tumorskih stanica na ukupno 1000 tumorskih stanica te je izračunat postotak pozitivnih tumorskih stanica (368,

394-396). Određivan je i ukupni intenzitet bojanja koji je klasificiran u tri grupe (+,++, +++). Intenzitet bojanja indirektno je mjerilo relativnog broja molekula unutar ispitivanog tkiva.

Ovu analizu obavljali su dva neovisna ispitivača, a kao vrijednost postotka obilježenih tumorskih stanica i intenziteta bojanja korištena je srednja dobivena vrijednost uz prethodnu analizu podudarnosti koja je bila značajna (Pearson's r =0.683, $P<0.05$) Rezultati su razvrstani s obzirom na postotak pozitivnih stanica u tri (0 - 33,33%, 33,34 - 66,66% i 66,67 - 100%) , odnosno dvije (veće i manje od medijana) skupine te na osnovi intenziteta bojanja u tri grupe (slaba, srednja i jaka izraženost) (368).

4.2.4. Analiza podataka iz medicinske dokumentacije

Pacijenti su identificirani putem operacijskih protokola Klinike za kirurgiju KB Dubrava. Uzeti su u obzir pacijenti sa dijagnozama tumora ili karcinoma želuca i resekcijskim zahvatima na želucu. Potom su putem matičnih brojeva identificirane povijesti bolesti koje su preuzete iz arhive KB Dubrava. Iz povijesti bolesti dobiveni su podaci o dobi, spolu, lokalizaciji tumora u želucu, broju zahvaćenih limfnih čvorova metastazama, metastazama u drugim organima, te drugim kliničkim parametrima. Iz patohistološkog nalaza dobiven je jedinstveni broj biopsije pomoću kojeg su identificrani uzorci u parafin uklopljenog tkiva u arhivi Kliničkog odjela za Patologiju KB Dubrava. Pacijenti iz skupine kojima uputna dijagnoza nije vezana za patologiju želuca, a čiji operacijski zahvat je obuhvaćao i resekciju želuca uzeti su u obzir za kontrolnu skupinu. Identitet pacijenata tijekom istraživanja bio je poznat samo istraživačima, nije bio korišten na bilo koji drugi način osim prilikom primarne identifikacije od kada su umjesto identiteta korišteni identifikacijski brojevi. Povijesti bolesti vraćene su u arhivu. Podaci o ukupnom preživljenju dobiveni su iz Registra za rak Republike Hrvatske.

4.2.1. Statistička analiza

Statistička obrada i analiza podataka napravljena je koristeći se kompjuterskim programom *Statistica 7.0* (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) na Windows 7 platformi.

U statističkoj obradi dobivenih rezultata korištene su prikladne metode deskriptivne statistike (medijan, raspon, najveća i najmanja vrijednost), a razlike između pojedinih grupa testirane su i protumačene kao značajne sa $p < 0,05$ koristeći se neparametrijskim testovima (Friedman ANOVA, Mann-Whitney U Test, Wilcoxon Matched Pairs Test te Spearman Rank) već prema prikladnosti te analiza krivulja preživljenja (Kaplan-Meier-ove krivulje i Cox-ova regresijska analiza) radi procjene neovisnog prognostičkog čimbenika preživljenja.

4.3. Plan istraživanja

1. Identifikacija pacijenta i provjera postojanja potrebnih kliničkih, patoloških i podataka o preživljenju te uzoraka tkiva primarnog tumora i eventualno metastatskih limfnih čvorova. Postupkom je uključeno ukupno 114 pacijenata oboljelih od karcinoma te 20 kontrolnih pacijenta.
2. Unošenje podataka iz povijesti bolesti u bazu podataka
3. Određivanje histoloških obilježja primarnog tumora .
4. Određivanje razine izraženosti survivina u tkivu primarnog tumora, tkivu metastatskog tumora u limfnom čvoru te zdravoj sluznici imunohistokemijskim obilježavanjem te određivanjem postotka i intenziteta bojanja stanica.
5. Analiza povezanosti izraženosti survivina u tkivu primarnog tumora i tkivu metastatskog tumora u limfnim čvorovima.
6. Analiza povezanosti izraženosti survivina u tkivu primarnog tumora i tkivu metastatskog tumora u limfnim čvorovima s kliničkim i histološkim obilježjima

primarnog tumora te preživljenjem pacijenata uz određivanje vrijednosti survivina kao prognostičkog čimbenika karcinoma želuca.

5. REZULTATI

5.1. Deskriptivna statistika bolesnika oboljelih od karcinoma želuca

U studiji su analizirani uzorci tkiva i podaci od 114 pacijenata oboljelih od karcinoma želuca (ispitivana skupina) te uzorci tkiva 20 pacijenata koji nisu oboljeli od karcinoma želuca (kontrolna skupina). U ispitivanoj skupini nalazilo se 64 muškarca te 50 žena dok je u kontrolnoj skupini bilo 11 muškaraca i 9 žena (Tablica 3).

	ispitivana skupina		kontrolna skupina	
	N	%	N	%
muško	64	56.14	11	55
žensko	50	43.86	9	45
ukupno	114	100	20	100

Tablica 3. Prikaz raspodjele prema spolu ispitivane i kontrolne skupine

Medijan dobi pacijenata ispitivane skupine bio je 66 godina, srednja vrijednost 61,95 sa rasponom od 25 do 76 godina. Medijan dobi pacijenata kontrolne skupine bio je 62 godine, srednja vrijednost 64,28 sa rasponom od 32 do 79 godina (Tablica 4).

	ispitivana skupina	kontrolna skupina
medijan	66	62
srednja vrijednost	61,95	64,28
minimalna vrijednost	25	32
maksimalna vrijednost	76	79
standardna devijacija	12	10,6
ukupan broj	114	20

Tablica 4. Prikaz raspodjele prema dobi ispitivane i kontrolne skupine

Najčešća lokalizacija tumora unutar ispitivane skupine bila je u distalnoj trećini želuca odnosno u antrumu kod 29 pacijenta, u antropiloričnom području kod 26 pacijenata te na samom pilorusu kod jednog pacijenta. Slijedi srednja trećina želuca, odnosno korpus kod 32 pacijenta. U ispitivanoj skupini bilo je ukupno 6 slučajeva karcinoma proksimalne trećine želuca i to 4 na kardiji želuca te 2 u fundusu želuca. Preklapajući tumor dijagnosticiran je kod 6 pacijenata , *linitis plastica* kod 3 pacijenta , a kod 8 pacijenta nije bila specificirana lokalizacija tumora. Kod 3 pacijenta radilo se o karcinomu bataljka želuca nakon ranije resekcije zbog ulkusne bolesti. U analizama povezanosti izraženosti survivina te preživljenja sa lokalizacijom tumora koristila se i podjela na prokismalnu, srednju i distalnu trećinu želuca (Tablica 5).

	broj	udio u %	
kardija	4	3,5	**proksimalna trećina**
fundus	2	1,75	
korpus	32	28,07	**srednja trećina**
antrum	29	25,44	**distalna trećina**
antropilorično	26	22,81	
pilorus	1	0,88	
nespecificirano	8	7,02	
preklapajući tumor	6	5,26	
linitis plastica	3	2,63	
bataljak želuca	3	2,63	

Tablica 5. Prikaz raspodjele lokalizacije primarnog tumora.

Najčešći operacijski zahvat bila je gastrektomija i to u 38 slučajeva, potom subtotalna resekcija u 37 slučajeva , dvotrećinska resekcija po tipu Billroth II u 25 te trećinska resekcija želuca po tipu Bilroth I u 14 slučajeva (Tablica 6).

	broj	udio u %
gastrektomija	38	33,33
resekcija 2/3 (Billroth II)	25	21,93
resekcija 1/3 (Billroth I)	14	12,28
subtotalna resekcija	37	32,46

Tablica 6. Prikaz raspodjele pacijenata ispitivane skupine prema tipu operacijskog zahvata.

U ispitivanoj skupini za jednog pacijenta nije bilo adekvatne procjene lokalne uznapredovalosti tumora prema TNM klasifikaciji (Tx) , dok je za 6 pacijenata utvrđen T1 stadij uznapredovalosti , za 43 pacijenta T2, za 34 pacijenta T3 te za 30 pacijenata T4 stadij(Tablica 7).

Za 8 pacijenta nije bilo adekvatne procjene proširenosti karcinoma u limfne čvorova (Nx), dok je za 44 pacijenta utvrđen N0 stadij, za 36 pacijenta N1 stadij, za 15 pacijenta N2 stadij te za 9 pacijenta N3 stadij(Tablica 7). Za 8 pacijenta nije bilo adekvatno utvrđeno postojanje udaljenih metastaza (Mx) slikovnim metodama ili eksploracijom trbuha tijekom operacije, dok je za 9 pacijenta potvrđeno postojanje istih. Najveći dio pacijenta, odnosno 97, u trenutku operacijskog zahvata nije imalo detektabilnih metastaza (Tablica 7).

	broj	udio u %
Tx	1	0,88
T1	6	5,26
T2	43	37,71
T3	34	29,82
T4	30	26,32
Nx	8	7,02
N0	44	38,60
N1	36	31,58
N2	16	14,04
N3	10	8,77
Mx	8	7,02
M0	97	85,09
M1	9	7,89

Tablica 7. Prikaz raspodjele uznapredovalosti karcinoma prema TNM sustavu

Patohistološkom analizom utvrđen je adenokarcinom bez mucina kod 59 pacijenata, adenokarcinom sa manje od 50% mucinoznog dijela kod 34 pacijenta, adenokarcinom sa više od 50 % mucinoznog dijela kod 18 pacijenta te karcinom stanica pečatnjaka kod 3 pacijenta (Tablica 8).

	broj	udio u %
Adenokarcinom - bez mucina	59	51,75
Adenokarcinom - manje od 50% mucinoznog dijela	34	29,82
Adenokarcinom - više od 50% mucinoznog dijela	18	15,79
Karcinom stanica pečatnjaka	3	2,63

Tablica 8. Prikaz raspodjele bolesnika obzirom na mucinoznu komponentu tumora.

Analizom stupnja histološke diferenciranosti kod ispitivane skupine nađeno je u 37 slučajeva dobra diferenciranost tumora, u 20 slučajeva umjerena diferenciranost tumora, u 41 slučaju slaba diferenciranost tumora te u 16 slučajeva nediferencirani karcinom želuca (Tablica 9).

	broj	udio u %
G1 - dobro diferencirani	37	32,46
G2 - umjereno diferencirani	20	17,54
G3 - slabo diferencirani	41	35,96
nediferencirani	16	14,04

Tablica 9. Prikaz raspodjele bolesnika obzirom na diferenciranost tumora.

Analizom klasifikacije prema Laurenu utvrđen je difuzni tip tumora kod 44 pacijenta, intestinalni tip tumora kod 54 pacijenta te mješani tip kod 16 pacijenata (Tablica 10).

tip	broj	udio u %
difuzni	44	38,60
mješani	16	14,04
intestinalni	54	47,37

Tablica 10. Prikaz raspodjele bolesnika obzirom na klasifikaciju karcinoma želuca prema Laurenu.

Infiltracija tumora u krvne žile utvrđena je kod 18 pacijenta, perineuralna infiltracija također kod 18 pacijenta, dok je infiltracija u limfne žile utvrđena kod 44 pacijenta (Tablica 11).

	VASKULARNA		LIMFATIČKA		PERINEURALNA	
	broj	udio u %	broj	udio u %	broj	udio u %
DA	18	15,79	44	38,60	18	15,79
NE	96	84,21	70	61,40	96	84,21

Tablica 11. Prikaz raspodjele bolesnika obzirom na vaskularnu, limfatičku i perineuralnu infiltraciju .

Kod 102 pacijenta učinjena je resekcija želuca ili gastrektomija kod koje mikroskopskim pregledom resekcijskog ruba nije nađeno karcinomskih stanica (R0 resekcija), dok su kod 12 pacijenata nađeni mikroskopski pozitivni rubovi (R1 resekcija) (Tablica 12).

	broj	udio u %
R0 resekcija	102	89,47
R1 resekcija	12	10,53

Tablica 12. Prikaz raspodjele bolesnika obzirom na radikalitet operacijskog zahvata.

5.2. Izraženost survivna u ispitivanim tkivima

U uzorcima zdrave sluznice postotak stanica koje su izražavale survivin kretao se od 0 do 3,8 % , s tim da od 20 uzoraka , 7 uopće nije izražavalo survivin , a svi uzorci , osim jednog koji je imao bojanje intenziteta 2, imali su intenzitet 1+. (Tablica 13) (Slika 1)

U uzorcima tkiva primarnog tumora, 2 preparata nisu izražavala survivin, dok je 112 izražavalo survivin (98,24%) sa rasponom vrijednosti od 4,71 do 97,14 % , aritmetičkom sredinom postotka pozitivnih stanica od 62, 68 i medijanom od 66,60%. Srednja vrijednost intenziteta iznosila je 2,02 (Tablica 13). (Slika 2, Slika 3)

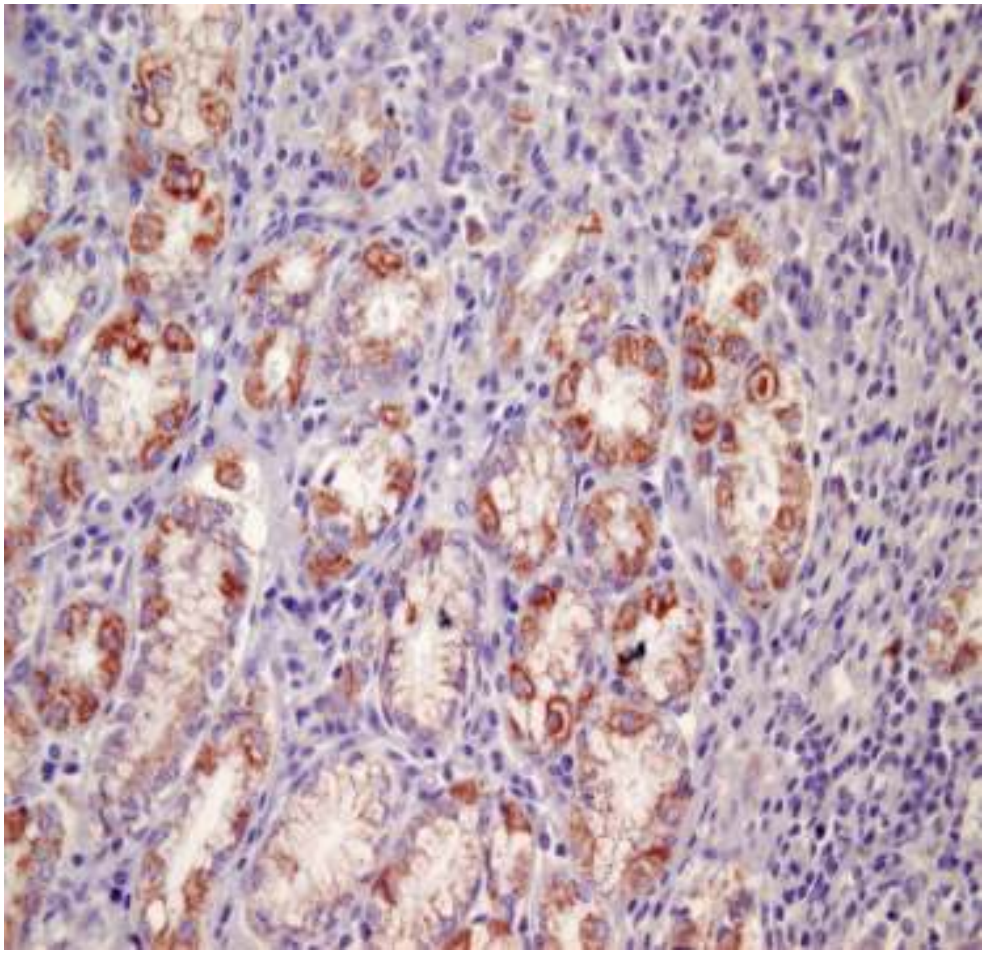
Analiza izraženosti survivina u limfnim čvorovima obuhvatila je ukupno 38 preparata koji su na prikladan način mogli biti dobiveni iz parafinskih blokova, iako je ukupno bilo 60 pacijenta sa pozitivnim limfnim čvorovima. U uzorcima tkiva metastatskog tumora u limfnim čvorovima svi su preparati pokazivali izraženost survivina, sa rasponom vrijednosti od 0,5 do 95.76 % , aritmetičkom sredinom postotka pozitivnih stanica od 50,72 i medijanom od 57,97%. Srednja vrijednost intenziteta iznosila je.1,37 (Tablica 13) (Slika 4).

uzorak		broj	srednja vrijednost	medijan	Min	Max	Std.Dev
tumor	%	112	62,68	66,60	4,71	97,14	27,49
	1-3	112	2,02	2,00	1,00	3,00	0,82
limfni čvorovi	%	38	50,72	57,97	0,50	95,76	35,70
	1-3	38	1,37	1,00	1,00	3,00	0,75
kontrola	%	20	1,22	1,1	0	3,8	1,15
	1-3	20	0,7	1	1	2	0,088

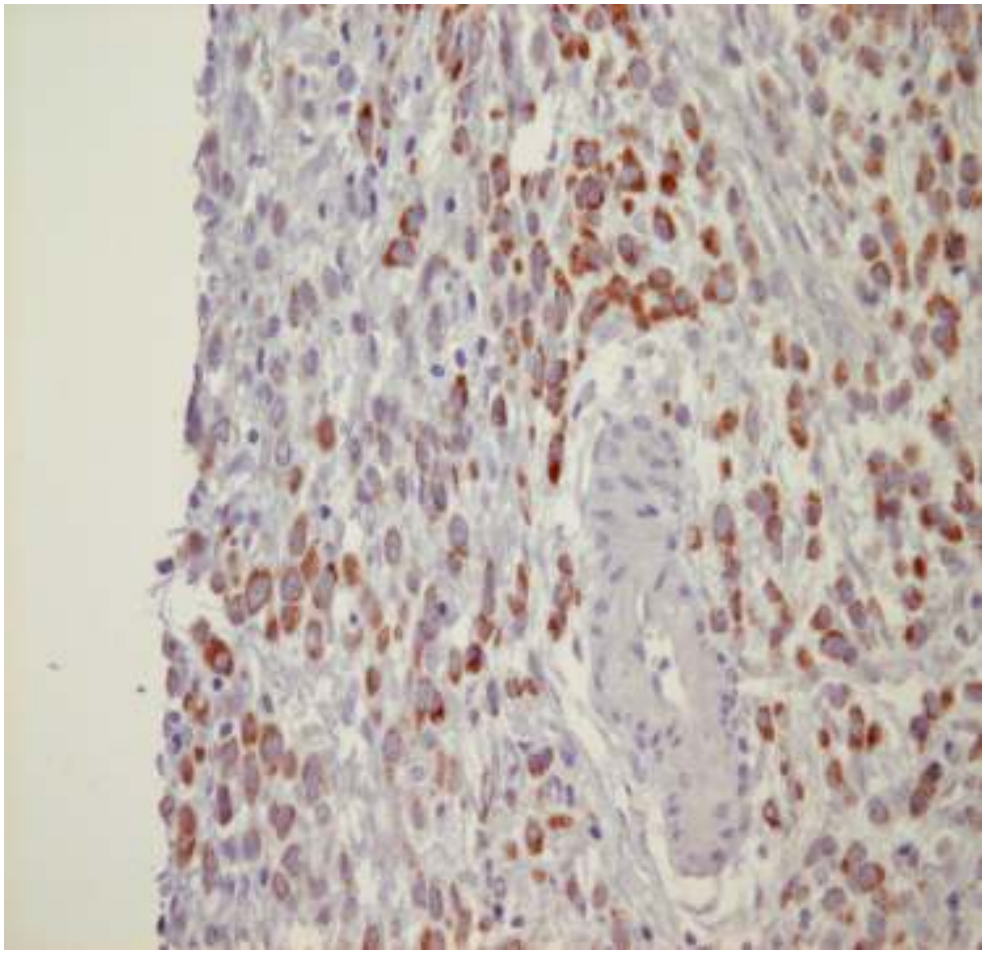
Tablica 13. Prikaz raspodjele postotka stanica pozitivnih na survivin te intenziteta bojanja u tkivu primarnog tumora, metastatskim limfnim čvorovima i kontrolnim uzorcima tkiva želuca.



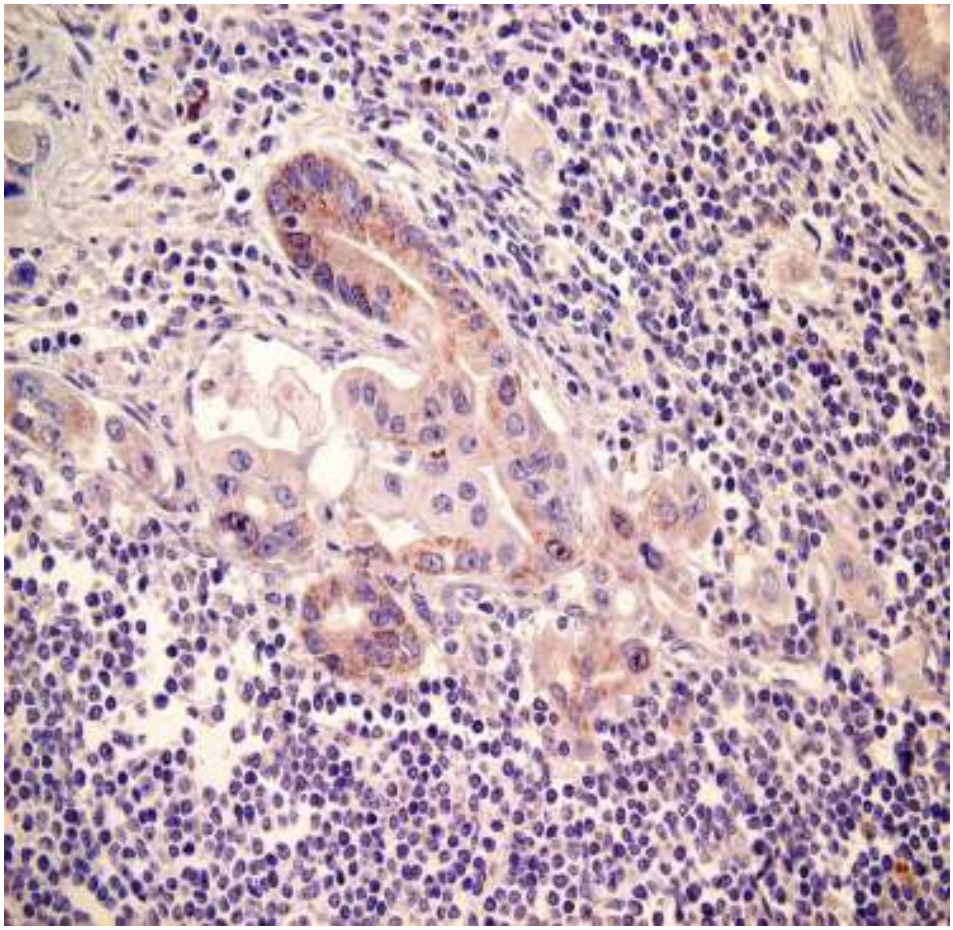
Slika 1. Prikaz imunohistokemijskog obilježavanja survivina u normalnoj sluznici želuca



Slika 2. Prikaz imunohistokemijskog obilježavanja survivina u tkivu karcinoma želuca intestinalnog tipa po Laurenu



Slika 3. Prikaz imunohistokemijskog obilježavanja survivina u tkivu karcinoma želuca difuznog tipa po Laurenu.



Slika 4. Prikaz imunohistokemijskog obilježavanja survivina u tkivu metastatskog limfnog čvora.

Rezultati su grupirani u skupine i to za postotke od 0-33%, od 33,34 do 66,66 % te od 66,67 do 100%, a za intenzitet od 1-3.(Tablica 14).

SURVIVIN U TUMORU			
%	0 - 33,33%	33,34 - 66,66%	66,67 - 100%
N=112	20	36	56
N=100%	17,86	32,14	50,00
intenzitet	1	2	3
N=112	36	38	38
N=100%	32,14	33,93	33,93

SURVIVIN U LIMFNIM ČVOROVIMA			
%	0 - 33,33%	33,34 - 66,66%	66,67 - 100%
N=38	16	4	18
N=100%	42,11	10,53	47,37
intenzitet	1	2	3
N=38	30	2	6
N=100%	78,95	5,26	15,79

Tablica 14. Prikaz raspodjele postotaka pozitivnih stanica i intenziteta bojanja u primarnim tumorima i metastatskim limfnim čvorovima .

5.3. Usporedba izraženosti survivina u tkivima primarnog tumora i metastatskim limfnim čvorovima

Usporedbom postotka tumorskih stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin i intenziteta bojanja survivina u njima, korištenjem Friedman ANOVA i Mann-Whitney U testa, nađena je statistički značaja pozitivna korelacija tj. u uzorcima tkiva sa većim postotkom stanica pozitivnih na survivin postoji i jači intenzitet bojanja, odnosno izraženost survivina (Tablica 15).

Friedman ANOVA and Kendall Coeff. of Concordance ; ANOVA Chi Sqr. (N = 112, df = 2) = 209,1881 p =0,00000; Coeff. of Concordance = ,93388 Aver. rank r = ,93328				
	Average Rank	Sum of Ranks	Mean	Std.Dev.
%	3,00000	336,0000	62,67732	27,48623
intenzitet 1-3	1,196429	134,0000	2,01786	0,81630

Mann-Whitney U Test								
	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2
% - int 1-3	942,0000	1833,000	276,0000	-4,41242	0,000010	0,000010	36	38

Tablica 15. Prikaz usporedbe postotka i intenziteta bojanja stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin

Usporedbom postotka tumorskih stanica u metastatskom limfnom čvoru koje pokazuju izraženost survivina i intenziteta bojanja survivina u njima, korištenjem Friedman ANOVA i Mann-Whitney U testa, nađena je statistički značajna pozitivna korelacija tj. u uzorcima tkiva sa većim postotkom stanica pozitivnih na survivin postoji i jači intenzitet bojanja, odnosno izraženost survivina (Tablica 16)

Friedman ANOVA and Kendall Coeff. of Concordance; ANOVA Chi Sqr. (N = 38, df = 2) = 49,93103 p = ,00000; Coeff. of Concordance = ,65699 Aver. rank r = ,64772				
	Average Rank	Sum of Ranks	Mean	Std.Dev.
%	2,789474	106,0000	50,72263	35,70142
Intenzitet 1-3	1,421053	54,0000	1,36842	0,75053

Mann-Whitney U Test								
	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2
% -int 1-3	477,0000	51,00000	12,00000	-1,40130	0,161126	0,160204	30	2

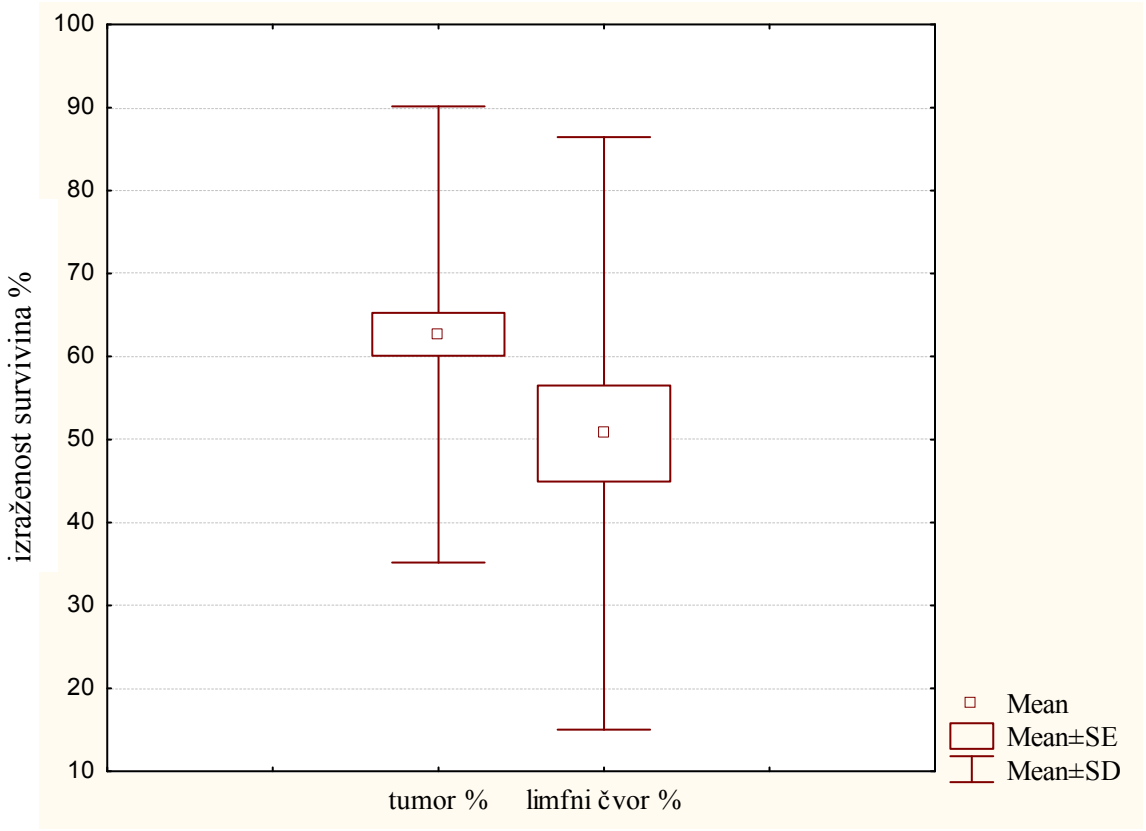
Tablica 16. Prikaz usporedbe postotka i intenziteta bojanja tumorskih stanica u metastatskim limfnim čvorovima koje pokazuju izraženost survivina

Usporedbom postotka tumorskih stanica koje pokazuju izraženost survivina u primarnom tumoru i na metastatskom limfnom čvoru istog pacijenta , korištenjem Friedman ANOVA i Wilcoxon Matched Pairs Testa , nađena je statistički značajna razlika (Tablica 17) i statistički značajna pozitivna korelacija (Slika 5) tj. postotak tumorskih stanica pozitivnih na survivin u primarnom tumoru veći je od postotka pozitivnih stanica pozitivnih na survivin u odgovarajućem metastatskom limfnom čvoru. Povećan postotak pozitivnih stanica na survivin u primarnom tumoru povezan je i s većim postotkom pozitivnih stanica u metastatskom limfnom čvoru.

Friedman ANOVA and Kendall Coeff. of Concordance;ANOVA Chi Sqr. (N = 36, df = 1) = 11,11111 p = ,00086; Coeff. of Concordance = ,30864 Aver. rank r = ,28889				
	Average Rank	Sum of Ranks	Mean	Std.Dev.
% u tumoru	1,777778	64,00000	73,91445	27,26477
% u limfnom čvoru	1,222222	44,00000	49,30111	36,16537

Wilcoxon Matched Pairs Test				
	Valid N	T	Z	p-level
% u tumoru i % u limfnom čvoru	36	108,0000	3,534879	0,000408

Tablica 17. Prikaz usporedbe postotka pozitivnih stanica na survivin u primarnom tumoru i metastatskom limfnom čvoru.

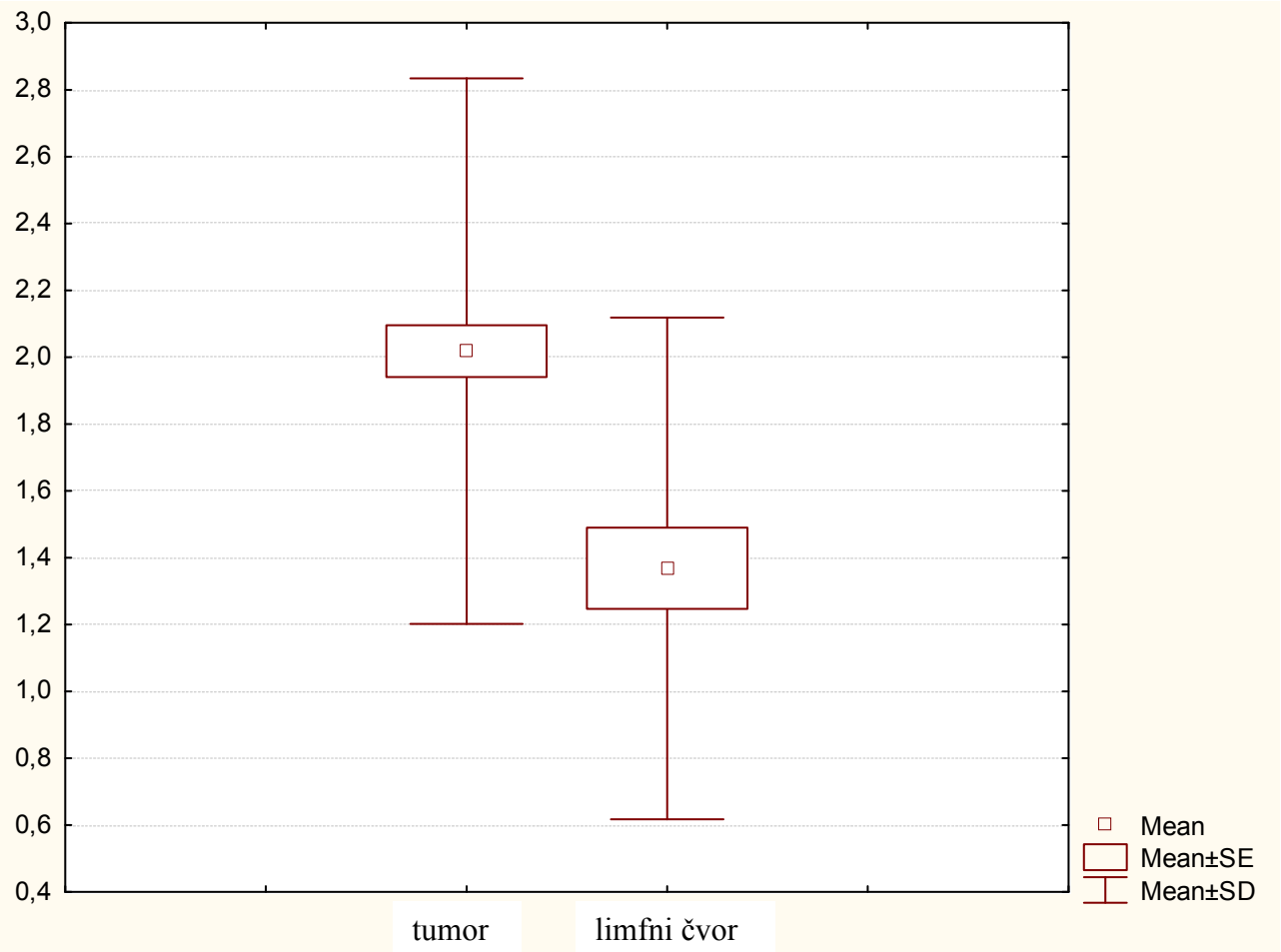


Slika 5. Prikaz izraženosti postotaka pozitivnih stanica na survivin u primarnom tumoru i metastatskom limfnom čvoru

Usporedbom intenziteta bojanja tumorskih stanica u primarnom tumoru koje pokazuju izraženost survivina i intenziteta bojanja tumorskih stanica pozitivnih na survivin u metastatskom limfnom čvoru istog pacijenta , korištenjem Wilcoxon Matched Pairs testa nije nađena statistički značajna razlika tj. intenzitet bojanja tumorskih stanica na survivin u primarnom tumoru ne razlikuje se od intenziteta bojanja stanica na survivin u odgovarajućem metastatskom limfnom čvoru, ali je nađena statistički značajna pozitivna korelacija u intenzitetu bojanja, tj. povećanje intenziteta bojanja u primarnom tumoru prati povećanje intenziteta bojanja u metastatskom limfnom čvoru.(Tablica 18, Slika 6)

Wilcoxon Matched Pairs Test				
	broj	T	Z	p-level
Intenzitet u tumoru i u limfnom čvoru	36	15,00000	3,619920	0,000295

Tablica 18. Prikaz usporedbe intenziteta bojanja stanica pozitivnih na survivin u primarnom tumoru i metastatskom limfnom čvoru.



Slika 6. Prikaz izraženosti intenziteta bojanja stanica na survivin u primarnom tumoru i metastatskom limfnom čvoru

5.4. Usporedba izraženosti survivina i kliničkopatoloških karakteristika karcinoma želuca

Analiza korelacije postotka stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin sa dobi i spolom pacijenta te kliničkopatološkim obilježjima tumora korištenjem Spearman Rank testa pokazala je pozitivnu korelaciju između postotka stanica pozitivnih na survivin i postojanja metastaza, količinom mucina i postojanjem limfatične invazije. Drugim riječima, tumori sa većim postotkom stanica pozitivnih na survivin češće imaju metastaze, češće imaju veću mucinoznu komponentu te češće pokazuju limfatičnu infiltraciju u odnosu na tumore sa manjim postotkom pozitivnih stanica na survivin. (Tablica 19)

	Broj	Spearman R	t(N-2)	p-level
dob	112	0,043413	0,45575	0,649470
spol	112	-0,103341	-1,08969	0,278232
lokalizacija	112	0,102079	1,07624	0,284175
T	112	0,122255	1,29191	0,199095
N	112	0,156510	1,66197	0,099366
M	**112**	**-0,306844**	**-3,38132**	**0,001000**
tip tumora	**112**	**0,189984**	**2,02953**	**0,044818**
gradus	112	0,019133	0,20071	0,841297
Lauren	112	-0,010081	-0,10573	0,915986
vaskularna invazija	112	0,016545	0,17355	0,862540
limfatička invazija	**112**	**0,277271**	**3,02672**	**0,003079**
perineuralna invazija	112	0,118823	1,25511	0,212098

Tablica 19 . Korelacija postotka stanica pozitivnih na survivin u primarnom tumoru sa kliničkopatološkim karakteristikama tumora

Analiza korelacije intenziteta bojanja stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin sa dobi i spolom pacijenta te kliničkopatološkim obilježjima tumora korištenjem Spearman Rank testa pokazala je pozitivnu korelaciju između intenziteta bojanja stanica na survivin i histološkog stadija diferenciranosti. Drugim riječima, tumori sa jačim intenzitetom bojanja stanica na survivin češće su slabijeg stadija diferenciranosti u odnosu na tumore sa slabijim intenzitetom bojanja stanica na survivin. (Tablica 20)

	broj	Spearman R	t(N-2)	p-level
dob	112	0,034452	0,36155	0,718384
spol	112	0,113141	1,19430	0,234928
lokalizacija	112	0,117770	1,24384	0,216203
T	112	0,066055	0,69431	0,488951
N	112	0,027413	0,28761	0,774184
M	112	-0,123896	-1,30952	0,193086
tip tumora	112	0,126556	1,33809	0,183628
gradus	**112**	**-0,252818**	**-2,74061**	**0,007158**
Lauren	112	-0,075220	-0,79116	0,430556
vaskularna invazija	112	-0,007976	-0,08366	0,933480
limfatička invazija	112	0,164587	1,75007	0,082895
perineuralna invazija	112	0,111668	1,17855	0,241119

Tablica 20 . Korelacija intenziteta bojanja stanica na survivin u primarnom tumoru sa kliničkopatološkim karakteristikama tumora

Analiza korelacije postotka tumorskih stanica metastatskog limfnog čvora pozitivnih na survivin sa dobi i spolom pacijenta te kliničkopatološkim obilježjima tumora korištenjem Spearman Rank testa pokazala je pozitivnu korelaciju između postotka stanica pozitivnih na survivin i postojanja metastaza te postojanja perineuralne invazije. Drugim riječima, tumori čije stanice u metastatskim limfnim čvorovima imaju veći postotak stanica pozitivnih na survivin, češće imaju metastaze te češće pokazuju perineurialnu infiltraciju u odnosu na tumore čije stanice u metastatskim limfnim čvorovima imaju manji postotak pozitivnih stanica. (Tablica 21)

	broj	Spearman R	t(N-2)	p-level
dob	38	0,020211	0,12129	0,904136
spol	38	0,000000	0,00000	1,000000
lokalizacija	38	0,014264	0,08559	0,932263
T	38	0,053983	0,32437	0,747535
N	38	-0,146437	-0,88820	0,380331
M	**38**	**-0,474369**	**-3,23314**	**0,002622**
tip tumora	38	-0,249958	-1,54891	0,130150
gradus	38	0,123133	0,74446	0,461429
Lauren	38	-0,079417	-0,47801	0,635531
vaskularna invazija	38	-0,023581	-0,14152	0,888246
limfatička invazija	38	0,029207	0,17531	0,861815
perineuralna invazija	**38**	**0,471611**	**3,20894**	**0,002799**

Tablica 21. Korelacija postotka stanica pozitivnih na survivin u metastatskom limfnom čvoru sa kliničkopatološkim karakteristikama tumora

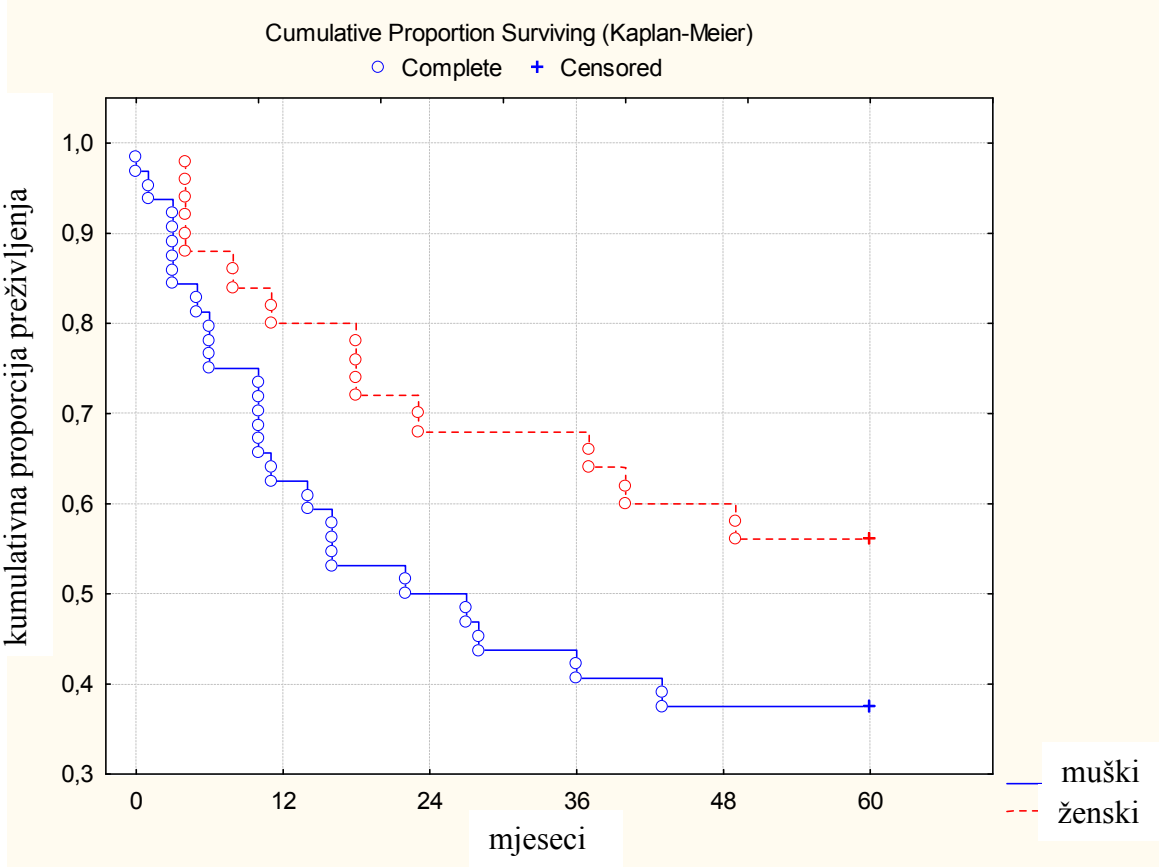
Analiza korelacije intenziteta bojanja stanica metastatskog limfnog čvora pozitivnih na survivin sa dobi i spolom pacijenta te kliničkopatološkim obilježjima tumora korištenjem Spearman Rank testa pokazala je pozitivnu korelaciju između intenziteta bojanja stanica pozitivnih na survivin i postojanja perineuralne invazije. Drugim riječima, tumori čije stanice u metastatskim limfnim čvorovima imaju jači intenzitet bojanja češće pokazuju perineuralnu infiltraciju u odnosu na tumore čije tumorske stanice u metastatskim limfnim čvorovima imaju slabiji intenzitet bojanja. (Tablica 22).

	broj	Spearman R	t(N-2)	p-level
dob	38	-0,024714	-0,14833	0,882912
spol	38	0,174496	1,06329	0,294733
lokalizacija	38	0,203770	1,24882	0,219790
T	38	-0,029974	-0,17992	0,858223
N	38	-0,015891	-0,09536	0,924559
M	38	-0,054630	-0,32827	0,744608
tip tumora	38	-0,108575	-0,65532	0,516426
gradus	38	-0,223462	-1,37556	0,177457
Lauren	38	-0,166154	-1,01098	0,318775
vaskularna invazija	38	0,066319	0,39879	0,692404
limfatička invazija	38	-0,054761	-0,32906	0,744019
perineuralna invazija	**38**	**0,663185**	**5,31643**	**0,000006**

Tablica 22 . Korelacija intenziteta bojanja stanica pozitivnih na survivin u metastatskom limfnom čvoru sa kliničkopatološkim karakteristikama tumora.

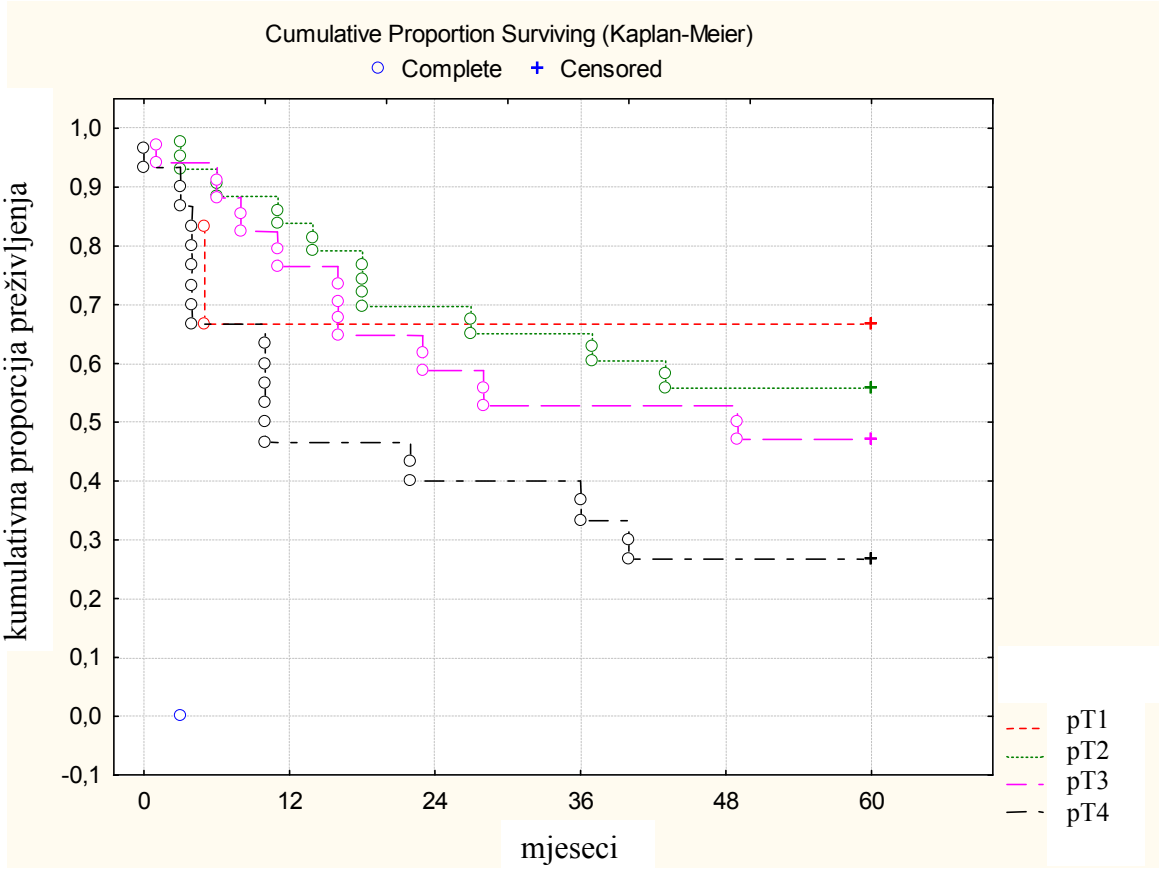
5.5. Analiza utjecaja pojedinih kliničkopatoloških karakteristika i izraženosti survivina na 5-godišnje preživljenje bolesnika

Bolesnici muškog spola imali su statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike ženskog spola. p = 0 ,01388 (Slika 7)



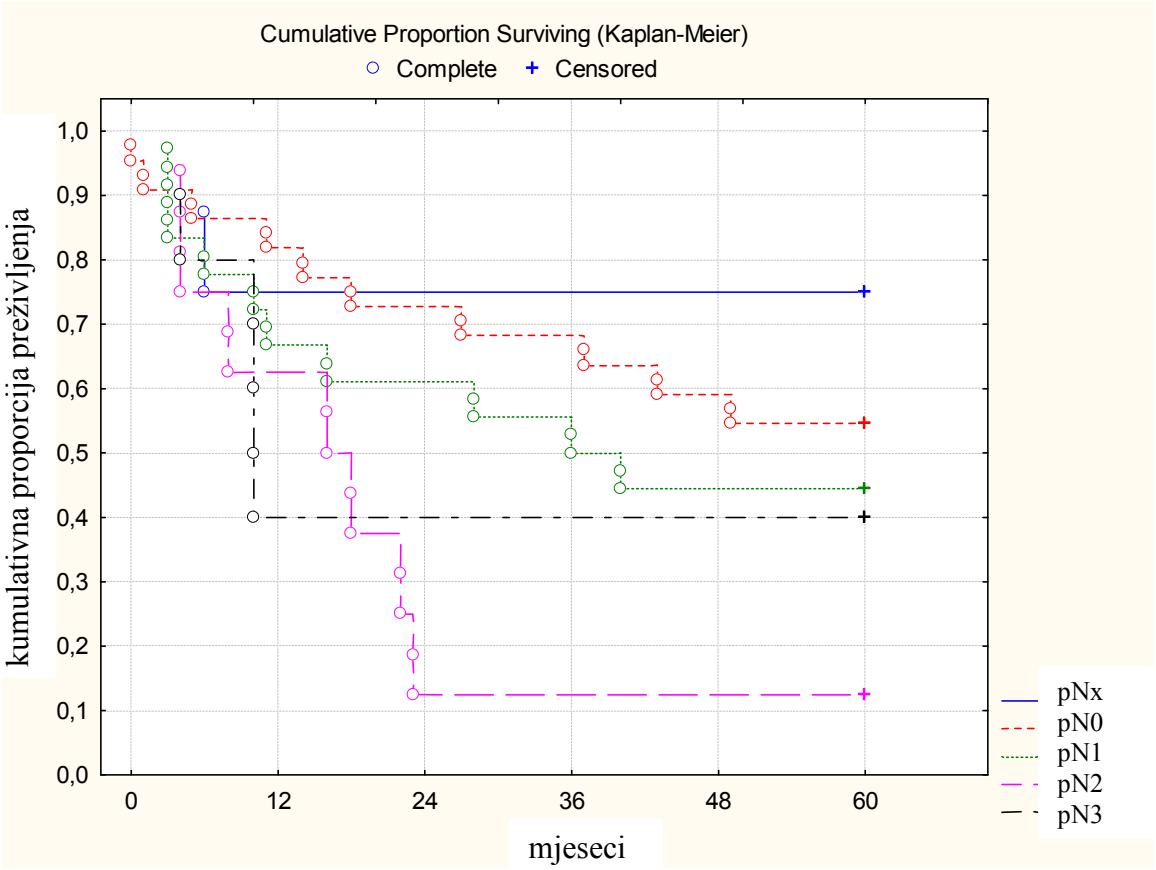
Slika 7. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na spol bolesnika.

Bolesnici s većim T stadijem bolesti imali su statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike s manjim T stadijem . p = 0,01374 (Slika 8)



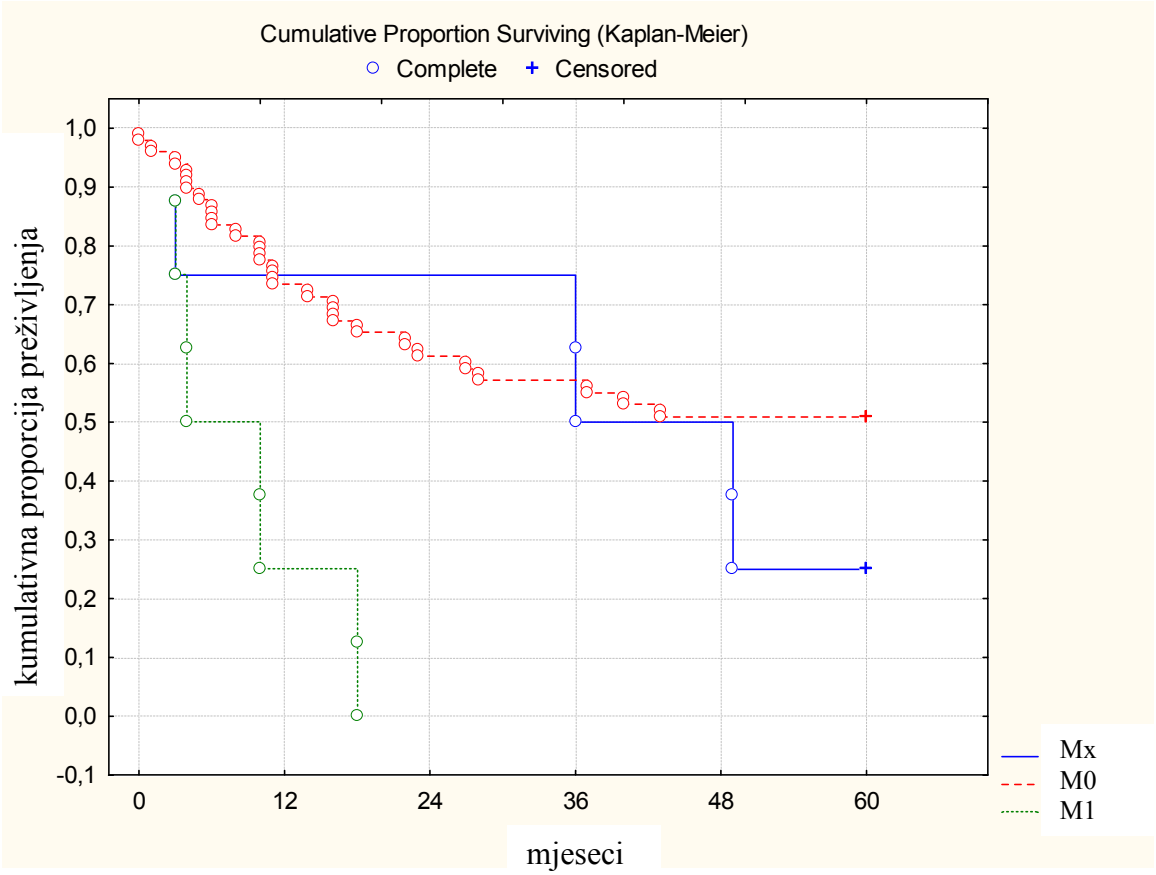
Slika 8. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na pT stadij bolesti.

Bolesnici s većim N stadijem bolesti imali su statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike s manjim N stadijem . p = 0, 03935 (Slika 9)



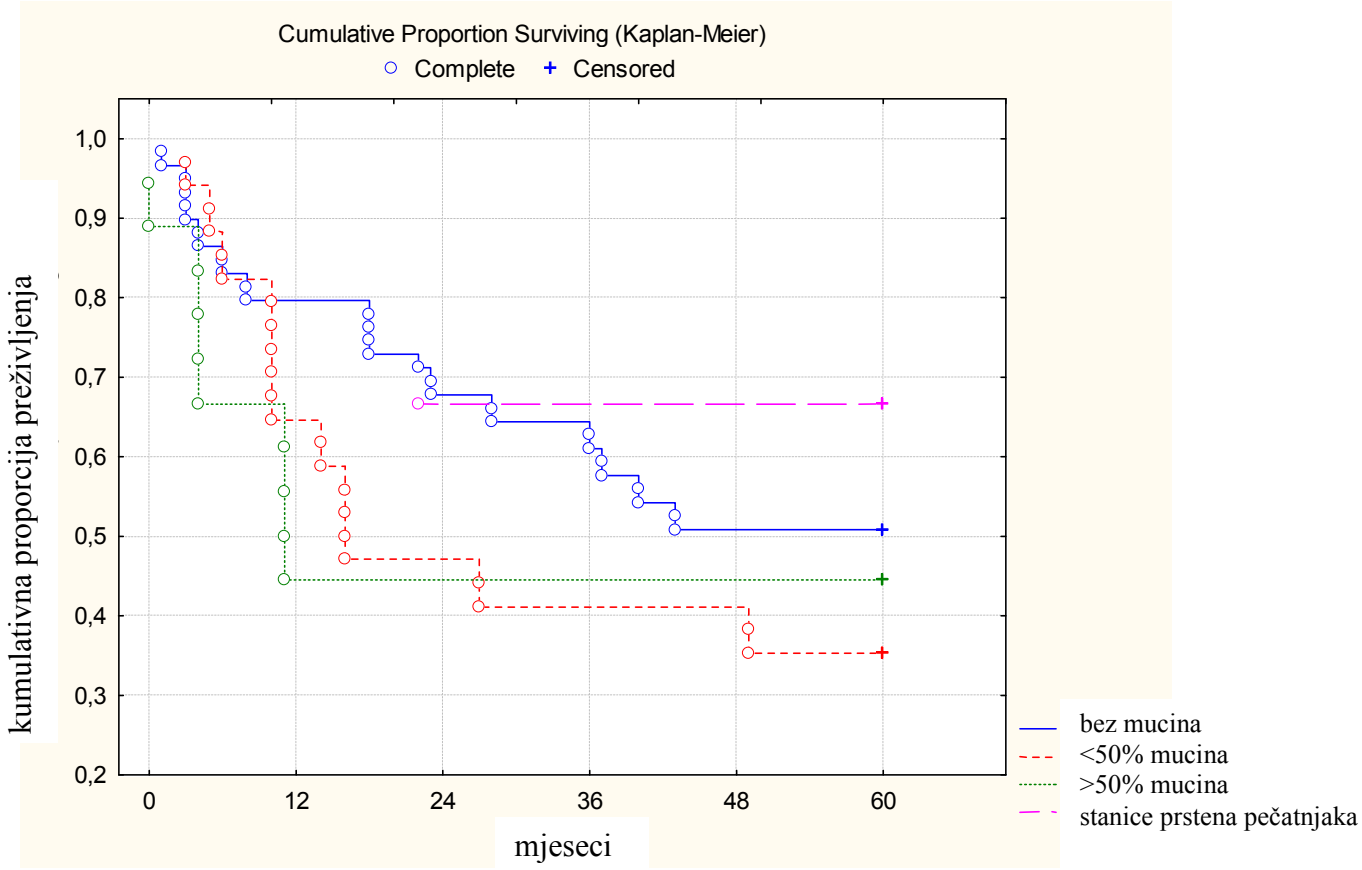
Slika 9. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na pN stadij bolesti.

Bolesnici s većim M stadijem bolesti imali su statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike s manjim M stadijem . p = 0, 00411 (Slika 10)



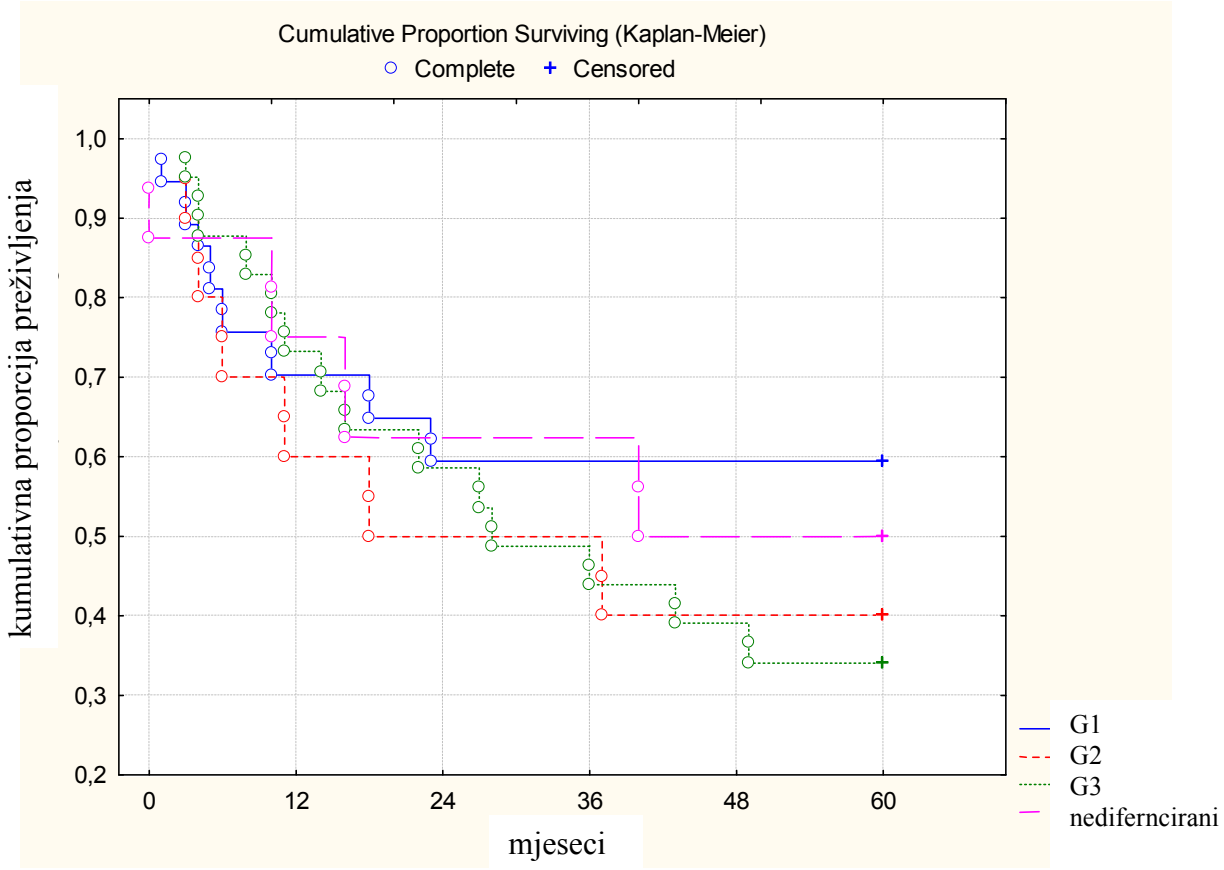
Slika 10. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na M stadij bolesti.

Analiza preživljenja s obzirom na tip tumora (mucinoznu komponentu) nije pokazala statistički značajne razlike. p = 0, 22472 (Slika 11)



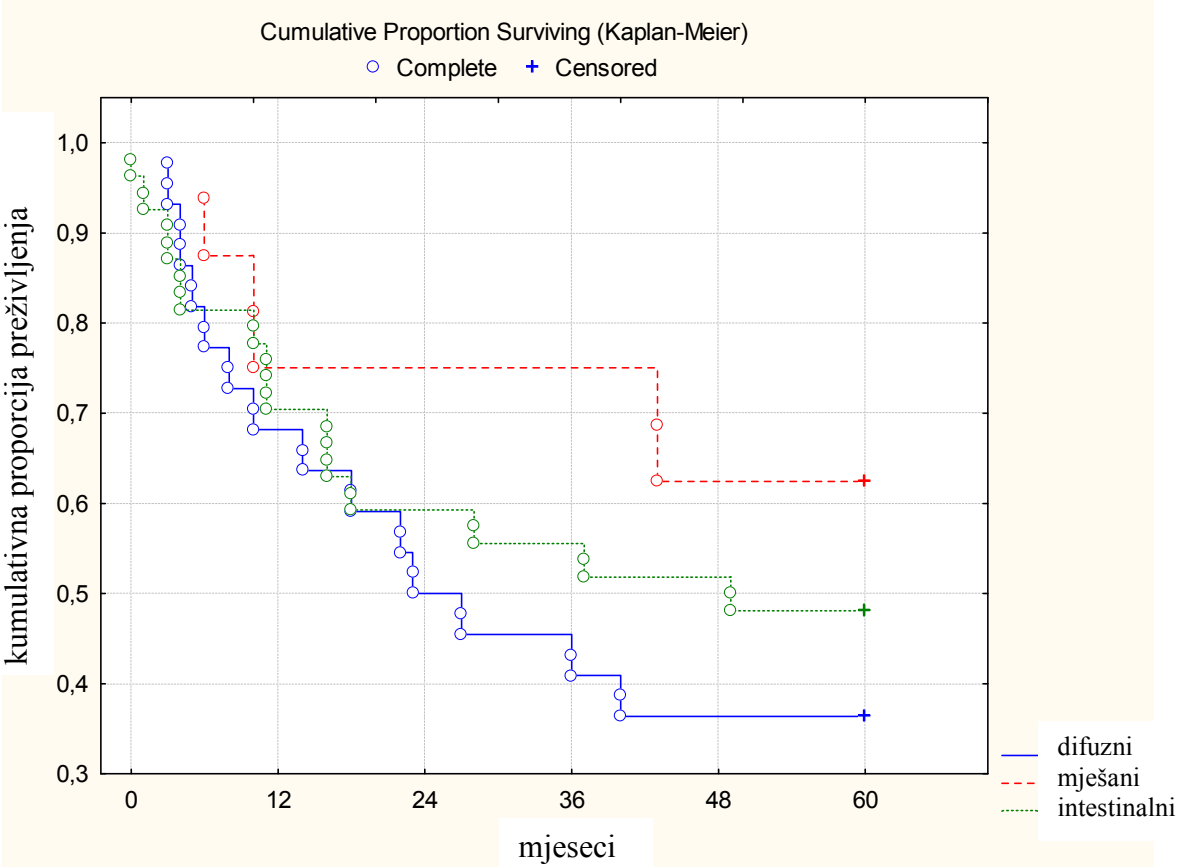
Slika 11. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na tip tumora.

Analiza preživljenja s obzirom na gradus (diferenciranost) tumora nije pokazala statistički značajne razlike. p = 0, 65751 (Slika 12)



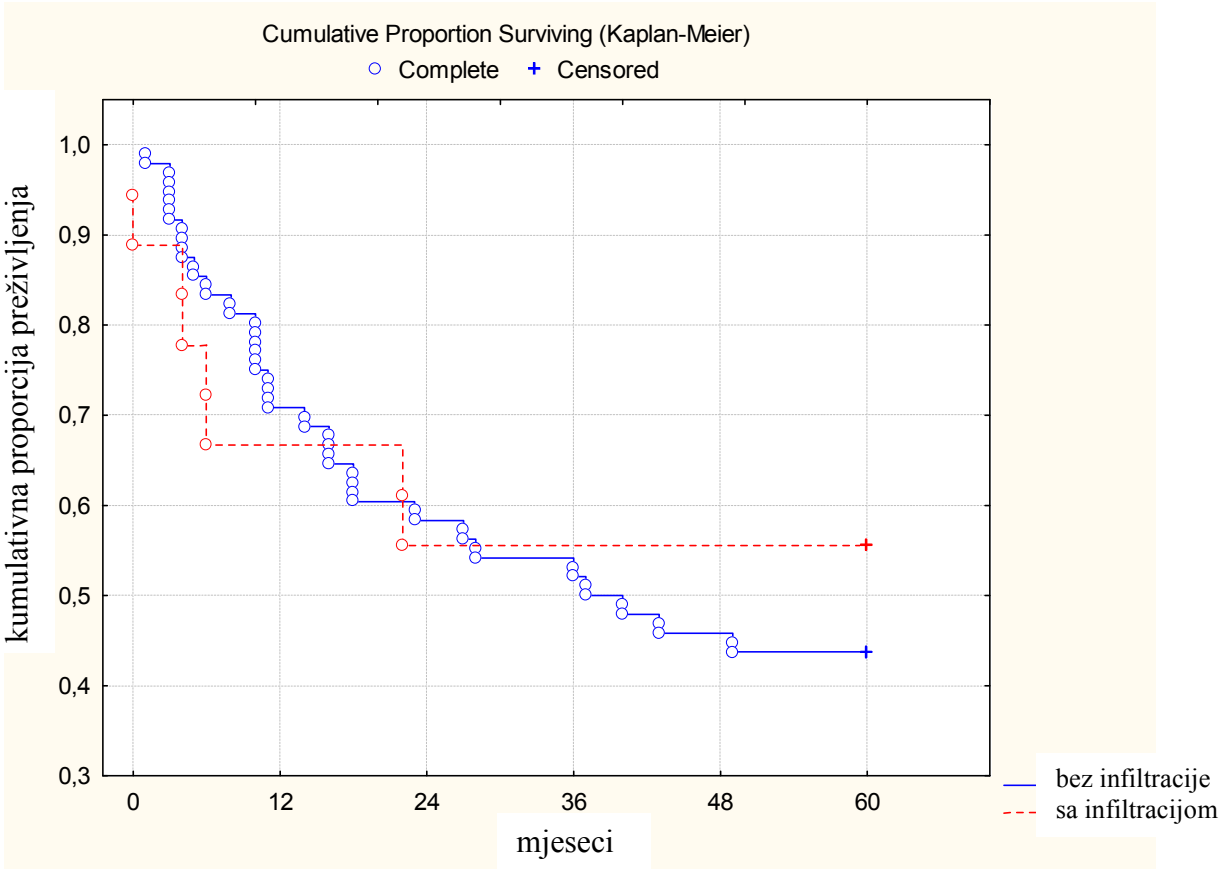
Slika 12. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na diferenciranost tumora.

Analiza preživljenja s obzirom na klasifikaciju prema Laurenu nije pokazala statistički značajne razlike. p = 0, 21435 (Slika 13)



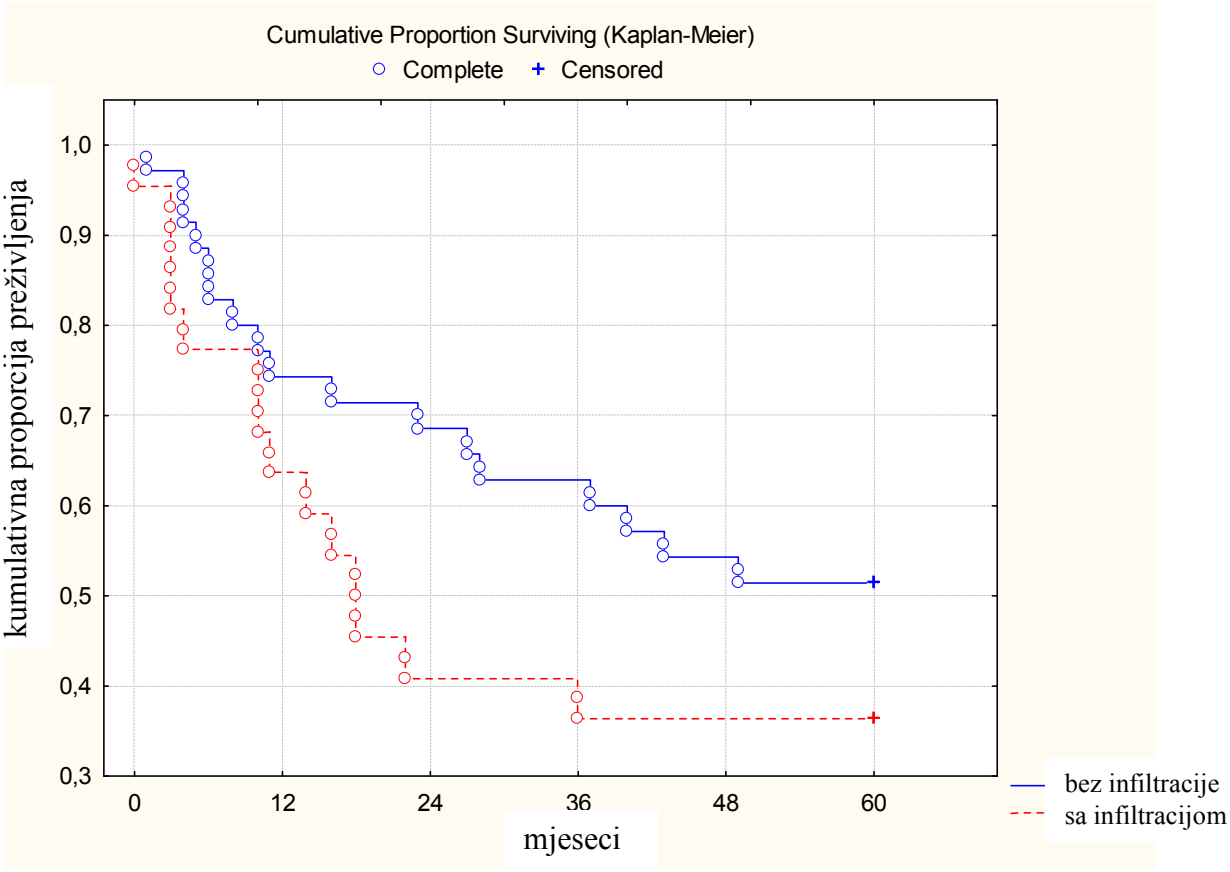
Slika 13. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na klasifikaciju prema Laurenu.

Analiza preživljenja s obzirom na postojanje vaskularne infiltracije nije pokazala statistički značajne razlike. p = 0, 92351 (Slika 14)



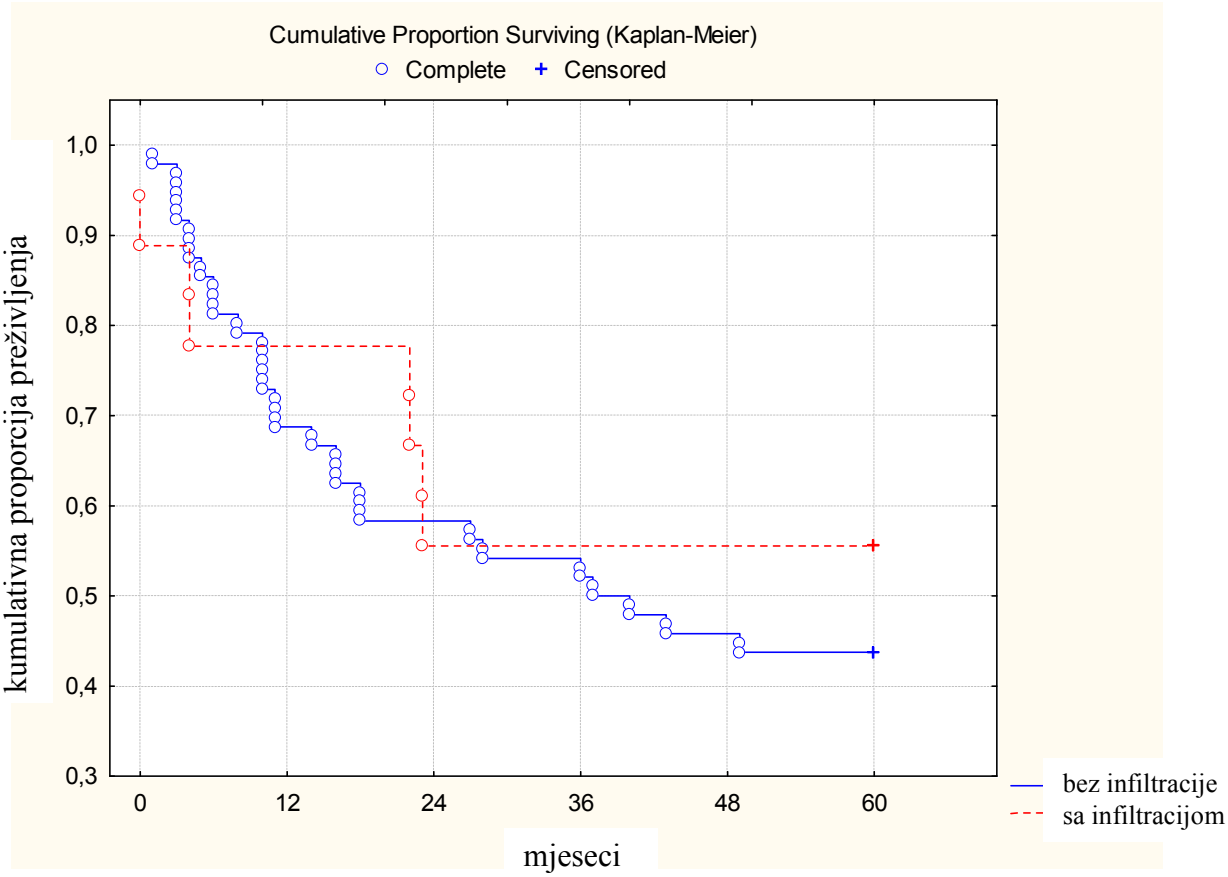
Slika 14. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na postojanje vaskularne infiltracije.

Bolesnici kod kojih su tumori pokazivali postojanje limfatičke infiltracije imali su statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike kod kojih tumori nisu pokazivali znakove infiltracije. p = 0, 03331 (Slika 15)



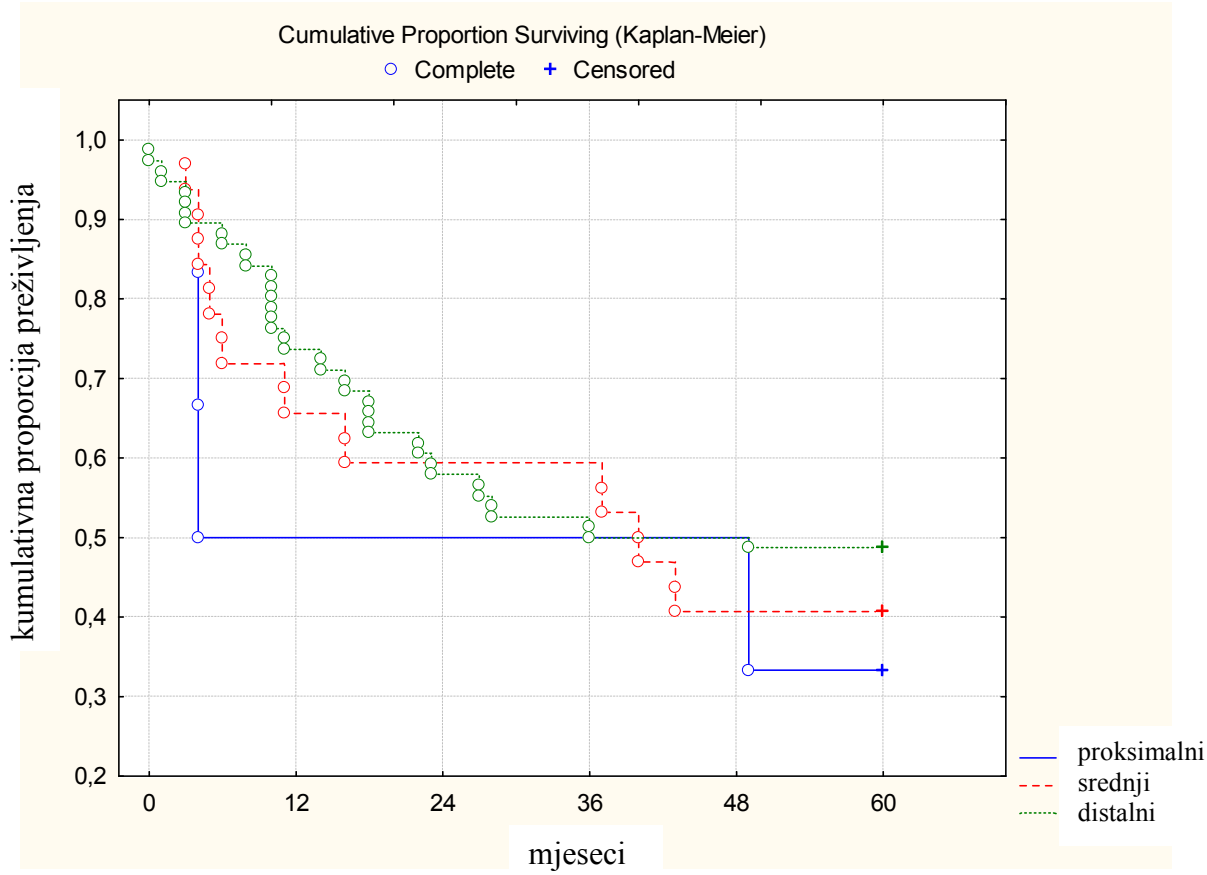
Slika 15. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na postojanje limfatičke infiltracije.

Analiza preživljenja s obzirom na postojanje perineuralne infiltracije nije pokazala statistički značajne razlike. p = 0, 59110 (Slika 16)



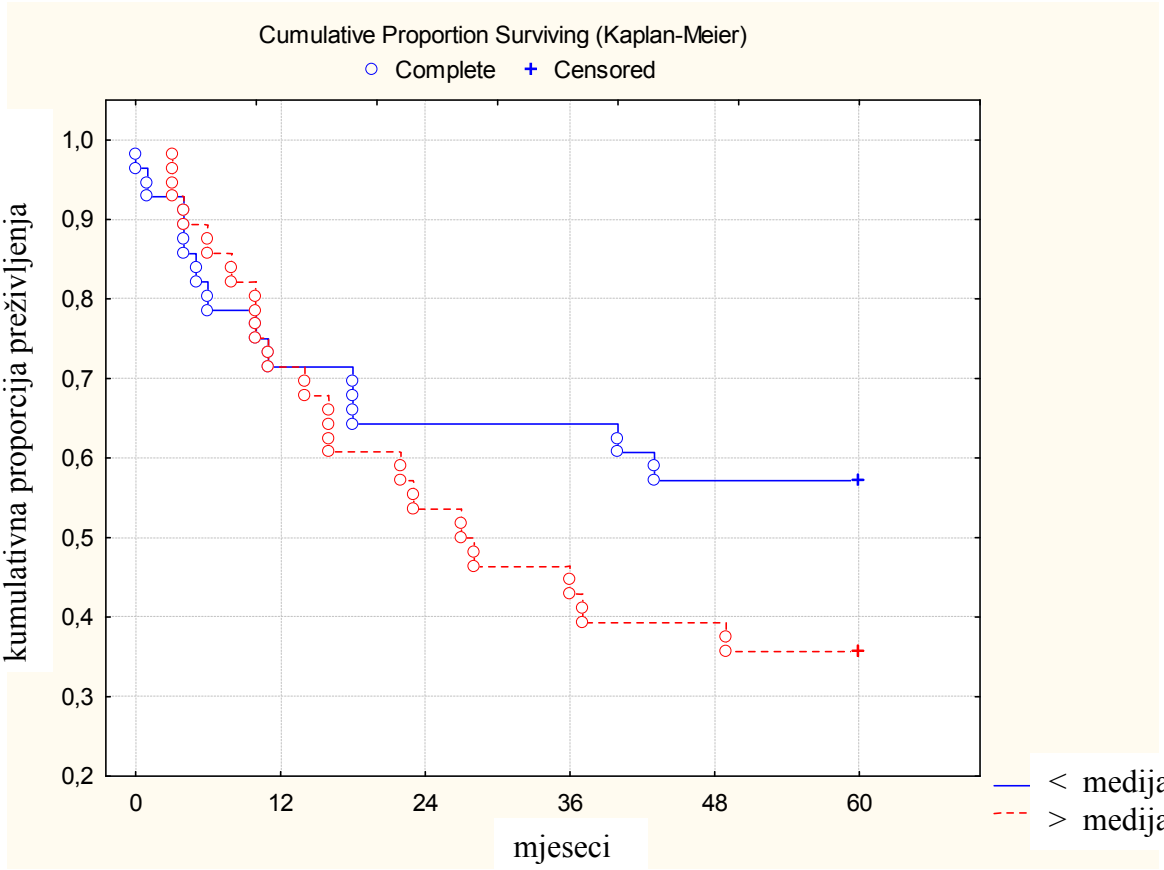
Slika 16. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na postojanje perineuralne infiltracije.

Analiza preživljenja s obzirom na lokalizaciju tumora nije pokazala statistički značajne razlike. p = 0, 56438 (Slika 17)



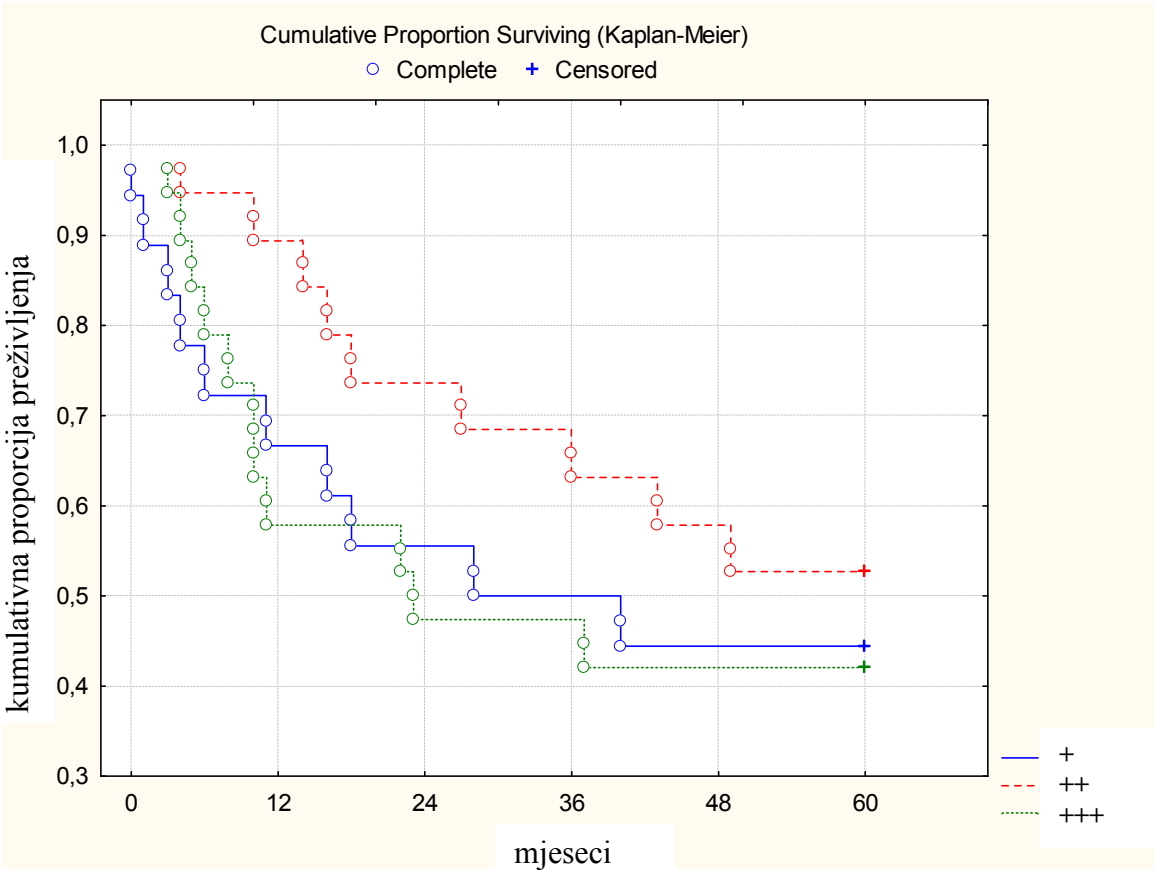
Slika 17. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na lokalizaciju tumora.

Za analizu preživljenja s obzirom na postotak stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin, bolesnici su podijeljeni u dvije skupine ovisno da li je postotak izraženosti veći ili manji od medijana. Analiza nije pokazala statistički zančajnu razliku (p = 0,16226), ali do razlike dolazi nakon 2 godine u korist bolesnika sa manjim postotkom stanica pozitivnih na survivin u primarnom tumoru te ova skupina bolesnika ima bolje preživljenje (Slika 18).



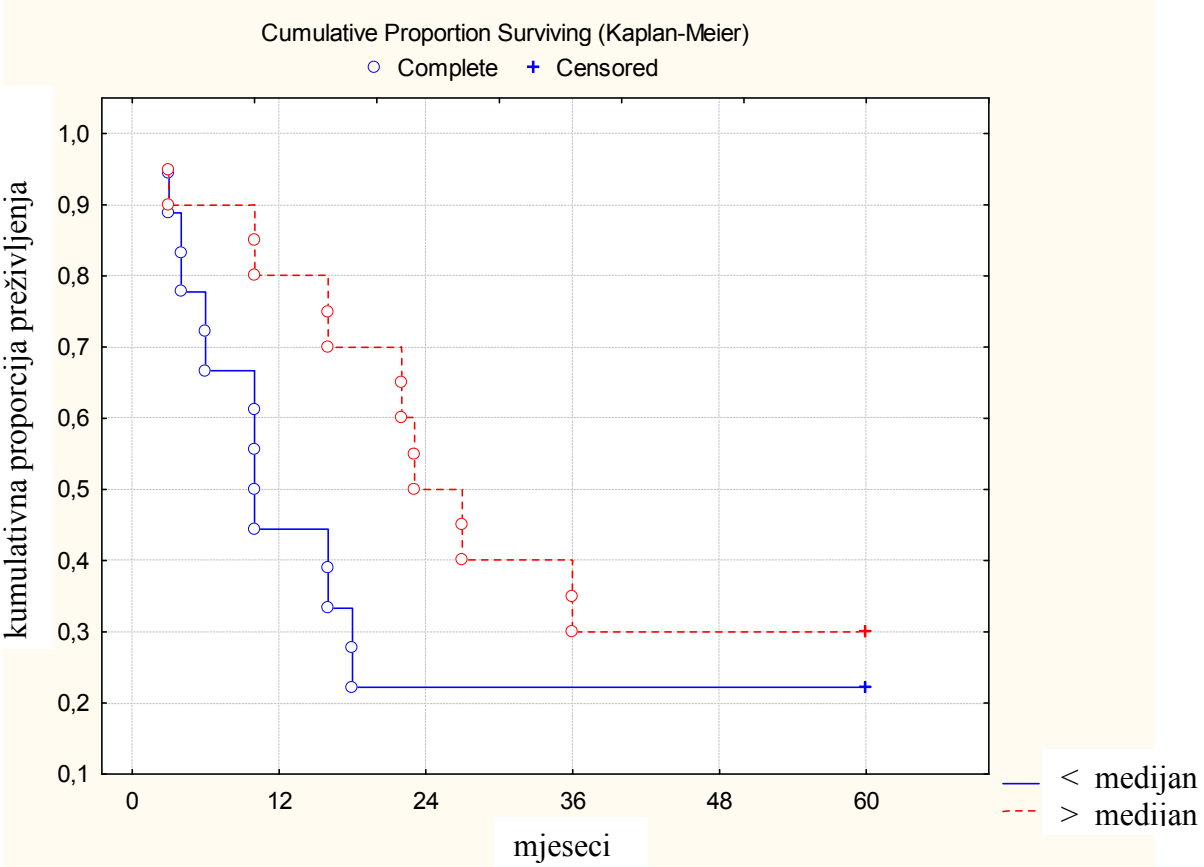
Slika 18. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na postotak stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin.

Analiza preživljenja s obzirom na intenzitet bojanja stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin nije pokazala statistički značajnu razliku (p = 0, 13269) (Slika 19).



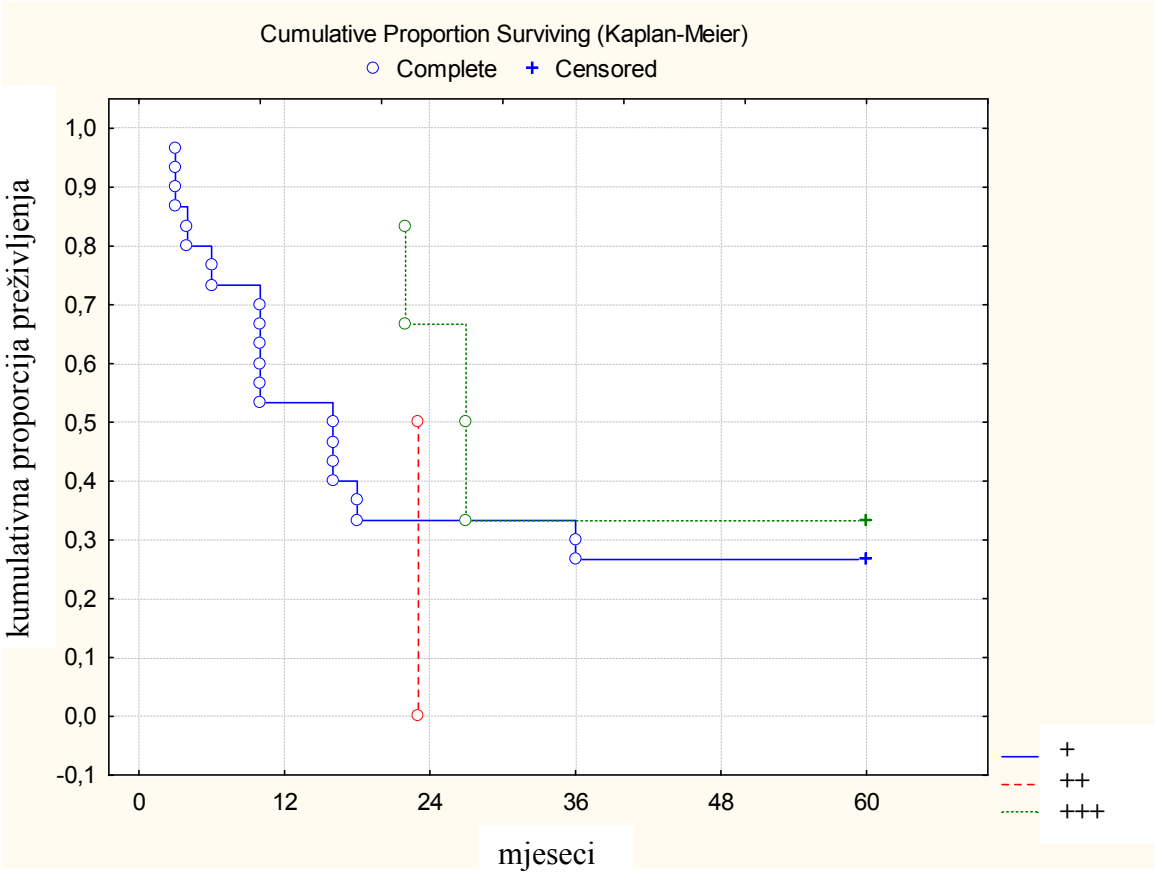
Slika 19. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na intenzitet bojanja stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin.

Za analizu preživljenja s obzirom na postotak stanica metastatskog tumora u limfnom čvoru pozitivnih na survivin, bolesnici su podijeljeni u dvije skupine ovisno da li je postotak izraženosti veći ili manji od medijana. Analiza je pokazala statistički značajnu razliku (p = 0, 04488) u korist bolesnika sa većim postotkom stanica pozitivnih na survivin u metastatskom limfnom čvoru te ova skupina bolesnika ima bolje preživljenje (Slika 20).



Slika 20. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na postotak stanica metastatskog tumora u limfnom čvoru pozitivnih na survivin.

Analiza preživljenja s obzirom na intenzitet bojanja stanica metastatskog tumora u limfnom čvoru pozitivnih na survivin nije pokazala statistički značajnu razliku (p = 0, 15778) (Slika 21).



Slika 21. Prikaz 5-godišnjeg preživljenja obzirom na intenzitet bojanja stanica metastatskog tumora u limfnom čvoru pozitivnih na survivin.

6. RASPRAVA

Deskriptivna statistika pacijenata oboljelih od karcinoma želuca pokazuje da je u ispitivanom uzorku bilo više muškaraca, većina bolesnika bila je u 7 desetljeću života u vrijeme dijagnoze bolesti, a najčešća lokalizacija tumora bila je u distalnoj trećini želuca (Tablica 3-5). Ispitivana skupina odgovara epidemiološkim karakteristikama oboljelih od karcinoma želuca. Kod većine je učinjena gastrektomija ili subtotalna resekcija što je standardni postupak u liječenju ove bolesti. Obzirom da se radilo o bolesnicima koji su uglavnom prošli predoperacijku radiološku obradu , većina ih nije imala metastatsku bolest, međutim tek je mali broj imao T1 lokalni stadij bolesti , dok je oko polovice imalo metastaze u limfnim čvorovima (Tablica 7), što također odgovara epidemiološkim podacima za Europu. Patohistološkom analizom utvrđena je prisutnost mucina u oko polovice slučajeva (Tablica 8), a u oko trećine pacijenata tumori su pokazivali dobru diferenciranost (Tablica 9). Analizom klasifikacije prema Laurenu utvrđena je dominacija intestinalnog tipa (Tablica 10) što odgovara podacima iz literature. Relativno velik broj tumora pokazivao je limfatičku infiltraciju u odnosu na vaskularnu i perineuralnu (Tablica 11). Kod većine pacijenata proveden je radikalan kirurški zahvat (Tablica 12). Ukupno gledano, podaci dobiveni deskriptivnom statistikom govor u prilog reprezentativom uzorku pacijenata uključenih u ovo istraživanje.

Slični su podaci dobiveni i analizom preživljenja , pa su tako bolesnici muškog spola imali statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike ženskog spola. Očekivano, bolesnici s većim T , N i M stadijem bolesti imali su statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike s manjim T, N i M stadijem. (Slika 8-10) Analiza preživljenja s obzirom na tip tumora (mucinoznu komponentu) nije pokazala statistički značajne razlike kao ni analiza preživljenja s obzirom na gradus (diferenciranost) tumora te obzirom na klasifikaciju prema Laurenu (Slika 11-13). Analiza preživljnja u odnosu na infiltraciju tumora

pokazala je značajno kraće preživljenje obzirom na limfatičku infiltraciju dok nije bilo statistički značajne razlike obzirom na vaskularnu i perineuralnu infiltraciju (Slika 14-16). Nadalje, analiza preživljenja s obzirom na lokalizaciju tumora nije pokazala statistički značajne razlike (Slika 17).

U dosadašnjim istraživanjima izraženosti survivina imunohistokemijom korišteni su različiti načini interpretiranja i grupiranja rezultata. Postoje istraživanja gdje su uzorci tkiva u kojima je bilo manje od 5 ili 10 % pa čak i 30 % smatrani za negativne(375, 397). Nadalje, neki autori koristili su različite skale podjela intenziteta , a neki autori su koristili tzv . indeks izraženosti dobiven množenjem vrijednosti postotka ili skupine u koju spada postotak i vrijednosti intenziteta. (371, 375, 398)Obzirom da postotak stanica koje imunohistokemijom izražavaju određenu molekulu predstavlja izraženost molekule u cijelom tkivu i ne govori o relativnom broju odnosno izraženosti molekule u pojedinoj stanici, a intenzitet bojanja upravo odražava taj podatak, dok ne govori o udjelu stanica nekog tkiva koje posjeduje određenu molekulu rezultati postotka i intenziteta u ovom istraživanju prikazani su i analizirani zasebno.

Analiza izraženosti survivina u uzorcima zdrave sluznice želuca očekivano je pokazala niske vrijednosti postotaka i intenziteta bojanja. Štoviše, u 7 od 20 uzoraka nije zabilježena niti najmanja izraženost survivina. Ranija istraživanja zabilježila su male količine i u normalnoj sluznici želuca i to uglavnom u citoplazmi žlijezdanih stanica unutarnjih područja žlijezda, dok je razina izrazito mala ili odsutna u površinskoj sluznici(335). Za razliku od toga, zabilježena je izraženost survivina kod prekanceroznih lezija. Stopa pozitivnih stanica kod intestinalne metaplazije iznosila je 53.4%, displazije 59.4% te karcinoma želuca 65.3%, što je bilo značajno više od stope izraženosti u normalnoj sluznici želuca od 11.2%. (377)

U ovom istraživanju, među uzorcima tkiva primarnog tumora, 2 preparata nisu bila pozitivna na survivin, dok je 112 bilo pozitivno (98,24%) sa rasponom vrijednosti od 4,71 do 97,14 % i aritmetičkom sredinom postotka pozitivnih stanica od 62,68 i medijanom od 66,60%. Srednja vrijednost intenziteta iznosila je 2,02 (Tablica 13). Vlastiti rezultati pokazuju značajno veći udio tumora koji koji su pozitivni na survivin u odnosu na udio uzoraka normalne sluznice, sa većim postotkom stanica i većim intenzitetom. Potvrđeno je da je izraženost survivina karakteristika tumorskog tkiva.

Ranije studije na karcinomu želuca imunohistokemijskom ili RNA analizom su pokazale stopu izraženosti između 34.5% i 82.0% (370, 372). S druge strane, postoje studije u kojima su svi uzorci tkiva bili pozitivni na survivin (387).

Uočava se da su postoci uzoraka tkiva koji pozitivni na survivin dosta velikog raspona , što vjerojatno dolazi iz djelomično različite metodologije rada . Zanimljiv je rad u kojem su autori korištenjem RT PCR -a pokazali izraženost survivina u 68% slučajeva karcinoma želuca kao i u , doduše manjem postotku (27%) želučane sluznice rođaka iz prvog koljena oboljelog. Nadalje, ekspresija survivina nađena je i u 22% nekanceroznog tkiva smještenog uz tumor, ali nije zabilježena u normalnoj , udaljenoj sluznici želuca (372).

Usporedbom postotka tumorskih stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin i intenziteta bojanja survivina u njima nađena je statistički značajna pozitivna korelacija, tj. u uzorcima tkiva sa većim postotkom stanica pozitivnih na survivin postoji i jači intenzitet bojanja, odnosno izraženost survivina (Tablica 15). Ovo može ukazivati na biološko ponašanje tumora , odnosno ovisnosti izraženosti survivina o samoj mitozi i obrnuto, kao i da u tkivu tumora postoji mehanizam pozitivne povratne sprege regulacije izraženosti survivina.

Analiza korelacije postotka stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin sa dobi i spolom pacijenata te kliničkopatološkim obilježjima tumora pokazala je pozitivnu korelaciju između postotka stanica pozitivnih na survivin i postojanja metastaza, količinom mucina i

postojanjem limfatične invazije. Drugim riječima, tumori sa većim postotkom stanica pozitivnih na survivin češće imaju metastaze, češće imaju veću mucinoznu komponentu te češće pokazuju limfatičnu infiltraciju u odnosu na tumore sa manjim postotkom stanica pozitivnih na survivin (Tablica 19).

Analiza korelacije intenziteta bojanja stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin sa dobi i spolom pacijenata te kliničkopatološkim obilježjima pokazala je pozitivnu korelaciju između intenziteta bojanja stanica pozitivnih na survivin i histološkog stadija diferenciranosti. Drugim riječima, tumori sa jačim intenzitetom bojanja stanica pozitivnih na survivin češće su slabijeg stadija diferenciranosti u odnosu na tumore sa slabijim intenzitetom bojanja stanica pozitivnih na survivin (Tablica 20) . Uočena je pozitivna korelacija s lošijim kliničkopatološkim obilježjima tumora kada su oni pozitivni na survivin.

U analizi 5-godišnjeg preživljenja s obzirom na postotak stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin nije dobivena statistički značajna razlika, međutim razlika se javlja nakon 2 godine praćenja i to u smislu slabijeg preživljenja za veći postotak izraženosti (Slika 18). Analiza preživljenja s obzirom na intenzitet bojanja stanica primarnog tumora pozitivnih na survivin nije pokazala statistički značajnu razliku (Slika 19). Dobiveni rezultati vlastitoga istraživanja u skladu su sa postavljenom hipotezom istraživanja te se djelomično podudaraju sa rezultatima drugih autora.

Iako postoje iznimke (373), većina autora navodi da je izraženost survivina u korelaciji sa slabijim preživljenjem pacijenata te da pridonosi kemorezistenciji karcinoma želuca (374). U jednom od prvih radova (372) nije nađena korelacija s niti jednim standardnim kliničkopatološkim obilježjem.

Song i sur.(375) su koristeći se poliklonskim protutijelima i imunohistokemijskim obilježavanjem uspjeli dokazati jedino za veličinu tumora značajnu povezanost sa razinom izraženosti survivina, dok nije bilo povezanosti s drugim kliničkopatološkim obilježjima.

Preživljenje pacijenata sa pozitivnim nalazom survivina bilo je statistički značajno kraće od onih svrstanih u survivin negativnu skupinu što survivin u tom istraživanju čini lošim nezavisnim prognostičkim čimbenikom (375).

Nedavno istraživanje iz 2009. godine pokazalo je na razini mRNA za survivin izoliranog iz ukupnih mononuklearnih stanica periferne krvi pacijenata oboljelih od karcinoma želuca ekspresiju kod gotovo svih pacijenata , pozitivnu korelaciju sa prva tri stadija bolesti te povezanost i značaj razine mRNA za survivin kao lošeg prognostičkog čimbenika. Slično istraživanje pokazalo je da je razina survivina u cirkulirajućim karcinomskim stanicama nezavisan predskazatelj recidiva (376).

U ispitivanju ovisnosti o diferencijaciji tumora, (377) razina izraženosti se postepeno povećavala od dobro diferenciranog adenokarcinoma (41.7%), preko umjereno diferenciranog adenocarcinoma (58.3%) do slabo diferenciranog adenocarcinoma (75.6%) sa značajnom korelacijom. Nadalje, od kliničkopatoloških obilježja, izraženost u difuznom tipu (74.6%) bila je značajno veća nego ona u intestinalnom tipu (51.3%). Također, kod karcinoma sa metastazama u limfnim čvorovima 76.9% je bilo pozitivno na survivin dok je kod onih bez metastaza bilo 41.2%(377). Slično, Xiao i sur (377, 378) su našli kako su stope pozitiviteta ekspresije survivina kod tumora sa metastazama (kod metastaza u limfne čvorove 86.2%, kod jetrenih i ovarijalnih metastaza 100%) značajno veće nego u tumora bez metastaza (64.3%).

Povezanost izraženosti survivina i klasifikacije po Laurenu istraživana je i u studiji na uzorcima karcinom želuca od kojih je imunohistokemijski 48,2% označeno kao pozitivno na survivin. Treba naglasiti da su autori uzimali kao parametar pozitivnosti uzorke koji su imali više od 30% pozitivnih stanica. U ovom je istraživanju , s druge strane nađena nađena značajno veća stopa izraženosti survivina kod intestinalnog tipa u odnosu na difuzni, dok nije pokazana povezanost sa ostalim kliničkopatološkim obilježjima (368). Slične rezultate dobili su i autori u jednom od prvih radova vezanih za ovu problematiku (370).

Povezanost je nađena i RT-PCR-om stanica u peritonealnoj tekućini pacijenata oboljelih od karcinoma, a razina izraženosti značajno je korelirala sa dubinom invazije karcinoma, metastazama u limfne čvovrove i TNM 98% klinički evidentnih peritonealnih metastaza pokazalo je izraženost survivina (379)

Lee i sur. nisu uspjeli na tkivu karcinoma želuca dokazati povezanost izraženosti VEGF i survivina, ali su dokazali povezanost veće izraženosti survivina sa većom razinom mikrovaskularne gustoće. Nadalje, pokazali su izraženost survivina u samo 50% uzoraka tkiva, a razina je bila u značajanoj korelaciji sa veličinom tumora, dubinom invazije, metastazama u limfne čvorove, stadijem tumora i lošijim preživljenjem (371).

Deng i sur našli su survivin također u oko 50% uzoraka tkiva te pozitivnu korelaciju sa metastazama u limfne čvorove i dobrom diferencijacijom tumora. Nisu našli koreleaciju sa preživljenjem(384). Što se tiče diferenciranosti tumora i survivina Li i suradnici dobili su obrnute rezultate, dok su imali 76% pozitivnih uzoraka te pozitivnu korelaciju s TNM stadijem.(385)

Meng i sur. istraživali su značaj *splice* varijanti na uzorcima tumora i susjedne morfološki zdrave sluznice RT PCR-om pokazali prisutnost divljeg tipa u 100% uzoraka karcinoma , survivin-2b varijante u 78.5% te survivinDx3 kod 64% uzoraka . S druge strane, u morfološki zdravoj sluznici zabilježeni su postoci od 58%, 29.1% te 15.2 % za divlji tip, odnosno varijantu 2b i Dx3(387)

Uspoređujući kliničkopatološke parametre i ekspresiju pojedinih varijanti survivina dobili su značajno manju izraženost survivin-2b varijante kod III i IV stadija bolesti u odnosu na I i II te negativnu korelacija sa dubinom invazije tumora i stupnjem diferencijacije. Nije nađena povezanost drugih varijanti survivina sa kliničkopatološkim obilježjima tumora što je bilo u skladu s ranijim istraživanjima (388, 389). S druge strane nađena je jedino korelacija divljeg tipa sa preživljenjem u smislu lošeg prognostičkog čimbenika (387).

U vlastitim istraživanjima svi uzorci tkiva metastatskog tumora u limfnim čvorovima imali su pozitivnu reakciju na survivin, sa rasponom vrijednosti od 0,5 do 95.76 % , aritmetičkom sredinom postotka pozitivnih stanica od 50,72 i medijanom od 57,97%. Srednja vrijednost intenziteta iznosila je 1,37 (Tablica 13). Usporedbom postotka tumorskih stanica u metastatskom limfnom čvoru pozitivnih na survivin i intenziteta bojanja survivina u njima dobiveni su slični rezultati kao i u slučaju primanog tumora, odnosno u uzorcima tkiva sa većim postotkom stanica pozitivnih na survivin postoji i jači intenzitet bojanja, odnosno izraženost survivina (Tablica 16)

Analiza korelacije postotka tumorskih stanica metastatskog limfnog čvora pozitivnih na survivin sa dobi i spolom pacijenta te kliničkopatološkim obilježjima tumora pokazala je pozitivnu korelaciju između postotka stanica pozitivnih na survivin i postojanja metastaza te postojanja perineuralne invazije. Tumori čije stanice u metastatskim limfnim čvorovima imaju veći postotak stanica pozitivnih na survivin, češće imaju metastaze te češće pokazuju perineuralnu infiltraciju u odnosu na tumore čije su stanice u metastatskim limfnim čvorovima manjeg postotoka pozitivnih na survivin.

Analiza korelacije intenziteta bojanja stanica metastatskog limfnog čvora pozitivnih na survivin sa dobi i spolom pacijenata te kliničkopatološkim obilježjima tumora pokazala je pozitivnu korelaciju između intenziteta bojanja stanica pozitivnih na survivin i postojanja perineuralne invazije. Tumori čije stanice u metastatskim limfnim čvorovima imaju jači intenzitet bojanja češće pokazuju perineuralnu infiltraciju u odnosu na tumore čije tumorske stanice u metastatskim limfnim čvorovima imaju slabiji intenzitet bojanja. Uočava se da je izraženost survivina u metastatskom limfnom čvoru u pozitivnoj korelaciji sa lošijim kliničkopatološkim obilježjima tumora što je također očekivani rezultat.

Međutim, zanimljivo je da je usporedbom postotka tumorskih stanica u primarnom tumoru pozitivnih na survivin i postotka stanica pozitivnih na survivin u metastatskom limfnom

čvoru istog pacijenta nađena statistički značajna razlika (Tablica 17) i statistički značajna pozitivna korelacija (Slika 5). Naime, postotak tumorskih stanica koje se pozitivne na survivin u primarnom tumoru veći je od postotka stanica pozitivnih na survivin u odgovarajućem metastatskom limfnom čvoru, a povećanje postotka stanica koje pokazuju izraženost survivina u primarnom tumoru prati i povećanje postotka stanica koje imaju izraženost survivina u odgovarajućem metastatskom limfnom čvoru. Usporedbom intenziteta bojanja tumorskih stanica nije nađena statistički značajna razlika, ali je nađena statistički značajna pozitivna korelacija tj.povećanje intenziteta bojanja u primarnom tumoru prati povećanje intenziteta bojanja u metastatskom limfnom čvoru (Tablica 18, Slika 6). Rezultati ukazuju na smanjenje izraženosti u metastatskom tumoru u odnosu na primarni tumor , što je neočekivani i zanimljiv podatak.

Kada se uzme u obzir da je analizom preživljenja s obzirom na postotak stanica metastatskog tumora u limfnom čvoru pozitivnih na survivin dobivena statistički značajna razlika u korist pacijenata sa većim postotkom stanica, odnosno bolje preživljenje, tada se situacija dodatno komplicira. Analiza preživljenja s obzirom na intenzitet bojanja stanica metastatskog tumora u limfnom čvoru koje su pozitivne na survivin nije pokazala statistički značajnu razliku. Prema rezultatima vlastitog istraživanja,izraženost survivina je u metastatskom limfnom čvoru manje u odnosu na primarni tumor , ali i dalje povezano sa lošijim kliničkopatološkim znacima , međutim i sa boljim preživljenjem.

Odgovor vjerojatno leži u promjeni biologije metastatskog tumora. Jedno od mogućih objašnjenja moglo bi biti da survivin u limfnom čvoru postaje antigen na koji se javlja imuni odgovor limfocita T (399-405). Time bi se moglo objasniti smanjena izražavanost survivina koje je i u manjoj ukupnoj razini povezana s nekim lošijim kliničkopatološkim karakteristikama. Tumor bi s druge strane, mogao početi koristiti druge molekulske mehanizme kako bi preživio i rastao , a koji više nisu dostupni djelovanju imunološkog

sustava domaćina pa bi se teoretski na taj način moglo objasniti lošije preživljenje kod pacijenata čiji metastatski tumori imaju manju razinu survivina.

Istraživanje je odredilo razinu izraženosti survivina u tkivu primarnog tumora i metastatskim limfnim čvorovima karcinoma želuca te povezivanje razine izraženosti s kliničkopatološkim obilježjima tumora te preživljenjem pacijenata. Nadalje, istraživanje je po prvi put pokazalo odnos izraženosti survivina između primarnog i metastatskog tumora te dinamiku izraženosti čime je ukazalo na promjenu biologije tumora prilikom metastaziranja. Istraživanjem je potvrđena hipoteza, a postignuti ciljevi daju doprinos u rasvjetljavanju uloge survivina u razvoju i širenju ovog tumora. Također, istraživanje je odredilo i vrijednost razine izraženosti survivina kao prognostičkog čimbenika karcinoma želuca. Određivanje izraženosti survivina u tkivu karcinoma želuca može poslužiti kao dodatni pokazatelj određivanja prikladne terapije, uspješnosti adjuvantnog liječenja karcinoma želuca odnosno kao dodatni biljeg praćenja zdravstvenog stanja bolesnika.

7. ZAKLJUČCI

1. Survivin je izražen u većini tkiva primarnog karcinoma želuca i metastatskim limfnim čvorovima i predstavlja obilježje karcinoma želuca i njegovih metastaza u limfne čvorove.
2. Izraženost survivina u tkivu primarnog karcinoma želuca i tkivu metastatskog limfnog čvora značajno je veća u odnosu na normalnu sluznicu želuca
3. Izraženost survivina u primarnom tumoru veća je od izraženosti u metastatskom limfom čvoru.
4. Intenzitet izraženosti molekule survivina unutar tkiva karcinoma želuca u pozitivnoj je korelaciji sa postotkom stanica pozitivnih na survivin.
5. Pojačano izražavanje survivina u primarnom karcinomu želuca povezano je s učestalijim metastaziranjem, većim udjelom mucinoznih stanica, jačom limfatičkom infiltracijom, slabijom diferenciranošću tumora, te granično sa lošijim preživljenjem.
6. Pojačano izražavanje survivina u metastatskim limfnim čvorovima povezano je sa učestalijim metastaziranjem, perineuralnom invazijom, ali i boljim preživljenjem.
7. Moguće je da prilikom metastaziranja karcinoma želuca dolazi do promjena u biologiji tumorskih stanica koje uključuju smanjivanje izraženosti survivina.

8. SAŽETAK

Iako je svjetska incidencija u opadanju, karcinom želuca predstavlja drugi najveći uzrok smrti povezan s karcinomima. Nastaje kroz nekoliko stupnjeva procesa karcinogeneze, a poremećaj fiziološke apoptoze smatra se za ključni korak u njegovu nastanku.Survivin pripada IAP porodici molekula (od eng. *inhibitors of apoptosis*) koje uglavnom imaju ulogu u antiapoptotskim mehanizmima. Nekoliko objavljenih istraživanja o povezanosti survivina i karcinoma želuca donosi oprečne rezultate bilo da se radi o razini izraženosti bilo da se radi o eventualnoj povezanosti s kliničkopatološkim obilježjima tumora. Izraženost survivina u metastatskim limfnim čvorovima do danas nije istraženo.

Cilj istraživanja bio je odrediti korištenjem imunohistomijskog obilježavanja razinu izraženosti survivina u tkivu primarnog karcinoma želuca i metastatskim limfnim čvorovima te istražiti povezanost izraženosti sa kliničkopatološkim obilježjima tumora i ukupnim preživljenjem. Rezultati istraživanja pokazali su da u tkivu primarnog tumora te u metastatskim limfnim čvorovima pacijenata oboljelih od karcinoma želuca postoji visoka izraženost survivina te da je pojačana izraženost povezana s lošijom kliničkopatološkim obilježjima tumora. Nadalje, pokazali smo da je izražavanje survivina u metastatskim stanicama manje u odnosu na primarni tumor što govori o mogućoj ulozi survivina u promjeni biologije metastatskog tumora. Povezanost izraženosti survivina s kliničkom slikom i preživljenjem pokazala je vrijednost survivina kao prognostičkog čimbenika. Izraženost ove molekule u konačnici bi mogao poslužiti kao dodatni pokazatelj određivanja prikladne terapije, uspješnosti adjuvantnog liječenja karcinoma želuca odnosno kao dodatni marker praćenja zdravstvenog stanja bolesnika.

9. SUMMARY

Although the worldwide incidence is desreasing, gastric cancer is second cancer related cause of death . Gastric cancer is supposed to appeare through several stages of carcinogenesis and deviation of physiologic appopthosis is considered as a key moment in carconogenesis. Survivin is a member of IAP (*inhibitors of apoptosis*) molecular family which have generaly have a role in antiapoptotic mechanisms. Up to now, several researches concernig relationship of survivin and gastric cancer have been published, however with adversely results, both concernig the level of expression both possible relationship with clinical and pathological features of the tumor. The expression of survivin in lymph nodes has not yet been explored.

Aim of this study is to determine the level of survivin expression, both in primary gastric cancer tumor, both in metastatic lymph nodes and explore the relationship between the level of expression with patohystology features of the tumor and clinical features of disease and overall survival.

Results of this research have shown that there is high expression of survivin in primar and metastatic lymph node cancer and the level of expression is in correlation with poor clinicopathologic features of disease. Furthermore, we have shown that there is decreased level of expression in metastatic lymph nodes comparing to primar cancer which can suggest of possible role of survivin in changing the biology of metastatic tumor.The correlation of survivin expression with clinical features of diseases and survival has shown the signifficane of survivin as prognostic factor. The level of expression of this molecule could, on the end, become an important factor that influence the modalities of treatment and also serve as follow up marker.

10. LITERATURA:

1. Terry MB, Gaudet MM, Gammon MD. The epidemiology of gastric cancer. Semin Radiat Oncol. 2002;12(2):111-27.

2. Wayman J, Forman D, Griffin SM. Monitoring the changing pattern of esophago-gastric cancer: data from a UK regional cancer registry. Cancer Causes Control. 2001;12(10):943-9.

3. Berrino F. The EUROCARE Study: strengths, limitations and perspectives of population-based, comparative survival studies. Ann Oncol. 2003;14 Suppl 5:v9-13.

4. Parkin DM. International variation. Oncogene. 2004 Aug 23;23(38):6329-40.

5. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer. 2001 Oct;37 Suppl 8:S4-66.

6. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006 Jan 21;12(3):354-62.

7. Yamamoto S. Stomach cancer incidence in the world. Jpn J Clin Oncol. 2001 Sep;31(9):471.

8. Ahn YO, Park BJ, Yoo KY, Kim NK, Heo DS, Lee JK, et al. Incidence estimation of stomach cancer among Koreans. J Korean Med Sci. 1991 Mar;6(1):7-14.

9. Nomura AM, Stemmermann GN, Chyou PH. Gastric cancer among the Japanese in Hawaii. Jpn J Cancer Res. 1995 Oct;86(10):916-23.

10. Kranenbarg EK, van de Velde CJ. Gastric cancer in the elderly. Eur J Surg Oncol. 1998;24(5):384-90.

11. Gore RM. Gastric cancer. Clinical and pathologic features. Radiol Clin North Am. 1997 Mar;35(2):295-310.

12. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. CA Cancer J Clin. 1997;47(1):5-27.

13. McMichael AJ, McCall MG, Hartshorne JM, Woodings TL. Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. Int J Cancer. 1980 Apr 15;25(4):431-7.

14. Dolan K, Sutton R, Walker SJ, Morris AI, Campbell F, Williams EM. New classification of oesophageal and gastric carcinomas derived from changing patterns in epidemiology. Br J Cancer. 1999;80(5):834-42.

15. Abdi-Rad A, Ghaderi-sohi S, Nadimi-Barfroosh H, Emami S. Trend in incidence of gastric adenocarcinoma by tumor location from 1969-2004: a study in one referral center in Iran. Diagn Pathol. 2006;1:5.

16. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. JAMA. 1991 Mar 13;265(10):1287-9.

17. Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. Surg Oncol Clin N Am. 2002 Apr;11(2):235-56.

18. El-Serag HB, Mason AC, Petersen N, Key CR. Epidemiological differences between adenocarcinoma of the oesophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA. Gut. 2002 Mar;50(3):368-72.

19. Lauren P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965;64:31-49.

20. Correa P, Sasano N, Stemmermann GN, Haenszel W. Pathology of gastric carcinoma in Japanese populations: comparisons between Miyagi prefecture, Japan, and Hawaii. J Natl Cancer Inst. 1973 Nov;51(5):1449-59.

21. Munoz N, Correa P, Cuello C, Duque E. Histologic types of gastric carcinoma in high- and low-risk areas. Int J Cancer. 1968 Nov 15;3(6):809-18.

22. Kaneko S, Yoshimura T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. Br J Cancer. 2001 Feb 2;84(3):400-5.

23. Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. Arch Pathol Lab Med. 2004 Jul;128(7):765-70.

24. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. Lancet. 1975 Jul 12;2(7924):58-60.

25. Oliveira C, Seruca R, Carneiro F. Genetics, pathology, and clinics of familial gastric cancer. Int J Surg Pathol. 2006 Jan;14(1):21-33.

26. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2002 Jan-Feb;52(1):23-47.

27. Verdecchia A, Corazziari I, Gatta G, Lisi D, Faivre J, Forman D. Explaining gastric cancer survival differences among European countries. Int J Cancer. 2004 May 1;109(5):737-41.

28. Howe HL, Wu X, Ries LA, Cokkinides V, Ahmed F, Jemal A, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. Cancer. 2006 Oct 15;107(8):1711-42.

29. Miller BA, Chu KC, Hankey BF, Ries LA. Cancer incidence and mortality patterns among specific Asian and Pacific Islander populations in the U.S. Cancer Causes Control. 2008 Apr;19(3):227-56.

30. Wingo PA, Cardinez CJ, Landis SH, Greenlee RT, Ries LA, Anderson RN, et al. Long-term trends in cancer mortality in the United States, 1930-1998. Cancer. 2003 Jun 15;97(12 Suppl):3133-275.

31. Hrvatski zavod za javno zdravstsvo. bilten. 2007;32.

32. Ramon JM, Serra L, Cerdo C, Oromi J. Dietary factors and gastric cancer risk. A case-control study in Spain. Cancer. 1993 Mar 1;71(5):1731-5.

33. Shikata K, Kiyohara Y, Kubo M, Yonemoto K, Ninomiya T, Shirota T, et al. A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: the Hisayama study. Int J Cancer. 2006 Jul 1;119(1):196-201.

34. Huang XE, Tajima K, Hamajima N, Kodera Y, Yamamura Y, Xiang J, et al. Effects of dietary, drinking, and smoking habits on the prognosis of gastric cancer. Nutr Cancer. 2000;38(1):30-6.

35. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. Cancer. 1992 Jul 1;70(1):50-5.

36. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. N Engl J Med. 2001 Jun 21;344(25):1904-9.

37. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. Cancer. 1998 Nov 15;83(10):2049-53.

38. Falchetti M, Saieva C, Lupi R, Masala G, Rizzolo P, Zanna I, et al. Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. Hum Pathol. 2008 Jun;39(6):925-32.

39. Ascano JJ, Frierson H, Jr., Moskaluk CA, Harper JC, Roviello F, Jackson CE, et al. Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer. Mod Pathol. 2001 Oct;14(10):942-9.

40. Dussaulx-Garin L, Blayau M, Pagenault M, Le Berre-Heresbach N, Raoul JL, Campion JP, et al. A new mutation of E-cadherin gene in familial gastric linitis plastica cancer with extra-digestive dissemination. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2001 Jun;13(6):711-5.

41. Machado JC, Soares P, Carneiro F, Rocha A, Beck S, Blin N, et al. E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas. Lab Invest. 1999 Apr;79(4):459-65.

42. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. Gastroenterology. 2001 Dec;121(6):1348-53.

43. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. J Med Genet. 1999 Dec;36(12):873-80.

44. Norton JA, Ham CM, Van Dam J, Jeffrey RB, Longacre TA, Huntsman DG, et al. CDH1 truncating mutations in the E-cadherin gene: an indication for total gastrectomy to treat hereditary diffuse gastric cancer. Ann Surg. 2007 Jun;245(6):873-9.

45. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. Mol Pathol. 2000 Oct;53(5):255-61.

46. Sudo M, Chong JM, Sakuma K, Ushiku T, Uozaki H, Nagai H, et al. Promoter hypermethylation of E-cadherin and its abnormal expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. Int J Cancer. 2004 Mar 20;109(2):194-9.

47. Kapadia CR. Gastric atrophy, metaplasia, and dysplasia: a clinical perspective. J Clin Gastroenterol. 2003 May-Jun;36(5 Suppl):S29-36; discussion S61-2.

48. Townsend. Sabiston Textbook of Surgery:The Biological Basis of Modern Surgical Prfactise. 17 ed: Elsevier Saunders; 2004.

49. Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006 May 21;12(19):2979-90.

50. Eslick GD. Helicobacter pylori infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. World J Gastroenterol. 2006 May 21;12(19):2991-9.

51. Wu MS, Shun CT, Wang HP, Sheu JC, Lee WJ, Wang TH, et al. Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and Helicobacter pylori infection. Gastroenterology. 1997;112(5):1457-65.

52. Meining A, Morgner A, Miehlke S, Bayerdorffer E, Stolte M. Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: a reality or merely an hypothesis? Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2001;15(6):983-98.

53. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. Cancer Res. 1992 Dec 15;52(24):6735-40.

54. Kirchner T, Muller S, Hattori T, Mukaisyo K, Papadopoulos T, Brabletz T, et al. Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. Virchows Arch. 2001;439(4):512-22.

55. Matsukura N, Suzuki K, Kawachi T, Aoyagi M, Sugimura T, Kitaoka H, et al. Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation to complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas. J Natl Cancer Inst. 1980 Aug;65(2):231-40.

56. Filipe MI, Munoz N, Matko I, Kato I, Pompe-Kirn V, Jutersek A, et al. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. Int J Cancer. 1994 May 1;57(3):324-9.

57. Gutierrez-Gonzalez L, Wright NA. Biology of intestinal metaplasia in 2008: more than a simple phenotypic alteration. Dig Liver Dis. 2008 Jul;40(7):510-22.

58. Silva E, Teixeira A, David L, Carneiro F, Reis CA, Sobrinho-Simoes J, et al. Mucins as key molecules for the classification of intestinal metaplasia of the stomach. Virchows Arch. 2002 Mar;440(3):311-7.

59. Samloff IM, Varis K, Ihamaki T, Siurala M, Rotter JI. Relationships among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II, and gastric mucosal histology. A study in relatives of patients with pernicious anemia. Gastroenterology. 1982 Jul;83(1 Pt 2):204-9.

60. di Mario F, Cavallaro LG. Non-invasive tests in gastric diseases. Dig Liver Dis. 2008 Jul;40(7):523-30.

61. Watanabe Y, Kurata JH, Mizuno S, Mukai M, Inokuchi H, Miki K, et al. Helicobacter pylori infection and gastric cancer. A nested case-control study in a rural area of Japan. Dig Dis Sci. 1997 Jul;42(7):1383-7.

62. Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, et al. Gastric dysplasia: the Padova international classification. Am J Surg Pathol. 2000 Feb;24(2):167-76.

63. Yamaguchi H, Goldenring JR, Kaminishi M, Lee JR. Identification of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) in remnant gastric cancer and surveillance postgastrectomy biopsies. Dig Dis Sci. 2002 Mar;47(3):573-8.

64. de Vries AC, Haringsma J, Kuipers EJ. The detection, surveillance and treatment of premalignant gastric lesions related to Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2007 Feb;12(1):1-15.

65. Rogers AB, Fox JG. Inflammation and Cancer. I. Rodent models of infectious gastrointestinal and liver cancer. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Mar;286(3):G361-6.

66. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. Science. 2004 Nov 26;306(5701):1568-71.

67. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. Nat Rev Cancer. 2005 Sep;5(9):744-9.

68. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984 Jun 16;1(8390):1311-5.

69. Blaser MJ. The versatility of Helicobacter pylori in the adaptation to the human stomach. J Physiol Pharmacol. 1997 Sep;48(3):307-14.

70. Bardhan PK. Epidemiological features of Helicobacter pylori infection in developing countries. Clin Infect Dis. 1997 Nov;25(5):973-8.

71. Tepes B. Can gastric cancer be prevented? J Physiol Pharmacol. 2009 Dec;60 Suppl 7:71-7.

72. Parsonnet J. The incidence of Helicobacter pylori infection. Aliment Pharmacol Ther. 1995;9 Suppl 2:45-51.

73. Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. Epidemiol Rev. 1986;8:1-27.

74. Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for Helicobacter pylori infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet. 1991 Jun 22;337(8756):1503-6.

75. Hopkins RJ, Vial PA, Ferreccio C, Ovalle J, Prado P, Sotomayor V, et al. Seroprevalence of Helicobacter pylori in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. J Infect Dis. 1993 Jul;168(1):222-6.

76. Buckley MJ, O'Shea J, Grace A, English L, Keane C, Hourihan D, et al. A community-based study of the epidemiology of Helicobacter pylori infection and associated asymptomatic gastroduodenal pathology. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1998 May;10(5):375-9.

77. Webb PM, Knight T, Greaves S, Wilson A, Newell DG, Elder J, et al. Relation between infection with Helicobacter pylori and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life. BMJ. 1994 Mar 19;308(6931):750-3.

78. Kurosawa M, Kikuchi S, Inaba Y, Ishibashi T, Kobayashi F. Helicobacter pylori infection among Japanese children. J Gastroenterol Hepatol. 2000 Dec;15(12):1382-5.

79. Olmos JA, Rios H, Higa R. Prevalence of Helicobacter pylori infection in Argentina: results of a nationwide epidemiologic study. Argentinean Hp Epidemiologic Study Group. J Clin Gastroenterol. 2000 Jul;31(1):33-7.

80. Goodman KJ, Correa P. Transmission of Helicobacter pylori among siblings. Lancet. 2000 Jan 29;355(9201):358-62.

81. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med. 1991 Oct 17;325(16):1127-31.

82. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, et al. Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. BMJ. 1991 Jun 1;302(6788):1302-5.

83. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med. 1991 Oct 17;325(16):1132-6.

84. An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. Lancet. 1993 May 29;341(8857):1359-62.

85. Internarional Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

Schistosomes, Liver Flukes, and Helicobacter Pylori. Lyon:International Agency for Research on Cancer. 1994:177-240.

86. Kato S, Matsukura N, Tsukada K, Matsuda N, Mizoshita T, Tsukamoto T, et al. Helicobacter pylori infection-negative gastric cancer in Japanese hospital patients: incidence and pathological characteristics. Cancer Sci. 2007 Jun;98(6):790-4.

87. Wang C, Yuan Y, Hunt RH. The association between Helicobacter pylori infection and early gastric cancer: a meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2007 Aug;102(8):1789-98.

88. Brenner H, Arndt V, Stegmaier C, Ziegler H, Rothenbacher D. Is Helicobacter pylori infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? Am J Epidemiol. 2004 Feb 1;159(3):252-8.

89. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis. J Physiol Pharmacol. 2009 Sep;60(3):3-21.

90. Parsonnet J. Helicobacter pylori and gastric cancer. Gastroenterol Clin North Am. 1993 Mar;22(1):89-104.

91. Salih BA, Abasiyanik MF, Saribasak H, Huten O, Sander E. A follow-up study on the effect of Helicobacter pylori eradication on the severity of gastric histology. Dig Dis Sci. 2005 Aug;50(8):1517-22.

92. Mera R, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuelo MB, Camargo MC, et al. Long term follow up of patients treated for Helicobacter pylori infection. Gut. 2005 Nov;54(11):1536-40.

93. Arkkila PE, Seppala K, Farkkila MA, Veijola L, Sipponen P. Helicobacter pylori eradication in the healing of atrophic gastritis: a one-year prospective study. Scand J Gastroenterol. 2006 Jul;41(7):782-90.

94. Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S, et al. Effect of eradication of Helicobacter pylori on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. Lancet. 2008 Aug 2;372(9636):392-7.

95. Suzuki H, Iwasaki E, Hibi T. Helicobacter pylori and gastric cancer. Gastric Cancer. 2009;12(2):79-87.

96. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med. 2001 Sep 13;345(11):784-9.

97. Forman D, Pisani P. Gastric cancer in Japan--honing treatment, seeking causes. N Engl J Med. 2008 Jul 31;359(5):448-51.

98. Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology. 2003 Dec;125(6):1636-44.

99. Siman JH, Engstrand L, Berglund G, Forsgren A, Floren CH. Helicobacter pylori and CagA seropositivity and its association with gastric and oesophageal carcinoma. Scand J Gastroenterol. 2007 Aug;42(8):933-40.

100. Brzozowski T, Konturek PC, Mierzwa M, Drozdowicz D, Bielanski W, Kwiecien S, et al. Effect of probiotics and triple eradication therapy on the cyclooxygenase (COX)-2 expression, apoptosis, and functional gastric mucosal impairment in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. Helicobacter. 2006 Feb;11(1):10-20.

101. Hansen S, Melby KK, Aase S, Jellum E, Vollset SE. Helicobacter pylori infection and risk of cardia cancer and non-cardia gastric cancer. A nested case-control study. Scand J Gastroenterol. 1999 Apr;34(4):353-60.

102. Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, et al. An inverse relation between cagA+ strains of Helicobacter pylori infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. Cancer Res. 1998 Feb 15;58(4):588-90.

103. Warburton-Timms VJ, Charlett A, Valori RM, Uff JS, Shepherd NA, Barr H, et al. The significance of cagA(+) Helicobacter pylori in reflux oesophagitis. Gut. 2001 Sep;49(3):341-6.

104. El-Serag HB, Sonnenberg A, Jamal MM, Inadomi JM, Crooks LA, Feddersen RM. Corpus gastritis is protective against reflux oesophagitis. Gut. 1999 Aug;45(2):181-5.

105. Koike T, Ohara S, Sekine H, Iijima K, Abe Y, Kato K, et al. Helicobacter pylori infection prevents erosive reflux oesophagitis by decreasing gastric acid secretion. Gut. 2001 Sep;49(3):330-4.

106. Raghunath A, Hungin AP, Wooff D, Childs S. Prevalence of Helicobacter pylori in patients with gastro-oesophageal reflux disease: systematic review. BMJ. 2003 Apr 5;326(7392):737.

107. Labenz J, Malfertheiner P. Helicobacter pylori in gastro-oesophageal reflux disease: causal agent, independent or protective factor? Gut. 1997 Sep;41(3):277-80.

108. Bytzer P, Aalykke C, Rune S, Weywadt L, Gjorup T, Eriksen J, et al. Eradication of Helicobacter pylori compared with long-term acid suppression in duodenal ulcer disease. A randomized trial with 2-year follow-up. The Danish Ulcer Study Group. Scand J Gastroenterol. 2000 Oct;35(10):1023-32.

109. Vakil N, Hahn B, McSorley D. Recurrent symptoms and gastro-oesophageal reflux disease in patients with duodenal ulcer treated for Helicobacter pylori infection. Aliment Pharmacol Ther. 2000 Jan;14(1):45-51.

110. McColl KE, Dickson A, El-Nujumi A, El-Omar E, Kelman A. Symptomatic benefit 1-3 years after H. pylori eradication in ulcer patients: impact of gastroesophageal reflux disease. Am J Gastroenterol. 2000 Jan;95(1):101-5.

111. Manes G, Mosca S, De Nucci C, Lombardi G, Lioniello M, Balzano A. High prevalence of reflux symptoms in duodenal ulcer patients who develop gastro-oesophageal

reflux disease after curing Helicobacter pylori infection. Dig Liver Dis. 2001 Nov;33(8):665-70.

112. Befrits R, Sjostedt S, Odman B, Sorngard H, Lindberg G. Curing Helicobacter pylori infection in patients with duodenal ulcer does not provoke gastroesophageal reflux disease. Helicobacter. 2000 Dec;5(4):202-5.

113. Sasaki A, Haruma K, Manabe N, Tanaka S, Yoshihara M, Chayama K. Long-term observation of reflux oesophagitis developing after Helicobacter pylori eradication therapy. Aliment Pharmacol Ther. 2003 Jun 15;17(12):1529-34.

114. Laine L, Sugg J. Effect of Helicobacter pylori eradication on development of erosive esophagitis and gastroesophageal reflux disease symptoms: a post hoc analysis of eight double blind prospective studies. Am J Gastroenterol. 2002 Dec;97(12):2992-7.

115. Zhang C, Yamada N, Wu YL, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. Helicobacter pylori infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. World J Gastroenterol. 2005 Feb 14;11(6):791-6.

116. El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, et al. Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion. Gastroenterology. 1997 Jul;113(1):15-24.

117. Naylor GM, Gotoda T, Dixon M, Shimoda T, Gatta L, Owen R, et al. Why does Japan have a high incidence of gastric cancer? Comparison of gastritis between UK and Japanese patients. Gut. 2006 Nov;55(11):1545-52.

118. Correa P. Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996 Jun;5(6):477-81.

119. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. Campylobacter pylori virulence factors in gnotobiotic piglets. Infect Immun. 1989 Apr;57(4):1119-25.

120. Scott D, Weeks D, Melchers K, Sachs G. The life and death of Helicobacter pylori. Gut. 1998 Jul;43 Suppl 1:S56-60.

121. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature. 1997 Aug 7;388(6642):539-47.

122. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature. 1999 Jan 14;397(6715):176-80.

123. Vicari JJ, Peek RM, Falk GW, Goldblum JR, Easley KA, Schnell J, et al. The seroprevalence of cagA-positive Helicobacter pylori strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease. Gastroenterology. 1998 Jul;115(1):50-7.

124. Ito Y, Azuma T, Ito S, Miyaji H, Hirai M, Yamazaki Y, et al. Analysis and typing of the vacA gene from cagA-positive strains of Helicobacter pylori isolated in Japan. J Clin Microbiol. 1997 Jul;35(7):1710-4.

125. Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Fukuta K, Ohtani M, Ito Y, et al. Correlation between variation of the 3' region of the cagA gene in Helicobacter pylori and disease outcome in Japan. J Infect Dis. 2002 Dec 1;186(11):1621-30.

126. Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. Src is the kinase of the Helicobacter pylori CagA protein in vitro and in vivo. J Biol Chem. 2002 Mar 1;277(9):6775-8.

127. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science. 2000 Feb 25;287(5457):1497-500.

128. Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb 1;97(3):1263-8.

129. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA. Science. 2003 May 30;300(5624):1430-4.

130. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, et al. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. Oncogene. 2007 Jul 12;26(32):4617-26.

131. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. The inflammatory and immune response to Helicobacter pylori infection. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007;21(2):237-59.

132. Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S, et al. Helicobacter pylori induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. J Clin Pathol. 1995 Jan;48(1):41-5.

133. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. Nat Immunol. 2004 Nov;5(11):1166-74.

134. Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, Rudi J. Vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. Infect Immun. 2001 Aug;69(8):5080-7.

135. Yuan JP, Li T, Chen HB, Li ZH, Yang GZ, Hu BY, et al. Analysis of gene expression profile in gastric cancer cells stimulated with Helicobacter pylori isogenic strains. J Med Microbiol. 2004 Oct;53(Pt 10):965-74.

136. Ilver D, Barone S, Mercati D, Lupetti P, Telford JL. Helicobacter pylori toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. Cell Microbiol. 2004 Feb;6(2):167-74.

137. Cover TL, Blanke SR. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat Rev Microbiol. 2005 Apr;3(4):320-32.

138. Wen S, Moss SF. Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. Cancer Lett. 2009 Sep 8;282(1):1-8.

139. Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of Helicobacter pylori oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. Gastroenterology. 2002 Aug;123(2):414-24.

140. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science. 1993 Dec 17;262(5141):1892-5.

141. Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N, et al. Functional adaptation of BabA, the H. pylori ABO blood group antigen binding adhesin. Science. 2004 Jul 23;305(5683):519-22.

142. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, et al. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science. 1998 Jan 16;279(5349):373-7.

143. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, et al. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science. 2002 Jul 26;297(5581):573-8.

144. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, et al. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Oct 26;96(22):12778-83.

145. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature. 2000 Mar 23;404(6776):398-402.

146. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. Gastroenterology. 2003 May;124(5):1193-201.

147. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. J Physiol Pharmacol. 2006 Sep;57 Suppl 3:51-65.

148. Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecien S, Konturek SJ, Pajdo R, Drozdowicz D, et al. Triple eradication therapy counteracts functional impairment associated with Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils. J Physiol Pharmacol. 2003 Mar;54(1):33-51.

149. Konturek PC, Kania J, Kukharsky V, Ocker S, Hahn EG, Konturek SJ. Influence of gastrin on the expression of cyclooxygenase-2, hepatocyte growth factor and apoptosis-related proteins in gastric epithelial cells. J Physiol Pharmacol. 2003 Mar;54(1):17-32.

150. Ito M, Tanaka S, Maeda M, Takamura A, Tatsugami M, Wada Y, et al. Role of the gastrin-gastrin receptor system in the expansive growth of human gastric neoplasms. Digestion. 2008;78(2-3):163-70.

151. Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, et al. Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. World J Gastroenterol. 2003 Feb;9(2):246-9.

152. Iwamoto J, Mizokami Y, Takahashi K, Matsuoka T, Matsuzaki Y. The effects of cyclooxygenase2-prostaglandinE2 pathway on Helicobacter pylori-induced urokinase-type plasminogen activator system in the gastric cancer cells. Helicobacter. 2008 Jun;13(3):174-82.

153. Yamac D, Ayyildiz T, Coskun U, Akyurek N, Dursun A, Seckin S, et al. Cyclooxygenase-2 expression and its association with angiogenesis, Helicobacter pylori, and clinicopathologic characteristics of gastric carcinoma. Pathol Res Pract. 2008;204(8):527-36.

154. Walduck AK, Weber M, Wunder C, Juettner S, Stolte M, Vieth M, et al. Identification of novel cyclooxygenase-2-dependent genes in Helicobacter pylori infection in vivo. Mol Cancer. 2009;8:22.

155. Li Q, Liu N, Shen B, Zhou L, Wang Y, Sun J, et al. Helicobacter pylori enhances cyclooxygenase 2 expression via p38MAPK/ATF-2 signaling pathway in MKN45 cells. Cancer Lett. 2009 Jun 8;278(1):97-103.

156. Chen JH, Liu TY, Wu CW, Chi CW. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for treatment of advanced gastric cancer: cyclooxygenase-2 is involved in hepatocyte growth factor mediated tumor development and progression. Med Hypotheses. 2001 Oct;57(4):503-5.

157. Seo JH, Kim H, Kim KH. Cyclooxygenase-2 expression by transcription factors in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells: comparison between HP 99 and NCTC 11637. Ann N Y Acad Sci. 2002 Nov;973:477-80.

158. Takafuji VA, Evans A, Lynch KR, Roche JK. PGE(2) receptors and synthesis in human gastric mucosa: perturbation in cancer. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2002 Jan;66(1):71-81.

159. Konturek PC, Bielanski W, Bobrzynski A, Hahn EG, Konturek SJ. Gastric mucosal expression and luminal release of growth factors in gastric carcinoma and duodenal ulcer patients before and after eradication of Helicobacter pylori. J Physiol Pharmacol. 1997 Sep;48(3):375-82.

160. Konturek PC, Konturek SJ, Sulekova Z, Meixner H, Bielanski W, Starzynska T, et al. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, apoptosis related

proteins Bax and Bcl-2, and gastrin in human gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther. 2001 Jul;15(7):989-99.

161. Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D, Katsinelos P. New aspects of Helicobacter pylori infection involvement in gastric oncogenesis. J Surg Res. 2008 May 1;146(1):149-58.

162. Tahara E. Abnormal growth factor/cytokine network in gastric cancer. Cancer Microenviron. 2008 Dec;1(1):85-91.

163. Kabir S. Effect of Helicobacter pylori eradication on incidence of gastric cancer in human and animal models: underlying biochemical and molecular events. Helicobacter. 2009 Jun;14(3):159-71.

164. Wong BC, Jiang X, Fan XM, Lin MC, Jiang SH, Lam SK, et al. Suppression of RelA/p65 nuclear translocation independent of IkappaB-alpha degradation by cyclooxygenase-2 inhibitor in gastric cancer. Oncogene. 2003 Feb 27;22(8):1189-97.

165. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. Arch Biochem Biophys. 2003 Sep 1;417(1):3-11.

166. Yamaguchi K, Saito H, Oro S, Tatebe S, Ikeguchi M, Tsujitani S. Expression of inducible nitric oxide synthase is significantly correlated with expression of vascular endothelial growth factor and dendritic cell infiltration in patients with advanced gastric carcinoma. Oncology. 2005;68(4-6):471-8.

167. Heller A. Apoptosis-inducing high (.)NO concentrations are not sustained either in nascent or in developed cancers. ChemMedChem. 2008 Oct;3(10):1493-9.

168. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. Gastroenterology. 2007 Aug;133(2):659-72.

169. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. Ann Surg. 2005 Jan;241(1):27-39.

170. Maruyama K, Okabayashi K, Kinoshita T. Progress in gastric cancer surgery in Japan and its limits of radicality. World J Surg. 1987 Aug;11(4):418-25.

171. Kunisaki C, Shimada H, Nomura M, Matsuda G, Otsuka Y, Ono H, et al. Distribution of lymph node metastasis in gastric carcinoma. Hepatogastroenterology. 2006 May-Jun;53(69):468-72.

172. Nakamura K, Ueyama T, Yao T, Xuan ZX, Ambe K, Adachi Y, et al. Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Findings in 10,000 patients who underwent primary gastrectomy. Cancer. 1992 Sep 1;70(5):1030-7.

173. Noguchi Y, Yoshikawa T, Tsuburaya A, Motohashi H, Karpeh MS, Brennan MF. Is gastric carcinoma different between Japan and the United States? Cancer. 2000 Dec 1;89(11):2237-46.

174. Otsuji E, Toma A, Kobayashi S, Okamoto K, Hagiwara A, Yamagishi H. Outcome of prophylactic radical lymphadenectomy with gastrectomy in patients with early gastric carcinoma without lymph node metastasis. Cancer. 2000 Oct 1;89(7):1425-30.

175. Shimada S, Yagi Y, Honmyo U, Shiomori K, Yoshida N, Ogawa M. Involvement of three or more lymph nodes predicts poor prognosis in submucosal gastric carcinoma. Gastric Cancer. 2001;4(2):54-9.

176. Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, van de Velde CJ, Welvaart K, Songun I, et al. Extended lymph-node dissection for gastric cancer. N Engl J Med. 1999 Mar 25;340(12):908-14.

177. Cuschieri A, Weeden S, Fielding J, Bancewicz J, Craven J, Joypaul V, et al. Patient survival after D1 and D2 resections for gastric cancer: long-term results of the MRC randomized surgical trial. Surgical Co-operative Group. Br J Cancer. 1999 Mar;79(9-10):1522-30.

178. Hartgrink HH, van de Velde CJ, Putter H, Bonenkamp JJ, Klein Kranenbarg E, Songun I, et al. Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial. J Clin Oncol. 2004 Jun 1;22(11):2069-77.

179. Hundahl SA, Phillips JL, Menck HR. The National Cancer Data Base Report on poor survival of U.S. gastric carcinoma patients treated with gastrectomy: Fifth Edition American Joint Committee on Cancer staging, proximal disease, and the "different disease" hypothesis. Cancer. 2000 Feb 15;88(4):921-32.

180. Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ, Roder JD. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. Ann Surg. 1998 Oct;228(4):449-61.

181. Otsuji E, Toma A, Kobayashi S, Cho H, Okamoto K, Hagiwara A, et al. Long-term benefit of extended lymphadenectomy with gastrectomy in distally located early gastric carcinoma. Am J Surg. 2000 Aug;180(2):127-32.

182. Marubini E, Bozzetti F, Miceli R, Bonfanti G, Gennari L. Lymphadenectomy in gastric cancer: prognostic role and therapeutic implications. Eur J Surg Oncol. 2002 Jun;28(4):406-12.

183. Roukos DH. Extended (D2) lymph node dissection for gastric cancer: do patients benefit? Ann Surg Oncol. 2000 May;7(4):253-5.

184. Roukos D, Paraschou P. Extended lymph-node dissection in gastric cancer: standard, selective or unnecessary procedure? Hepatogastroenterology. 2000 May-Jun;47(33):904-6.

185. Roukos DH. Relevant prognostic factors in gastric cancer. Ann Surg. 2000 Nov;232(5):719-20.

186. Di Martino N, Izzo G, Cosenza A, Vicenzo L, Monaco L, Torelli F, et al. [Total gastrectomy for gastric cancer: can the type of lymphadenectomy condition the long-term results?]. Suppl Tumori. 2005 May-Jun;4(3):S84-5.

187. Yu W, Choi GS, Chung HY. Randomized clinical trial of splenectomy versus splenic preservation in patients with proximal gastric cancer. Br J Surg. 2006 May;93(5):559-63.

188. Biffi R, Chiappa A, Luca F, Pozzi S, Lo Faso F, Cenciarelli S, et al. Extended lymph node dissection without routine spleno-pancreatectomy for treatment of gastric cancer: low morbidity and mortality rates in a single center series of 250 patients. J Surg Oncol. 2006 Apr 1;93(5):394-400.

189. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Jr., Winchester D, Osteen R. Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons. Ann Surg. 1993 Nov;218(5):583-92.

190. Janunger KG, Hafstrom L, Nygren P, Glimelius B. A systematic overview of chemotherapy effects in gastric cancer. Acta Oncol. 2001;40(2-3):309-26.

191. Yonemura Y, Sawa T, Kinoshita K, Matsuki N, Fushida S, Tanaka S, et al. Neoadjuvant chemotherapy for high-grade advanced gastric cancer. World J Surg. 1993 Mar-Apr;17(2):256-61; discussion 61-2.

192. Earle CC, Maroun J, Zuraw L. Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable gastric cancer? A practice guideline. Can J Surg. 2002 Dec;45(6):438-46.

193. Abe N, Mori T, Takeuchi H, Yoshida T, Ohki A, Ueki H, et al. Laparoscopic lymph node dissection after endoscopic submucosal dissection: a novel and minimally invasive approach to treating early-stage gastric cancer. Am J Surg. 2005 Sep;190(3):496-503.

194. Fujishiro M, Yahagi N, Nakamura M, Kakushima N, Kodashima S, Ono S, et al. Successful outcomes of a novel endoscopic treatment for GI tumors: endoscopic submucosal

dissection with a mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid, glycerin, and sugar. Gastrointest Endosc. 2006 Feb;63(2):243-9.

195. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. Cancer research. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. 2004 Oct 15;64(20):7183-90.

196. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.

197. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. Cell. 1997 Nov 14;91(4):443-6.

198. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Jun;3(6):401-10.

199. Zapata JM, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. Granzyme release and caspase activation in activated human T-lymphocytes. J Biol Chem. 1998 Mar 20;273(12):6916-20.

200. Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, et al. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. Mol Cell Biol. 2000 Jun;20(11):3781-94.

201. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. J Biol Chem. 1999 Jun 18;274(25):17941-5.

202. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell. 1997 Aug 8;90(3):405-13.

203. Chang HY, Yang X, Baltimore D. Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 16;96(4):1252-6.

204. Berglund H, Olerenshaw D, Sankar A, Federwisch M, McDonald NQ, Driscoll PC. The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain. J Mol Biol. 2000 Sep 8;302(1):171-88.

205. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, et al. A unified model for apical caspase activation. Mol Cell. 2003 Feb;11(2):529-41.

206. Kang JJ, Schaber MD, Srinivasula SM, Alnemri ES, Litwack G, Hall DJ, et al. Cascades of mammalian caspase activation in the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 1999 Jan 29;274(5):3189-98.

207. Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, et al. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. J Biol Chem. 1998 Oct 16;273(42):27084-90.

208. Tang D, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. J Biol Chem. 2000 Mar 31;275(13):9303-7.

209. Kulik G, Carson JP, Vomastek T, Overman K, Gooch BD, Srinivasula S, et al. Tumor necrosis factor alpha induces BID cleavage and bypasses antiapoptotic signals in prostate cancer LNCaP cells. Cancer Res. 2001 Mar 15;61(6):2713-9.

210. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J Biol Chem. 1999 Jan 8;274(2):1156-63.

211. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. J Virol. 1993 Apr;67(4):2168-74.

212. Uren AG, Coulson EJ, Vaux DL. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. Trends Biochem Sci. 1998 May;23(5):159-62.

213. Fraser AG, James C, Evan GI, Hengartner MO. Caenorhabditis elegans inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. Curr Biol. 1999 Mar 25;9(6):292-301.

214. Li F, Flanary PL, Altieri DC, Dohlman HG. Cell division regulation by BIR1, a member of the inhibitor of apoptosis family in yeast. J Biol Chem. 2000 Mar 10;275(10):6707-11.

215. Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, van Driel R, Vaux DL, et al. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 31;96(18):10170-5.

216. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. Genome Biol. 2001;2(7):REVIEWS3009.

217. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. EMBO J. 1996 Jun 3;15(11):2685-94.

218. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. EMBO J. 1999 Oct 1;18(19):5242-51.

219. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. Cell. 1995 Jan 13;80(1):167-78.

220. Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, Fetni R, Johnston A, Davoodi J, et al. The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. J Neurosci. 2002 Mar 15;22(6):2035-43.

221. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. Nature. 1997 Jul 17;388(6639):300-4.

222. Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, et al. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. Cancer Res. 2002 May 1;62(9):2462-7.

223. Temme A, Rieger M, Reber F, Lindemann D, Weigle B, Diestelkoetter-Bachert P, et al. Localization, dynamics, and function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. Mol Biol Cell. 2003 Jan;14(1):78-92.

224. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature. 1998 Dec 10;396(6711):580-4.

225. Levkau B, Garton KJ, Ferri N, Kloke K, Nofer JR, Baba HA, et al. xIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. Circ Res. 2001 Feb 16;88(3):282-90.

226. Claveria C, Caminero E, Martinez AC, Campuzano S, Torres M. GH3, a novel proapoptotic domain in Drosophila Grim, promotes a mitochondrial death pathway. EMBO J. 2002 Jul 1;21(13):3327-36.

227. Srinivasula SM, Datta P, Kobayashi M, Wu JW, Fujioka M, Hegde R, et al. sickle, a novel Drosophila death gene in the reaper/hid/grim region, encodes an IAP-inhibitory protein. Curr Biol. 2002 Jan 22;12(2):125-30.

228. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell. 2000 Jul 7;102(1):43-53.

229. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell. 2000 Jul 7;102(1):33-42.

230. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. J Biol Chem. 2002 Jan 4;277(1):445-54.

231. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. Mol Cell. 2001 Sep;8(3):613-21.

232. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? Mol Cell. 2008 Apr 25;30(2):123-35.

233. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. Nat Rev Cancer. 2003 Jan;3(1):46-54.

234. Altieri DC. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. Mol Cancer Ther. [Research Support, N.I.H., Extramural

Review]. 2006 Mar;5(3):478-82.

235. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? Int J Cancer. 2005 Apr 20;114(4):509-12.

236. Engels K, Knauer SK, Metzler D, Simf C, Struschka O, Bier C, et al. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. J Pathol. 2007 Apr;211(5):532-40.

237. Li F. Survivin study: what is the next wave? J Cell Physiol. 2003;197(1):8-29.

238. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. Nat Struct Biol. 2000 Jul;7(7):602-8.

239. Sampath J, Pelus LM. Alternative splice variants of survivin as potential targets in cancer. Curr Drug Discov Technol. 2007 Oct;4(3):174-91.

240. Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. Curr Opin Cell Biol. 2006 Dec;18(6):609-15.

241. Lens SM, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. Curr Opin Cell Biol. 2006 Dec;18(6):616-22.

242. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. Blood. 2003 Feb 15;101(4):1535-42.

243. Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. J Cell Sci. 2000 Dec;113 Pt 23:4363-71.

244. Vong QP, Cao K, Li HY, Iglesias PA, Zheng Y. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. Science. 2005 Dec 2;310(5753):1499-504.

245. O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. Cancer Cell. 2002 Jul;2(1):43-54.

246. Wheatley SP, Barrett RM, Andrews PD, Medema RH, Morley SJ, Swedlow JR, et al. Phosphorylation by aurora-B negatively regulates survivin function during mitosis. Cell Cycle. 2007 May 15;6(10):1220-30.

247. Dohi T, Xia F, Altieri DC. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. Mol Cell. 2007 Jul 6;27(1):17-28.

248. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. Am J Pathol. 1998 Jan;152(1):43-9.

249. Jiang Y, de Bruin A, Caldas H, Fangusaro J, Hayes J, Conway EM, et al. Essential role for survivin in early brain development. J Neurosci. 2005 Jul 27;25(30):6962-70.

250. Leung CG, Xu Y, Mularski B, Liu H, Gurbuxani S, Crispino JD. Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. J Exp Med. 2007 Jul 9;204(7):1603-11.

251. Xing Z, Conway EM, Kang C, Winoto A. Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis. J Exp Med. 2004 Jan 5;199(1):69-80.

252. Okada H, Bakal C, Shahinian A, Elia A, Wakeham A, Suh WK, et al. Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. J Exp Med. 2004 Feb 2;199(3):399-410.

253. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. Mol Cancer Ther. 2006 May;5(5):1087-98.

254. Altieri DC. New wirings in the survivin networks. Oncogene. [Research Support, N.I.H., Extramural

Review]. 2008 Oct 20;27(48):6276-84.

255. Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, Minematsu T, Shirasuna K, Matsuhisa A, et al. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. Cancer Res. 2007 Sep 1;67(17):8014-21.

256. Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, et al. Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. J Clin Oncol. 2008 Nov 10;26(32):5198-203.

257. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, et al. Regulation of survivin function by Hsp90. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 25;100(24):13791-6.

258. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. J Biol Chem. 2008 Feb 22;283(8):5188-94.

259. Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC. Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. Cell. 2007 Oct 19;131(2):257-70.

260. Knauer SK, Kramer OH, Knosel T, Engels K, Rodel F, Kovacs AF, et al. Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. FASEB J. 2007 Jan;21(1):207-16.

261. Hetzer M, Gruss OJ, Mattaj IW. The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly. Nat Cell Biol. 2002 Jul;4(7):E177-84.

262. Xia F, Lee CW, Altieri DC. Tumor cell dependence on Ran-GTP-directed mitosis. Cancer Res. 2008 Mar 15;68(6):1826-33.

263. Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. Nat Clin Pract Oncol. 2006 Aug;3(8):448-57.

264. Jonkers J, Berns A. Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. Cancer Cell. 2004 Dec;6(6):535-8.

265. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. Biochemistry. 2001 Jan 30;40(4):1117-23.

266. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. Cancer Res. 1998 Dec 1;58(23):5315-20.

267. Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, et al. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. Blood. 2000 Dec 1;96(12):4002-3.

268. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. EMBO J. 2003 Jun 2;22(11):2729-40.

269. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. EMBO Rep. 2006 Oct;7(10):988-94.

270. Speliotes EK, Uren A, Vaux D, Horvitz HR. The survivin-like C. elegans BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. Mol Cell. 2000 Aug;6(2):211-23.

271. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. Cancer Res. 1998;58(22):5071-4.

272. Chen WC, Liu Q, Fu JX, Kang SY. Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2004;10(19):2886-9.

273. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. Cancer. 2001;91(11):2026-32.

274. Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. World J Gastroenterol. 2003;9(5):974-7.

275. Zhang SQ, Qiang SY, Yang WB, Jiang JT, Ji ZZ. [Expression of survivin in different stages of carcinogenesis and progression of breast cancer]. Ai Zheng. 2004;23(6):697-700.

276. Mori N, Yamada Y, Hata T, Ikeda S, Yamasaki Y, Tomonaga M, et al. Expression of survivin in HTLV-I-infected T-cell lines and primary ATL cells. Biochem Biophys Res Commun. 2001;282(5):1110-3.

277. Xia F, Altieri DC. Mitosis-independent survivin gene expression in vivo and regulation by p53. Cancer Res. 2006 Apr 1;66(7):3392-5.

278. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. J Cell Sci. 2002 Feb 1;115(Pt 3):575-85.

279. Connell CM, Colnaghi R, Wheatley SP. Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective. J Biol Chem. 2008 Feb 8;283(6):3289-96.

280. Weis K. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. Cell. 2003 Feb 21;112(4):441-51.

281. Jeyaprakash AA, Klein UR, Lindner D, Ebert J, Nigg EA, Conti E. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. Cell. 2007 Oct 19;131(2):271-85.

282. Engelsma D, Rodriguez JA, Fish A, Giaccone G, Fornerod M. Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin. Traffic. 2007 Nov;8(11):1495-502.

283. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. British journal of cancer. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Review]. 2005 Jan 31;92(2):212-6.

284. Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. Cancer research. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. 2007 Jul 1;67(13):5999-6002.

285. Colnaghi R, Connell CM, Barrett RM, Wheatley SP. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. J Biol Chem. 2006 Nov 3;281(44):33450-6.

286. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. J Clin Invest. 2004 Oct;114(8):1117-27.

287. Klein UR, Nigg EA, Gruneberg U. Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. Mol Biol Cell. 2006 Jun;17(6):2547-58.

288. Vader G, Kauw JJ, Medema RH, Lens SM. Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. EMBO Rep. 2006 Jan;7(1):85-92.

289. Sandall S, Severin F, McLeod IX, Yates JR, 3rd, Oegema K, Hyman A, et al. A Bir1-Sli15 complex connects centromeres to microtubules and is required to sense kinetochore tension. Cell. 2006 Dec 15;127(6):1179-91.

290. Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. Cell. 2004 Jul 23;118(2):187-202.

291. Tulu US, Fagerstrom C, Ferenz NP, Wadsworth P. Molecular requirements for kinetochore-associated microtubule formation in mammalian cells. Curr Biol. 2006 Mar 7;16(5):536-41.

292. Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. J Cell Sci. 2003 Jul 15;116(Pt 14):2987-98.

293. Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, et al. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. Curr Biol. 2000 Nov 2;10(21):1319-28.

294. Wheatley SP, Henzing AJ, Dodson H, Khaled W, Earnshaw WC. Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. J Biol Chem. 2004 Feb 13;279(7):5655-60.

295. Delacour-Larose M, Thi MN, Dimitrov S, Molla A. Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis. Cell Cycle. 2007 Aug 1;6(15):1878-85.

296. Quimby BB, Dasso M. The small GTPase Ran: interpreting the signs. Curr Opin Cell Biol. 2003 Jun;15(3):338-44.

297. Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. Cancer Res. 2007 Jul 1;67(13):5999-6002.

298. Knauer SK, Bier C, Habtemichael N, Stauber RH. The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. EMBO Rep. 2006 Dec;7(12):1259-65.

299. Kang BH, Altieri DC. Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein. J Biol Chem. 2006 Aug 25;281(34):24721-7.

300. Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. Cell. 2003 Jan 10;112(1):41-50.

301. Yano M, Terada K, Mori M. AIP is a mitochondrial import mediator that binds to both import receptor Tom20 and preproteins. J Cell Biol. 2003 Oct 13;163(1):45-56.

302. Sun C, Nettesheim D, Liu Z, Olejniczak ET. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. Biochemistry. 2005 Jan 11;44(1):11-7.

303. Song K, Kim TM, Kim HJ, Kim JW, Kim HH, Kwon HB, et al. Molecular cloning and characterization of a novel inhibitor of apoptosis protein from Xenopus laevis. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jan 31;301(1):236-42.

304. Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. Oncogene. 2007 Nov 29;26(54):7569-75.

305. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. J Biol Chem. 2004 Aug 13;279(33):34087-90.

306. Pohl C, Jentsch S. Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE. Cell. 2008 Mar 7;132(5):832-45.

307. Rajalingam K, Sharma M, Paland N, Hurwitz R, Thieck O, Oswald M, et al. IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of C. trachomatis-infected cells. PLoS Pathog. 2006 Oct;2(10):e114.

308. Yamane K, Kinsella TJ. CK2 inhibits apoptosis and changes its cellular localization following ionizing radiation. Cancer Res. 2005 May 15;65(10):4362-7.

309. Ahmed K, Gerber DA, Cochet C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. Trends Cell Biol. 2002 May;12(5):226-30.

310. Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, et al. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. Mol Cell. 2001 Sep;8(3):601-11.

311. Krippner-Heidenreich A, Talanian RV, Sekul R, Kraft R, Thole H, Ottleben H, et al. Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic acid residue in position P1. Biochem J. 2001 Sep 15;358(Pt 3):705-15.

312. Barrett RM, Colnaghi R, Wheatley SP. Threonine 48 in the BIR domain of survivin is critical to its mitotic and anti-apoptotic activities and can be phosphorylated by CK2 in vitro. Cell Cycle. 2011 Feb 1;10(3):538-48.

313. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. Cancer Res. 1999;59(24):6097-102.

314. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, et al. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptopsis gene survivin. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Feb 13;314(3):902-7.

315. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, et al. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. Cell Death Differ. 2002;9(12):1334-42.

316. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S, et al. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. Br J Cancer. 2002;86(5):737-43.

317. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. Br J Cancer. 2005 Jan 31;92(2):212-6.

318. Suga K, Yamamoto T, Yamada Y, Miyatake S, Nakagawa T, Tanigawa N. Correlation between transcriptional expression of survivin isoforms and clinicopathological findings in human colorectal carcinomas. Oncol Rep. 2005 May;13(5):891-7.

319. Ling X, Yang J, Tan D, Ramnath N, Younis T, Bundy BN, et al. Differential expression of survivin-2B and survivin-DeltaEx3 is inversely associated with disease relapse and patient survival in non-small-cell lung cancer (NSCLC). Lung Cancer. 2005 Sep;49(3):353-61.

320. Li F, Ling X. Survivin study: an update of "what is the next wave"? J Cell Physiol. 2006 Sep;208(3):476-86.

321. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, et al. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. Cell Death Differ. 2002 Dec;9(12):1334-42.

322. Song Z, Wu M. Identification of a novel nucleolar localization signal and a degradation signal in Survivin-deltaEx3: a potential link between nucleolus and protein degradation. Oncogene. 2005 Apr 14;24(16):2723-34.

323. Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, et al. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. Oncogene. 2005 Mar 17;24(12):1994-2007.

324. Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. Mol Cancer. 2005;4(1):11.

325. Badran A, Yoshida A, Wano Y, Mutoh M, Imamura S, Yamashita T, et al. Expression of the anti-apoptotic gene survivin in myelodysplastic syndrome. Int J Oncol. 2003 Jan;22(1):59-64.

326. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. Distinct expression of Survivin splice variants in breast carcinomas. Int J Oncol. 2005 Oct;27(4):1151-7.

327. Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. Hum Pathol. 2001 Jan;32(1):119-25.

328. Shiozaki A, Kataoka K, Fujimura M, Yuki H, Sakai M, Saito S. Survivin inhibits apoptosis in cytotrophoblasts. Placenta. 2003 Jan;24(1):65-76.

329. Altieri DC, Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. Lab Invest. 1999 Nov;79(11):1327-33.

330. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. Lab Invest. 1999 Sep;79(9):1121-6.

331. Deguchi M, Shiraki K, Inoue H, Okano H, Ito T, Yamanaka T, et al. Expression of survivin during liver regeneration. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Sep 13;297(1):59-64.

332. Blanc-Brude OP, Yu J, Simosa H, Conte MS, Sessa WC, Altieri DC. Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. Nat Med. 2002 Sep;8(9):987-94.

333. Toronyi E, Hamar J, Magyar K, Szende B. Antiapoptotic effect of (-)-deprenyl in rat kidney after ischemia-reperfusion. Med Sci Monit. 2002 Feb;8(2):BR65-8.

334. Peng Q, Buz'Zard AR, Lau BH. Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro. Med Sci Monit. 2002 Aug;8(8):BR328-37.

335. Valenzuela M, Perez-Perez G, Corvalan AH, Carrasco G, Urra H, Bravo D, et al. Helicobacter pylori-induced loss of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin is linked to gastritis and death of human gastric cells. J Infect Dis. 2010 Oct 1;202(7):1021-30.

336. Fukuda S, Pelus LM. Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. Cell Cycle. 2002 Sep-Oct;1(5):322-6.

337. Hopfer O, Komor M, Koehler IS, Schulze M, Hoelzer D, Thiel E, et al. DNA methylation profiling of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitor cells during in vitro lineage-specific differentiation. Exp Hematol. 2007 May;35(5):712-23.

338. Taubert H, Wurl P, Greither T, Kappler M, Bache M, Bartel F, et al. Stem cell-associated genes are extremely poor prognostic factors for soft-tissue sarcoma patients. Oncogene. 2007 Nov 1;26(50):7170-4.

339. Pennartz S, Belvindrah R, Tomiuk S, Zimmer C, Hofmann K, Conradt M, et al. Purification of neuronal precursors from the adult mouse brain: comprehensive gene expression analysis provides new insights into the control of cell migration, differentiation, and homeostasis. Mol Cell Neurosci. 2004 Apr;25(4):692-706.

340. Marconi A, Dallaglio K, Lotti R, Vaschieri C, Truzzi F, Fantini F, et al. Survivin identifies keratinocyte stem cells and is downregulated by anti-beta1 integrin during anoikis. Stem Cells. 2007 Jan;25(1):149-55.

341. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. Curr Opin Cell Biol. 2007 Apr;19(2):150-8.

342. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. Lancet. 2003 Jul 19;362(9379):205-9.

343. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature. 2003 May 22;423(6938):409-14.

344. Chen MS, Woodward WA, Behbod F, Peddibhotla S, Alfaro MP, Buchholz TA, et al. Wnt/beta-catenin mediates radiation resistance of Sca1+ progenitors in an immortalized mammary gland cell line. J Cell Sci. 2007 Feb 1;120(Pt 3):468-77.

345. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 9;104(2):618-23.

346. Nam S, Buettner R, Turkson J, Kim D, Cheng JQ, Muehlbeyer S, et al. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):5998-6003.

347. Siddiquee K, Zhang S, Guida WC, Blaskovich MA, Greedy B, Lawrence HR, et al. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual

screening, induces antitumor activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 1;104(18):7391-6.

348. Lee SH, Song R, Lee MN, Kim CS, Lee H, Kong YY, et al. A molecular chaperone glucose-regulated protein 94 blocks apoptosis induced by virus infection. Hepatology. 2008 Mar;47(3):854-66.

349. Lee CW, Simin K, Liu Q, Plescia J, Guha M, Khan A, et al. A functional Notch-survivin gene signature in basal breast cancer. Breast Cancer Res. 2008;10(6):R97.

350. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science. 2004 Oct 8;306(5694):269-71.

351. Stylianou S, Clarke RB, Brennan K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. Cancer Res. 2006 Feb 1;66(3):1517-25.

352. Sharma VM, Calvo JA, Draheim KM, Cunningham LA, Hermance N, Beverly L, et al. Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. Mol Cell Biol. 2006 Nov;26(21):8022-31.

353. Ronchini C, Capobianco AJ. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). Mol Cell Biol. 2001 Sep;21(17):5925-34.

354. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. Cell. 2007 May 4;129(3):465-72.

355. Beverly LJ, Felsher DW, Capobianco AJ. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. Cancer Res. 2005 Aug 15;65(16):7159-68.

356. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. Breast Cancer Res. 2005;7(3):86-95.

357. van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. Nature. 2005 Jun 16;435(7044):959-63.

358. Farnie G, Clarke RB, Spence K, Pinnock N, Brennan K, Anderson NG, et al. Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: role of Notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways. J Natl Cancer Inst. 2007 Apr 18;99(8):616-27.

359. Lee CW, Raskett CM, Prudovsky I, Altieri DC. Molecular dependence of estrogen receptor-negative breast cancer on a notch-survivin signaling axis. Cancer Res. 2008 Jul 1;68(13):5273-81.

360. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. Cancer Res. 1998;58(9):1808-12.

361. Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, et al. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. Cancer Lett. 2001;163(1):109-16.

362. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, et al. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. Oncogene. 2000 Feb 3;19(5):617-23.

363. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2000 May;31(5):1080-5.

364. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. Cancer Res. 1998 Nov 15;58(22):5071-4.

365. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. Clin Cancer Res. 2000 Jan;6(1):127-34.

366. Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. J Clin Oncol. 1999 Jul;17(7):2100-4.

367. Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, et al. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. Int J Cancer. 2001 Mar 20;95(2):92-5.

368. Zhu XD, Lin GJ, Qian LP, Chen ZQ. Expression of survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma model of rats. World J Gastroenterol. 2003;9(7):1435-8.

369. Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. Cancer Lett. 2004;216(2):147-55.

370. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. Cancer Res. 1998 May 1;58(9):1808-12.

371. Lee GH, Joo YE, Koh YS, Chung IJ, Park YK, Lee JH, et al. Expression of survivin in gastric cancer and its relationship with tumor angiogenesis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2006 Sep;18(9):957-63.

372. Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, et al. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. Br J Cancer. 2002 Jul 1;87(1):91-7.

373. Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, et al. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. Cancer Lett. 2001 Feb 10;163(1):109-16.

374. Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. Cancer Lett. 2004 Dec 28;216(2):147-55.

375. Song KY, Jung CK, Park WS, Park CH. Expression of the antiapoptosis gene Survivin predicts poor prognosis of stage III gastric adenocarcinoma. Jpn J Clin Oncol. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 May;39(5):290-6.

376. Yie SM, Lou B, Ye SR, Cao M, He X, Li P, et al. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells (CCCs) in peripheral blood of patients with gastric and colorectal cancer reveals high risks of relapse. Ann Surg Oncol. 2008 Nov;15(11):3073-82.

377. Da CL, Xin Y, Zhao J, Luo XD. Significance and relationship between Yes-associated protein and survivin expression in gastric carcinoma and precancerous lesions. World J Gastroenterol. 2009 Aug 28;15(32):4055-61.

378. Shi M, Guo XT, Shu MG, Li LW. Enhancing tumor radiosensitivity by intracellular delivery of survivin antagonists. Med Hypotheses. 2007;68(5):1056-8.

379. Wang ZN, Xu HM, Jiang L, Zhou X, Lu C, Zhang X. Expression of survivin mRNA in peritoneal lavage fluid from patients with gastric carcinoma. Chin Med J (Engl). 2004;117(8):1210-7.

380. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Nov 2;264(3):781-8.

381. O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. Am J Pathol. 2000 Feb;156(2):393-8.

382. Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC, et al. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. Am J Pathol. 2001 May;158(5):1757-65.

383. Tu SP, Jiang XH, Lin MC, Cui JT, Yang Y, Lum CT, et al. Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. Cancer Res. 2003 Nov 15;63(22):7724-32.

384. Deng H, Wu RL, Zhou HY, Huang X, Chen Y, Liu LJ. Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006 Feb 21;12(7):1013-7.

385. Li YH, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou XJ. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. World J Gastroenterol. 2004;10(13):1984-8.

386. Hino R, Uozaki H, Inoue Y, Shintani Y, Ushiku T, Sakatani T, et al. Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: survivin up-regulation by viral latent membrane protein 2A. Cancer Res. 2008 Mar 1;68(5):1427-35.

387. Meng H, Lu CD, Sun YL, Dai DJ, Lee SW, Tanigawa N. Expression level of wild-type survivin in gastric cancer is an independent predictor of survival. World J Gastroenterol. 2004 Nov 15;10(22):3245-50.

388. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, et al. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. Int J Cancer. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Jul 1;100(1):30-6.

389. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S, et al. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. Br J Cancer. 2002 Mar 4;86(5):737-43.

390. Wang ZN, Xu HM, Jiang L, Zhou X, Lu C, Zhang X. Expression of survivin in primary and metastatic gastric cancer cells obtained by laser capture microdissection. World J Gastroenterol. 2004 Nov 1;10(21):3094-8.

391. Wijnhoven BP, Pignatelli M, Dinjens WN, Tilanus HW. Reduced p120ctn expression correlates with poor survival in patients with adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. J Surg Oncol. 2005;92(2):116-23.

392. Ohno T, Aihara R, Kamiyama Y, Mochiki E, Asao T, Kuwano H. Prognostic significance of combined expression of MUC1 and adhesion molecules in advanced gastric cancer. Eur J Cancer. 2006;42(2):256-63. Epub 2005 Dec 13.

393. Uen YH, Lin SR, Wu CH, Hsieh JS, Lu CY, Yu FJ, et al. Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma. Clin Chim Acta. 2006;3:3.

394. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem. 1979;27(8):1131-9.

395. Charpin C, Bergeret D, Garcia S, Andrac L, Martini F, Horschowski N, et al. ELAM selectin expression in breast carcinomas detected by automated and quantitative immunohistochemical assays. Int J Oncol. 1998;12(5):1041-8.

396. Bobinac D, Maric I, Zoricic S, Spanjol J, Dordevic G, Mustac E, et al. Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer. Croat Med J. 2005;46(3):389-96.

397. Zhu XD, Lin GJ, Qian LP, Chen ZQ. Expression of survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma model of rats. World J Gastroenterol. 2003 Jul;9(7):1435-8.

398. Da C-L. Significance and relationship between Yes-associated protein and survivin expression in gastric carcinoma and precancerous lesions. World Journal of Gastroenterology. 2009;15(32):4055.

399. Reker S, Meier A, Holten-Andersen L, Svane IM, Becker JC, thor Straten P, et al. Identification of novel survivin-derived CTL epitopes. Cancer Biol Ther. 2004 Feb;3(2):173-9.

400. Reker S, Becker JC, Svane IM, Ralfkiaer E, Straten PT, Andersen MH. HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients. Int J Cancer. 2004 Mar 1;108(6):937-41.

401. Grube M, Moritz S, Obermann EC, Rezvani K, Mackensen A, Andreesen R, et al. CD8+ T cells reactive to survivin antigen in patients with multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2007 Feb 1;13(3):1053-60.

402. Coughlin CM, Fleming MD, Carroll RG, Pawel BR, Hogarty MD, Shan X, et al. Immunosurveillance and survivin-specific T-cell immunity in children with high-risk neuroblastoma. J Clin Oncol. 2006 Dec 20;24(36):5725-34.

403. Casati C, Dalerba P, Rivoltini L, Gallino G, Deho P, Rini F, et al. The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. Cancer Res. 2003 Aug 1;63(15):4507-15.

404. Andersen MH, Pedersen LO, Capeller B, Brocker EB, Becker JC, thor Straten P. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. Cancer Res. 2001 Aug 15;61(16):5964-8.

405. Andersen MH, Pedersen LO, Becker JC, Straten PT. Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. Cancer Res. 2001 Feb 1;61(3):869-72.

11. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Kristijan Ćupurdija

DATUM I MJESTO ROĐENJA

26. srpnja 1975. , Pag

RADNA MJESTA

01.02.2000 – 31.12.2003: Znanstveni novak - Zavod za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

02.01.2004- : Klinika za kirurgiju, Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

ŠKOLOVANJE

1981.- 1989. osnovna škola u Donjem Miholjcu

1989.- 1993. srednja škola u Donjem Miholjcu

1993.- 1999. Studij medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1999.-2000. poslijediplomski znanstveni studij "Biomedicina" elektivni smjer "Klinička imunologija" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

12. ožujka 2004. obranjen magistarski rad pod naslovom "Uloga decidualnih makrofaga u imunološkoj reaktivnosti na spoju majčinih i fetalnih tkiva" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.

SPECIJALIZACIJE

- 10. 02. 2004 – 29.09. 2008. Specijalizacija iz opće kirurgije, Klinička bolnica Dubrava, Zagreb
- 2010- subspecijalizacija iz abdominalne kirurgije, Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

STRUČNO USAVRŠAVANJE

- 07.01.2002.-31.03.2002. , 20.05.2002.- 14.07.2002. Institut za histologiju i embriologiju Karl-Franzes sveučilišta u Gracu , Austrija.
- 07.-09. 10. 2004. Poslijediplomski tečaj "Liver and spleen surgery" Ljubljana, Slovenija
- 02.-08. 10. 2005. Salzburg Weill Cornell Seminar "Oncology", Salzburg, Austria
- 13.-15. 10. 2005. Poslijediplomski tečaj "Gastric surgery- standards and news" Ljubljana, Slovenija
- 23.-29. 10. 2007. Salzburg Weill Cornell Seminar "Oncology", Salzburg, Austria
- 11.-17. 11. 2007. Salzburg Weill Cornell Seminar "Trauma and emergency surgery", Salzburg, Austria
- 03.-29.04. 2011 OMI observership , Kaiser Franz Josef Spital, Wienna, Austria

ZNANSTVENA DJELATNOST

1. Znanstveni radovi

1.1. Izvorni znanstveni rad objavljen u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama (CC radovi) - prvi autor: 1, koautor: 12

1.2. Izvorni znanstveni rad objavljen u drugim časopisima: koautor :1

2. Znanstveni projekti : 4

3. Sudjelovanje na znanstvenim skupovima

3.1. Kongresna priopćenja na međunarodnim skupovima: 31

, 3.2. Kongresna priopćenja na domaćim skupovima: 40

AUTORSTVO KNJIGA I SKRIPTI

1. "Priručnik za vježbe iz Fiziologije, Neurofiziologije i Imunologije", Katedra za fiziologiju, imunologiju i patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Rijeka, Sveučilište u Rijeci ,2001, koautor
2. Hamilton Bailey's Physical Signs, 18th Edition, hrvatsko izdanje, Medicinska naklada, 2010, prevodioc
3. "Kirurško liječenje karcinoma želuca" Klinika za kirurgiju, KB Dubrava , Zagreb, koautor skripte
4. "Kirurško liječenje bolesti gušterače" Medicinska naklada, 2010, koautor skripte
5. "Kirurgija metastatske bolesti" u knjizi M. Stanec i sur. "Kirurška onkologija" Medicinska naklada, 2011, koautor poglavlja