

УНИВЕРЗИТЕТ „СВЕТИ КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
УНИВЕРЗИТЕТСКА КЛИНИКА ЗА ДИГЕСТИВНА ХИРУРГИЈА



**HER2 ЕКСПРЕСИЈА И EBV АСОЦИРАНОСТ
КАЈ ГАСТРИЧЕН КАРЦИНОМ ВО
КОРЕЛАЦИЈА СО КЛИНИЧКО-
ПАТОЛОШКИТЕ КАРАКТЕРИСТИКИ**

Докторска дисертација

Кандидат:
Ас. д-р Љубомир Огњеновиќ

Ментор:
Проф. д-р Владо Јаневски

Скопје, 2019

БЛАГОДАРНОСТ

Благодарност до мојот ментор проф. д-р Владо Јаневски за сиот труд, време и поддршка во изработката на докторатот.

Посебна благодарност до проф. д-р Весна Јаневска и проф. д-р Гордана Петрушевска од Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје за несебичната помош и насоки во изработка на овој докторат.

Се заблагодарувам за несебичната помош на моите колеги при Универзитетската клиника за дигестивна хирургија во Скопје.

Се заблагодарувам на целиот персонал од Универзитетската клиника за дигестивна хирургија во Скопје за нашата долгогодишна соработка при третманот на пациентите со гастричен карцином.

Голема благодарност до моите родители и моето семејство за сиот труд и трпение во изминатиов период на подготовка на докторатот.

СОДРЖИНА

I. Содржина

II. Извадок

III. Abstract

1.0. ВОВЕД.....	10
1.1. Епидемиологија на гастричниот карцином (ГК)	
1.2. Фактори на ризик за развој на ГК	
1.2.1 Инфекција со <i>Helicobacter pilory</i>	
1.2.2. Асоцијација на ГК со Епштајн-Бар вирусот	
1.3. Современи сознанија за патогенезата на ГК	
1.4. Клиничко-патолошки типови на ГК и особини	
1.4.1. Клиничка класификација на ГК	
1.4.2. Хистопатолошка класификација на ГК	
1.4.3. Молекуларна класификација на ГК	
1.5. Дијагностички и терапевтски можности	
1.5.1. Дијагноза и проценка на клиничкиот стадиум на болеста	
1.5.2. Третман на ГК	
2.0. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	
3.0. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	
4.0. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	
4.1. Избор на пациенти	
4.2. Методи на истражувањето	
4.3. Статистичка обработка на податоците	
5.0. РЕЗУЛТАТИ.....	
5.1. Демографска структура.....	
5.2. Асоцираност на HER2 имуноекспресијата со демографските и клиничко-патолошките карактеристики на пациентите со ГК.....	
5.2.1. Интрагастрична локализација на ГК	
5.2.2. Т статус	
5.2.3. N статус	
5.2.4. M статус	
5.2.5. G степен на диференцираност на туморот	
5.2.6. Стадиум на болеста	
5.3. Асоцираност на EBV со демографските и клиничко-патолошки карактеристики на гастричниот карцином.....	
5.3.1. Демографски карактеристики на пациентите со EBV	
5.3.2. Локализација	
5.3.3. T статус	
5.3.4. N статус	
5.3.5. M статус	
5.3.6. Степен на диференцираност	
5.3.7. Стадиум на болеста	
5.4. Корелација помеѓу HER2 и EBV експресија кај гастричниот карцином.....	

6.0. ДИСКУСИЈА.....	
6.1. Демографски особености на карциномите на желудникот и асоцираноста со HER2 и EBV експресија.....	
6.1.1. Пол	
6.1.2. Етничка припадност	
6.1.3. Возраст	
6.2. Клинички и патохистолошки особености на ГК.....	
6.2.1. Локализација	
6.3. Асоцираност на HER2 имуноекспресија кај ГК според ТНМ класификацијата.....	
6.3.1. Т статус	
6.3.2. N статус	
6.3.3. M далечни метастази	
6.3.4 G диференцираност на туморот	
6.3.5. Стадиум на болеста	
6.4. Експресија на Епштајн-Бар вирусот (EBV) кај ГК.....	
6.4.1. Локализација	
6.4.2. Демографски карактеристики	
6.4.3. Клиничко-патолошки карактеристики	
6.5. Корелација помеѓу HER2 и EBV експресија кај гастричниот карцином.....	86
7.0. ЗАКЛУЧОЦИ.....	
8. РЕФЕРЕНЦИ.....	

ИЗВАДОК

HER2 експресија и EBV асоцираност кај гастричен карцином во корелација со клиничко-патолошките карактеристики

Вовед: Во последните години инциденцијата и стапката на смртност од гастричниот карцином покажуваат тренд на опаѓање, но и покрај тоа тој претставува една од водечките причини за смрт поврзана со рак ширум светот, особено во земјите во развој.

Тој е поврзан со повеќе ризик-фактори меѓу кои особено значење ѝ се припишува на инфекцијата со *Helicobacter pylori*, а во поново време и на инфекцијата со Епштајн-Бар вирусот (EBV), чијашто асоцираност со гастричен карцином сè уште претставува предмет на истражување.

Гастричниот карцином покажува прекумерна експресија на HER2 протеинот (HER2/neu, ErbB-2) кој е 185-kDa трансмембрански рецептор за тирозин киназата, која според некои автори е поврзана со големината на туморот, серозната инвазија и метастазите во лимфните јазли, како и со полоша прогноза за период од 10-годишно преживување. Бидејќи литературните податоци за прогностичкото значење на HER2 сè уште разновидни, а и поради фактот дека некои пациенти развиваат резистенција на терапијата со моноклонално антитело против HER2 истражувањата во ова поле се сè уште актуелни и потребни.

Цел: Цел на ова истражување претставуваше утврдување на имуноекспресијата на HER2 и EBV кај гастричниот карцином и нивната меѓусебна корелација со одредени клиничко-патолошки параметри. Целта беше да се одреди нивната вредност како прогностички фактори и да се збогатат сознанијата за етиолошките и терапевтски карактеристики на гастричниот карцином.

Материјал и методи: Во студијата беа вклучени 149 пациенти со карцином на желудникот оперирани на Универзитетската клиника за дигестивна хирургија во Скопје, чиј оперативен материјал беше обработен на Институтот за патологија при Медицински факултет во Скопје. Покрај демографските карактеристики и интрагастричната локализација на карциномот, беа одредени имуноекспресијата

на HER2 и EBV во туморското ткиво и таа беше корелирана со патохистолошки и клинички параметри (диференцираност на туморот, неговиот продор во мукозата, присуството на метастази во регионалните лимфни жлезди, присуството на далечни метастази и стадиумот на болеста).

Резултати: Во оваа студија за експресија на HER2 протеинот беа анализирани ткивните примероци од гастричен карцином на 41 (27,52%) пациент од машки и 108 (72,48%) пациенти од женски пол. Пациентите беа на возраст од 40 до 86 години, со просечна возраст од $65,19 \pm 10,1$ години.

За експресија на EBV во оваа студија беа анализирани ткивните примероци на 80 пациенти, од кои 25 (31,25%) од машки и 55 (68,75%) од женски пол на возраст од 40 до 86 години, со просечна возраст од $65,19 \pm 10,1$ години.

Во однос на етничката припадност, 114 (76,51%) пациенти беа Македонци, а 35 (23,49%) беа од албанска националност.

Позитивно боене со HER2 беше најдено во туморското ткиво на 29,7% од пациентите. Висок степен на експресија на HER2 или шема HER2+++ беше значително позастапена кај пациентите со ГК локализиран во антропилоричниот регион ($p=0,005$) и кај пациентите со присутни нодални метастази ($p=0,03$). Позитивна HER2 експресија кај ГК беше статистички значајно почеста кај умерено диференцираните карциноми во однос на лошо диференцираните карциноми ($p=0,034$), а шемата HER2+++ беше значително почеста кај пациентите со ГК со добра диференцираност на карциномот.

EBV асоциран гастричен карцином беше најден кај 23,7% од пациентите во испитуваната серија со значајно поголема честота кај припадниците од албанската националност ($p=0,009$). EBV експресијата во гастричниот карцином беше сигнификантно почеста кај пациентите со далечни метастази ($p<0,0001$).

Беше утврдена високосигнификантна корелација помеѓу HER2 позитивитетот и EBV експресијата кај гастричниот карцином ($p=0,041$), при што HER2 експресијата беше поизразена кај EBV негативните гастрични карциноми ($p=0,02$).

Заклучок: Статистички значајната разлика во експресијата на HER2 протеинот во гастричниот карцином кај пациентите со нодални метастази и статистички значајната негативна корелација на HER2 експресијата со градусот на туморот укажуваат на тоа дека HER2 експресијата е сигнификантно корелирана со поагресивна болест и можноста за полош исход кај пациентите со гастричен карцином.

Во оваа студија се утврди висок процент на EBV асоциран гастричен карцином.

Значајната корелација на EBV имуноекспресијата со далечните метастази кај пациентите со ГЦ сугерира влијание на EBV инфекцијата во прогресијата на гастричниот карцином.

Поради релативно оскудните и неконзистентни литературни податоци за EBV здружен гастричен карцином неопходни се понатамошни студии со цел да се одреди улогата на EBV во однос на етиологијата, третманот и прогнозата кај пациентите со EBV здружен гастричен карцином.

Клучни зборови: гастричен карцином, HER2, EBV, прогностички фактори, стадиум

Abstract

HER2 expression and EBV association with gastric carcinoma in correlation with clinical-pathological characteristics

Introduction: In recent years the incidence and rate of gastric cancer deaths have been declining, but nevertheless it is one of the leading causes of cancer-related deaths worldwide, especially in developing countries. It is associated with several risk factors, of particular importance, attributable to *Helicobacter pylori* infection, and more recently to Epstein-Bar virus (EBV) infection, which association with gastric carcinoma is still the subject of research.

Gastric carcinoma shows the excessive expression of HER2 protein (HER2/neu, ErbB-2) which is a 185-kDa transmembrane receptor for tyrosine kinases, and according to some authors is related to the size of the tumor, serous invasion and metastases in the lymph nodes, as well as poor prognosis for a period of 10-year-survival. Since literature data on the prognostic significance of HER2 are considered to be the subject of examination, and due to the fact that individual patients develop resistance to the therapy with monoclonal antibody against HER2, the research in this field is considered to be current and necessary.

Aim: The main aim of this study was identification of the immunoexpression of HER2 and EBV with gastric cancer and their correlation with certain clinical-pathological paramatres in order to determine their value as prognostic factors and to enrich the knowledge of the etiological and therapeutic characteristics of gastric carcinoma.

Material and Methods: The study included 149 patients with gastric cancer, who underwent surgery at the University Clinic for Digestive Surgery in Skopje, and whose operative material was analyzed at the Institute of Pathology of the Medical Faculty in Skopje. In addition to demographic characteristics and intragastric carcinoma localization, the immunosuppression of HER2 and EBV in the tumor tissue was determined, and this was correlated with pathohistological and clinical parameters (tumor differentiation, local tumor growth, presence of metastases in the regional lymph nodes, presence of distant metastases and stage of the disease).

Results: In this study, 41 (27.52%) male and 108 (72.48%) female patients were analyzed for the expression of HER2 protein in the tissue samples of gastric carcinoma. The age range of patients was from 40 to 86 years, with an average age of 65.19 ± 10.1 years.

For EBV expression in this study tissue samples of 80 patients with gastric carcinoma were analyzed, of which 25 (31.25%) male and 55 (68.75%) female with age range from 40 to 86 years, with an average age of 65.19 ± 10.1 years.

Regarding ethnicity, 114 (76.51%) patients were Macedonians, and 35 (23.49%) were of Albanian nationality.

HER2 - positive staining in tumor tissue was found in 29.7% of patients. High degree of expression of HER2 or HER2 +++ scheme was significantly associated with GC localized in the anthro-pyloric region ($p = 0.005$) and with nodal metastases ($p = 0.03$). According to the differentiation of the tumors, positive HER2 expression was statistically significantly more common in moderately differentiated carcinomas in comparison to poorly differentiated carcinomas ($p = 0.034$), but the HER2 +++ scheme was significantly more frequent in patients with well differentiated carcinomas.

EBV-associated gastric carcinoma was found in 23.7% of patients in the examined series with significantly higher frequency in patients of Albanian nationality ($p = 0.009$). EBV expression in gastric carcinoma was significantly more frequent in patients with distant metastases ($p < 0.0001$).

A highly significant correlation between HER2 positivity and EBV expression in gastric carcinoma ($p = 0.041$) was found, where HER2 expression was more common in the EBV negative gastric carcinoma ($p = 0.02$).

Conclusion: The statistically significant difference in the expression of HER2 protein in patients with nodal metastases and the statistically significant negative correlation of HER2 expression with the tumor grade indicate that HER2 expression is significantly correlated with a more aggressive disease and the possibility of poor outcomes in patients with gastric carcinoma.

In this study, a high percentage of EBV-associated gastric carcinoma was determined. The significant correlation of EBV immunoeexpression with distant metastases in patients with GC suggests the impact of EBV infection on the progression of gastric carcinoma.

Due to the relatively scarce and inconsistent literature on EBV-associated gastric carcinoma, additional studies are necessary in order to determine the role of EBV in relation to etiology, treatment and prognosis of patients with EBV-associated gastric cancer.

Keywords: gastric carcinoma, HER2, EBV, prognostic factors, stage

1. ВОВЕД

1.1. Епидемиологија на гастричниот карцином

Ракот на желудникот или гастричниот карцином (ГК) е тешко заболување со агресивен тек, коешто станува симптоматско во напреднатата фаза на болеста. Тој е втората најчеста причина за смрт од рак во светот, особено во земјите во развој, поради што ГК има силно влијание врз јавното здравје. Гастричниот карцином е четвртиот најчест малигнитет во светот (989.600 нови случаи во 2008 година и 700.000 смртни случаи во истата година), што претставува 8% смртност од вкупните 10% смртност предизвикани од рак во светот [1,2].

Иако во последниве декади, инциденцијата и стапката на смртност на гастричниот карцином (ГК) покажуваат тренд на опаѓање, сепак тој претставува една од водечките причини за смрт ширум светот. Стапката на преживување во повеќето земји во светот се движи од една до три години. Петгодишно постоперативно преживување се постигнало кај 90% од третираните болни во Јапонија, додека постојат податоци дека во европските земји, овие стапки се разликуваат од ~ 10% до 30% [3,4]. Најверојатно високата стапка на преживување во Јапонија се должи на раната дијагноза утврдена со ендоскопски испитувања и рана ресекција во најраните фази на туморот [1-4].

Епидемиолошките студии во разни географски подрачја во светот покажуваат дека инциденцијата на распространетост на ГК е со широки варијации, а околу 50% отпаѓа на земјите во развој. Тој е најзастапен меѓу жителите во источна Азија (Кина, Кореа и Јапонија), Источна Европа, Централна и Јужна Америка. Се смета дека во поразвиениот свет, заради подобрите социоекономски услови, е помал ризикот за добивање на болеста (Јужна Азија, Северна и Источна Африка, Северна Америка, Австралија и Нов Зеланд) [3].

Тенденцијата кон намалување на бројот на новооткриените случаи со ГК донекаде може да се објасни и со повисоките хигиенски навики, современите услови за подобра чување на храната, нејзиното правилно конзумирање, диететските режими поврзани со поголем внес на свежо овошје и зеленчук, како и тенденцијата за ерадикација на *Helicobacter pylori*.

1.2. Ризик-фактори за појава на ГК

Појавата на рак на желудникот се смета дека претставува резултат на мултифакториски влијанија, кои потекнуваат од животната средина и се интерпонираат со специфични генетски промени кои ги поседува индивидуата. Се смета дека меѓу факторите на ризик за појава на ГК се: начинот на исхрана, пушењето, конзумирањето алкохол, прекумерното користење на H₂ блокатори, семејната предиспозиција за болеста и други.

Инфекцијата со *Helicobacter pylori* е докажана како предизвикувач на аденокарцином на желудникот. Разните нарушувања на гастричната мукоза, атрофичниот гастрит, интестиналната метаплазија и дисплазија, се состојби кои му претходат на развојот на ГК [3-7].

Уште одамна се знае дека храната претставува потенцијален фактор на ризик за појавата на ГК. Врз основа на повеќе направени студии е утврдено дека месото и рибата поседуваат нитросоединенија, како и низа карциногени состојки кои се ослободуваат при нивната термичка обработка. Солта со нејзиното својство да го испере мукусот од желудочниот епител, причинувајќи иритација на мукозата, може да предизвика атрофичен гастрит, што претставува една од почетните промени на мукозата за развој на карцином на желудникот. Исто така, конзервацијата на месо со сол и конзерванси ја зголемуваат содржината на нитросоединенијата кои влијаат канцерогено врз мукозата на желудникот [3-7].

Фамилијарната појава (ФАП) на карцином на желудник е една од најчестите облици на предиспозиција за желудочен карцином (5% од пациентите со ФАП може да развијат карцином на желудник). Перинициозната анемија, Zollinger Ellison-овиот синдром, пациенти со струма (кај кои почесто се јавува атрофичен гастрит) се група пациенти со предиспонирачки фактор за развој на карцином [7,8].

Низа патолошки состојби исто така претставуваат предиспонирачки фактори за развој на ГК. Во оваа група се пациентите со: претходно ресециран желудник, пептичен улкус, идиопатска тромбоцитопенична пурпура, атрофичен гастрит и други [1,7]. Циклооксигеназата-2 (COX-2) игра улога во клеточната пролиферација, апоптоза и ангиогенеза, и може да биде вклучена во карциногенезата на

желудникот. Во прогресијата на атрофичниот гастрит до интестинална метаплазија и аденокарцином на желудникот се забележани зголемени нивоа на COX-2 [6,10]. Ревматските заболувања и употребата на НСАИЛ се исто така состојби кои влијаат врз гастричната мукоза. Се смета дека аспирирот и другите нестероидни антиинфламаторни лекови (НСАИЛ) го инхибираат растот на клетките на ракот, првенствено преку инхибиција на COX-2. Во последно време сè почесто се говори дека инхибиторите на COX-2 може да бидат корисни во спречувањето на развојот на малигноми во горните гастроинтестинални патишта. Една неодамнешна мета-анализа покажа дека употребата на НСАИЛ е поврзана со намален ризик од некардијален гастричен аденокарцином [5]. Така, инхибиторите на COX-2 може да обезбедат хемопротективна стратегија против карциногенезата на желудникот. Прекумерната дебелина е поврзана со гастричен рефлукс, езофагит и гастрит што индиректно исто така се фактори на ризик за развој на ГК [1].

Состојбата на пептичен улкус и прекумерната употреба на H₂ блокаторите може да предизвикаат појава на атрофичен гастрит со што се зголемува ризикот за појава на карцином на желудник [7,8,10].

Резултатите од некои студии покажуваат дека пушењето комбинирано со конзумирање алкохол претставува ризик-фактор за појава на малигна неоплазма на кардијата [9].

Постојат професии каде лицата се прекумерно изложени на канцерогени агенси од околината што претставува ризик за појава на ГК, како што се: прашина и разните гасови, азотните оксиди, N-нитросоединенијата и ирадијацијата.

1.2.1. Инфекција со *Helicobacter pylori* и појава на ГК

Инфекцијата со *Helicobacter pylori* се смета како една од најважните докажани фактори, причинители на гастричниот аденокарцином. *Helicobacter pylori* е присутен кај речиси половина од светската популација, но мал процент од инфицираните лица развиваат аденокарцином. Инфекцијата со *Helicobacter pylori* е главен причинител за гастрит, пептичен улкус и гастричен аденокарцином. Исто така, познато е дека инфекцијата со *Helicobacter pylori* ја инхибира гастричната

секреција на аскорбинската киселина, која е важен отстранувач на N-нитросоединенијата и слободните радикали на кислородот [4].

Иако *Helicobacter pylori* главно се среќава екстрацелуларно, со повеќе студии е докажано [11] дека тој може да продре во гастричната мукоза и во гастричните лимфни јазли. Продолженото воспаление на желудникот предизвикано од инфекција со *Helicobacter pylori* го оштетува гастричниот епител, и од неатрофичен гастрит доведува до атрофија на гастричната мукоза. Во гастричната лигавица настанува интестинална метаплазија, особено во пределите на малата кривина, но таа може да се види и насекаде во желудникот. Следна промена која се јавува кај атрофичниот гастрит предизвикан од *Helicobacter pylori* се појава на полиња на дисплазија во кои може да настане и процес на карциогенеза [12-16]. Одредени студии [14] укажуваат на поврзаноста на инфекцијата со *Helicobacter pylori* со појавата на ран карцином и мали тумори кај младите луѓе. Канцерогениот потенцијал кој го поседува инфекцијата со *Helicobacter pylori* перзистира дури и по неговата ерадикација [15,17].

1.2.2. Асоцираност на ГК со Епштајн–Бар вирусот

Во последниве десет години сè почесто се објавуваат студии кои зборуваат за асоцираноста на гастричниот карцином со Епштајн-Бар вирусот (EBV), за кој се смета дека може да има улога во карциногенезата на оваа неоплазма [18]. EBV е широко распространет γ -1 херпес вирус, чија инфекција најчесто се стекнува во раното детство, преку саливарна трансмисија. Вирусот предизвикува долготрајна инфекција на Б лимфоцитите кај околу 90% од возрасните, која е асимптоматска. Мал процент на инфицираните развиваат хемопоеетски, епителни и мезенхимални тумори [18-22]. Инфекцијата со EBV е здружена и претставува причина за појава на Буркитов лимфом, лимфом поврзан со имunosупресија, Хочкинов лимфом, синоназален ангиоцентричен Т лимфом, назофарингеален карцином и леомиосарком кај имunosупримирани пациенти. Се смета дека онкогениот ефект вирусот го спроведува преку експресија на EBV нуклеарен антиген и латентни мембрански протеини кои влегуваат во интеракција со бројни тумор супресорни гени и сигнални патеки [18].

Некои гастрични карциноми поседуваат моноклонални EBV геноми во секоја карциномска клетка, што зборува дека потекнуваат од единечна прогенитор клетка. Не се знае точниот процент на EBV позитивни гастрични карциноми, а етиолошкото значење е непознато. Докажано е дека EBV позитивните гастрични карциноми се посебен етиолошки ентитет и дека се разликуваат од другите гастрични карциноми по споредливата дистрибуција, анатомската локализација и хируршки нарушената анатомија. Епидемиолошките студии кои ги споредуваат позитивните EBV гастрични карциноми со другите се неопходни со цел да придонесат во расветлувањето на улогата на EBV во карциногенезата на гастричниот карцином [14-19].

Според литературните податоци, инфекцијата со EBV е асоцирана и со 2-16% од гастричните карциноми. Антралните гастрични карциноми покажуваат понизок процент на асоцираност со EBV инфекција во споредба со кардијалните карциноми, а истата е во најголем процент (90,5%) утврдена кај lymphoepithelioma-like гастричен карцином. Некои студии укажуваат на EBV асоцираност со гастричниот карцином во зависност од возраста [23-31].

Мета-анализа на 48 студии за EBV здружен гастричен карцином (EBVaGC) утврдила дека постои сигнификантна здруженост со националноста и дека EBVaGC е почест кај: мажи и млади лица, белци и инфекција со EBV, во кардија и кај дифузниот хистолошки тип [32].

Поради релативно оскудните и неконзистентни литературни податоци за EBVaGC, неопходни се натамошни студии со цел да се одреди улогата на EBV во однос на етиологијата, третманот и прогнозата кај пациентите со EBVaGC.

1.3. Современи сознанија за патогенезата на ГК

Постојаниот прогрес во расветлувањето на хуманиот геном влијае врз речиси секојдневното откривање на нови гени, кои се имплицирани во патогенезата на голем број заболувања кај луѓето. И покрај прогресот, малку се знае за гените кои биле причина за предиспонираност за развој на карцином на желудник. Во таа смисла, генетичката епидемиологија станува сè поважна научна дисциплина, која би требало да ја расветли како улогата на генетските фактори

така и нејзината интеракција со факторите на околината во појавата и развојот на болести кај луѓето [3-8]. Мутации на бројни гени го покачуваат ризикот за ГК, меѓу кои ММС, APC и p53 тумор-супресорните гени се најчести кај висок процент на ГК.

Неколку студии потврдуваат и дека мутациите на E-кадеринот исто така имаат влијание во карциногенезата на ГК. Со појава на ГК се поврзани и неколку фамилијарни синдроми како што се фамилијарна аденоматозна полипоза (FAP) и Cowden болеста (автозомно доминантно заболување кое се карактеризира со појава на мултипни хамартоми и појава на малигни тумори) [33,34].

Разоткривањето и разбирањето на молекуларните основи на неоплазмите помагаат во развојот на нови молекуларни таргет терапии, кои интерферираат во различни сигнални каскади вклучени во клеточната пролиферација, преживување и диференцијација. Во тој правец сè почести се соопштенијата за влијанието на нови биомаркери, како што се microRNA, микросателитска нестабилност, различни цитокини (IL 1,6,10,11, TNF...) E, Cyclin D, Bcl2, p53 и други молекули, вклучивајќи го и HER2 протеинот во карциногенезата и како таргет молекули за нови терапевтски модалитети [35-42].

Постои неусогласеност во податоците за HER2 како прогностички фактор кај карциномот на желудникот и објавените резултати во литературата се различни поради што проценката на вредноста на HER2 кај гастричниот карцином во корелација со други клиничко-патолошки прогностички фактори сè уште е актуелна [43-46].

HER2 протеинот (HER2/neu, ErbB-2) е 185-kDa трансмембрански рецептор за тирозин киназа, кој е кодиран од HER2 протоонкогенот лоциран на долгиот крак на 17-тиот хромозом.

HER2 протеинот е член на фамилијата на рецептори за епидермални фактори на раст. Оваа фамилија има 4 членови: HER1 (познат и како EGFR), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4), кои делат заедничка молекуларна структура на нивниот екстрацелуларен домен на врзување за лиганд и интрацелуларен домен со тирозин киназна (ТК) активност (со исклучок на HER3). HER2 не се врзува за кој било познат лиганд и се смета дека тој функционира како безлиганден корецептор за другите три члена на ErbB фамилијата. HER2

всушност претставува префериран партнер за хетеродимеризација на другите членови од HER фамилијата. Врзувањето на лиганд за клеточниот рецептор од HER фамилијата индуцира хомодимеризација и хетеродимеризација на EGFR со други типови на HER протеини (во хетеродимеризацијата учествува HER2 протеинот). Врзувањето на различни лиганди за екстрацелуларниот домен започнува со сигнал преносна (трансдусирачка) каскада која може да влијае врз клеточната пролиферација, апоптозата, клеточната атхезија, миграцијата, ангиогенезата и диференцијацијата [43].

Многу автори сугерираат дека HER2 игра значајна улогата во развојот на бројни типови на рак. HER2 експресија и/или амплификација е детектирана кај инвазивен карцином на градата, колонот, мочниот меур, овариумот, ендометриумот, грлото на матката, белите дробови, главата и вратот, езофагусот и желудникот [47-54,56, 57].

Податоците за прекумерната експресија на HER2 утврдена кај карциномот на желудникот се различни во зависност од карактеристиките на анализираните групи и експресијата се движи од 2-34%. Таа е различна во зависност од локализацијата на туморот во желудникот (гастроэзофагеалниот спој - ГЕС или друга локализација), хистолошкиот поттип (дифузен, интестинален, мешан, непознат), диференцираноста. Иако некои автори не нашле сооднос помеѓу прекумерната експресија на HER2 и прогнозата, други автори утврдиле полоша прогноза кај овие случаи. Се смета и дека HER2 експресијата е во позитивна корелација со големината на туморот, серозната инвазија и метастазите во лимфните јазли, како и со полошата прогноза за период од 10-годишно преживување [55,58-60].

1. 4. Клиничко-патолошки типови на ГК и особини

1.4.1. Клиничка класификација на ГК

Со цел да се одреди насоката за правилниот начин на лекување, за ГК постојат повеќе класификации.

Класификацијата која е предложена од Меѓународната асоцијација за гастричен карцином (The International Gastric Cancer Association) го дели ГК на тип

I, тип II и тип III, според локацијата на туморот во дисталниот езофагус, на кардијата и во желудникот дистално од кардијата [61-63].

TNM класификацијата од Американскиот заеднички комитет за канцер (AJCC) од 2007 година ги одвојува карциномите на езофагус, гастроезофагеалната јункција и гастричните карциноми кои се наоѓаат 5 цм под гастроезофагеалната јункција [62,64].

TNM класификацијата претставува широко употребувана класификација за одредување на проширеноста на болеста во организмот и најрелевантен параметар за одредување на прогнозата на пациентите со ГК. Во табелата 1 е прикажана последната класификација на ГК според изданието на AJCC од 2010 година.

Табела 1. Систем за одредување на стадиумот на гастричниот карцином
Примарен тумор (Т)

Tx	Примарниот тумор не може да се оцени
T0	Нема потврда за примарен тумор
Tis	Карцином <i>in situ</i> , интраепителен тумор без инвазија во ламина проприја
T1	Туморот инвадира во ламина проприја, мускулна мукоза или субмукоза
T1a	Туморот инвадира во ламина проприја или мускулна мукоза
T1b	Туморот инвадира во субмукоза
T2	Туморот инвадира во мускуларис проприја
T3	Туморот пенетрира во субсерозното сврзно ткиво без инвазија на висцералниот перитонеум или соседните структури
T4	Туморот ја инвадира серозата (висцералниот перитонеум) или околните структури
T4a	Туморот ја инвадира серозата (висцералниот перитонеум)
T4b	Туморот ги инвадира околните структури

Регионални лимфни јазли (N)

Nx	Регионалните лимфни јазли не може да се оценат
N0	Нема метастази во регионалните лимфни јазли

N1	Метастази во 1-2 регионални лимфни жлезди
N2	Метастази во 3-6 регионални лимфни жлезди
N3	Метастази во 7 или повеќе лимфни жлезди
N3a	Метастази во 7-15 регионални лимфни жлезди
N3b	Метастази во 16 или повеќе регионални лимфни жлезди

Далечни метастази (M)

M0	Нема далечни метастази
M1	Далечни метастази

Клинички стадиум (прогностички групи)

Стадиум	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T1	N1, N2, N3	M0
	T2	N1, N2, N3	M0
IIB	T3	N0	M0
	T4a	N0	M0
III	T3	N1,N2,N3	M0
	T4a	N1,N2,N3	M0
IVA	Кој било T	Кој било N	M0
IVB	Кој било T	Кој било N	M1

Патолошки стадиум (прогностички групи)

Стадиум	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0

	T2	N0	M0
IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIB	T1	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
IIIA	T2	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1	M0
IIIB	T3	N3	M0
	T4a	N2	M0
	T4b	N0, N1	M0
IIIC	T4a	N2, N3	M0
	T4b	N3	M0
IVB	Кој било T	Кој било N	M1

Карциномот на желудникот клинички се класифицира и како ран и напреднат ГК. Раниот карцином на желудникот претставува инвазивен ГК чијашто инвазија е ограничена на мукозата и/или субмукозата со или без метастази во регионалните лимфни јазли, без оглед на големината на туморот. Прогнозата на раниот ГК е одлична со 5-годишно преживување од 90%. За разлика од тоа, напредниот ГК кој инфилтрира во мускуларна проприја или подлабоко има полоша прогноза со 5-годишно преживување од 60% [62].

Подоцнежните сознанија за поделбата на карциномите на желудникот во клиничката класификација се раководеле според етиолошкиот предизвикувач, начинот на појавување, молекуларната патологија, имунолошкиот одговор и други фактори [63-70].

Sitarz и соработниците гастричните карциноми ги делат на: спорадичен ГК, ГК со ран почеток, ГК кој се јавува на остатокот од желудникот и херeditарен ГК

[65]. Според оваа класификација поголемиот број од ГК се јавуваат **спорадично** и главно кај луѓето на возраст над 45 години. Тие се најчесто предизвикани од повеќе предизвикувачи од животната средина. Се појавуваат на возраст од 60-80 години, а мажите се два пати почесто погодени од жените, особено во високоризичните земји. ГК со **ран почеток** (ГКРП) се јавува кај лица помлади од 45 години и опфаќа околу 10% од ГК. Главна причина за појавата на овие ГК се сметаат генетските фактори. Тие се најчесто мултифокални, дифузни и почесто се јавуваат кај жените, што најверојатно се должи на хормоналните фактори. Сепак, патогенезата на ГКРП останува нејасна. ГК кој се јавува на **остатокот од желудникот-кардија**, по парцијална ресекција на желудникот заради пептичен улкус, е дефиниран како посебен поттип во оваа класификација. Тој се јавува најмалку 5 години по операција на пептичен улкус и се јавува кај 1,1% до 7% од сите ГК, а почесто кај мажите отколку кај жените.

Херeditарниот ГК е застапен со 1-3% од сите ГК. Се јавува како резултат од наследни фактори: мутации во генот CDH1 кој го кодира E-кадеринот. Ова е автозомно доминантна состојба која предизвикува дифузно, лошо диференцирани ГК, кој инфилтрира во желудочниот ѕид и предизвикува задебелување на ѕидот, без формирање на посебна туморска маса [65].

Табела 2. Клиничка класификација на видовите на ГК според Sitarz R и сор.

Назив (кратенка)	% и особености
Спорадичен гастричен карцином	Постари мажи, високоризични предели, изложени на надворешни ризик-фактори, застапени 80%
Гастричен карцином со ран почеток	10% < 45 години, почест кај жени
ГК на остаток од желудник	7%= резултат на претходни дисплазии, ризикот расте со времето по ресекцијата
Херeditарен гастричен карцином	1-3%, автозомно доминантно се наследува CDH1 генска мутација

1.4.2. Хистопатолошка класификација на ГК

Во однос на хистопатолошката класификација на гастричните карциноми, најчесто користени класификации се класификацијата според Лорен, како и класификацијата на Светската здравствена организација (СЗО) [62-67].

Според СЗО класификацијата на ГК од 2010 година, ГК се класифицира во 4 главни хистолошки типови: тубуларен, папиларен муцинозен и слабо-кохезивен (вклучувајќи го прстен печатник карциномот) гастринен карцином. Покрај овие 4 главни типови, хистолошки се распознаваат и други ретки типови на ГК како што се: аденосквамозен карцином, сквамозен карцином, хепатоиден карцином, карцином со лимфоидна строма, хориокарцином, карциносарком, карцином на париеталните клетки, недиференциран карцином и други.

Класификацијата според Лорен разликува 3 главни поттипа на ГК: интестинален, дифузен и мешан (интермедијален) тип. Најчестиот, интестиналниот тип на ГК, е поврзан со хроничен атрофичен гастрит, цревна (интестинална) метаплазија и присуство на *Helicobacter pylori*, додека дифузниот тип на ГК потекнува од нормалната гастрична мукоза, се јавува почесто кај помладата популација и кај женскиот пол [62,65].

Според диференцираноста, ГК може да биде класично градуиран како: добро диференциран, умерено диференциран, лошо диференциран и недиференциран карцином, хистолошко градирање кое е составен дел на AJCC прирачникот за одредување на стадиумот на малигните тумори [64].

1.4.3 Молекуларна класификација на ГК

Во 2012 година, во КГАРН-**Cancer Genome Atlas Research Network**, врз основа на студијата за молекуларна и геномска основа на карциномот на желудникот е објавена молекуларната класификација, според која се дефинираат четири главни геномски суптипови на ГК:

а. EBV-инфицирани тумори (се карактеризираат со високо ниво на ДНК хиперметилација, PIK3CA мутации и амплификација на PD-L1 I PD-L2);

б. MSI тумори (покажуваат зголемена стапка на мутации на надолна регулација на MLH1 генот кој кодира MLH1 протеин инволвиран во MMR);

в. Геномски стабилни тумори (диплоидни тумори, корелиран со дифузен тип и алтерации во CDH1 и RHOA гените);

г. Хромозомски нестабилни тумори (се карактеризираат со фокална амплификација на тирозин киназни рецептори, мутации на p53 генот и анеуплоидија).

Според авторите, оваа класификација може да биде корисен додаток на хистолошката класификација. Овие молекуларни поттипови покажуваат различни геномски карактеристики, што може да биде основа и насока за идна геномски ориентирана клиничка студија за да ја одвои популацијата склона кон ГК [70].

1.5. Дијагностички и терапевстички можности

Како што погоре е веќе кажано, во последните неколку децении инциденцијата на ГК во светот е со постојан тренд на опаѓање. И покрај ова намалување, од примарна важност е превенцијата од појава на ГК и откривање на факторите на ризик. Примарната превенција опфаќа едукација на населението за здрава исхрана, рано откривање на присутен *Helicobacter pylori* и негова ирадикација, хемопревенција и скрининг за рано откривање на ГК [14,15]. Здравите навики во исхраната предвидуваат консумирање големо количество свежо овошје и зеленчук, примена на медитеранска исхрана, исхрана со малку натриум, храна што не е конзервирана со сол, намалено консумирање црвено месо, разумно пиење алкохол и одржување соодветна тежина на телото, и имаат за цел да се намали ризикот од појава на ГК [4-9]. Исто така, се препорачува да се земаат антиоксиданти и храна богата со витамини кои се сметаат за водечки во намалувањето на ризикот од појава на ГК. Раната детекција на болеста резултира со подолго преживување на болните со ГК. За таа цел неопходно е пациентите со висок ризик да бидат селектирани за да може рано да се открие ГК и да се почне со рана хемопревенција [9].

1.5.1. Дијагноза и проценка на клиничкиот стадиум на болеста

Иницијалната дијагноза на ГК честопати е задоцнета затоа што ГК во својата рана фаза не манифестира симптоми. Губитокот на тежина, абдоминална болка, гадење и повраќање, брзо заситување и симптомите слични на пептичен улкус вообичаено се манифестираат во доцната фаза на болеста. Под сомнение за ГК се и пациентите кои во пределот на желудникот имаат палпабилна маса, зголемен црн дроб, Вирхофова жлезда, периумбиликална маса или маса во ретроутериниот или ретровезикалниот простор палпабилна при ректална палпација.

Дијагностичките и стејџинг методи за ГК треба да обезбедат точност и висока осетливост и специфичност.

Двојноконтрастна бариум радиографија претставува евтин и ефикасен прв сликовен метод за дијагностицирање на ГК.

Горнодигестивната ендоскопија сè уште се смета за најосетлива и најспецифична дијагностичка и скрининг метода. Сепак, за масовно користење како скрининг за раното откривање на ГК, таа е прескапа. Затоа се препорачува таа да се прави еднаш годишно кај ризичните групи пациенти (со историја на ГК во семејството или со професионална изложеност на полуција во околината). И покрај ограничувањата, ендоскопијата со мултипни биопсии и ендоскопската ултрасонографија (ЕУС) продолжуваат да играат важна улога во дијагностицирањето на ГК.

ЕУС се користи за одредување на длабочината на локалната инвазија на ГК и детекција на позитивни лимфни јазли.

Мултидетекторската компјутеризирана томографија (MDCT) како метода најчесто се користи за одредување на стадиумот на болеста кај пациентите со ГК; обезбедува подобра резолуција за скенирање и реконструкција во повеќе пресеци.

Магнетната резонанца (MRI) е алтернативна неинвазивна дијагностичка метода. Со неа се обезбедува подобар контраст на меките ткива од КТ, но поради долгото времетраење и подложност на артефакти при движење, има ограничена

употреба за снимање на гастроинтестиналниот тракт, со исклучок на тенкото црево. Се смета дека компјутеризираната томографија има предност [34,63, 66].

Друга техника, наречена *транзиторна транспарентна проекција* (ТТР), првично беше развиена како замена за сликите со бариум со двоен контраст и обезбедува топографски поглед на гастричните лезии кои може да бидат комплементарни за дијагноза.

РЕТ-скенот со 2-[18F] флуоро-2-деокси-d-гликоза (FDG) во комбинација со КТ е препознаен како корисна дијагностичка техника во клиничката онкологија, а во неколку студии се посочува на точноста на оваа метода за одредување на стадиумот на болеста, односно детекција на присутни позитивни лимфни јазли и далечни метастази кај пациентите со ГК.

Стејџинг лапароскопијата е минимално инвазивна, краткотрајна метода која се користи за дијагностицирање или потврда на перитонеална расевка на болеста, која со гореспоменатите сликовни техники тешко се докажува. Оваа метода исто така се користи за следење на пациентите [66].

1.5.2. Третман на ГК

Хируршката ресекција или целосна гастректомија на желудникот спроведена во зависност од локализацијата на ГК, со стандардизирана лимфаденектомија, претставува златен стандард во терапијата на ракот на желудникот. Точната предоперативна проценка на ГК е од суштинско значење за планирање на оптималното хируршко лекување.

Предоперативната радиохемотерапија со последователен хируршки третман, како и адјувантна терапија по хируршкиот третман исто така се опции за пациентите со ГК. Предоперативната хемотерапија вообичаено се спроведува кај пациентите со напреднат ГК. Радиотерапијата и хемотерапијата без хируршки третман не даде задоволителни резултати во третманот на пациентите со ГК и во денешно време се користат само како палијативна терапија кај пациентите со IV стадиум на болеста. Кај овие болести исто така може да се користи ендоскопска ласер терапија и поставување на ендолуминал стент, во случаи кога туморот врши опструкција на желудникот.

Стапката на преживување кај пациентите со гастричен карцином сè уште е ниска и покрај развиените хируршки техники и напредокот во дополнителните предоперативни, неoadјувантни и адјувантни протоколи за хемотерапија. Хируршкиот третман обезбедува излекување само кај пациентите со дијагностициран ран карцином на желудникот, но со оглед на тоа дека и во развиените западни земји ракот на желудникот се дијагностицира во нересектибилна фаза од болеста, кај овие пациенти, како што е погоре кажано, системската терапија претставува главна опција за продолжување на животот. И покрај хируршката и системската хемотерапија, стапката на преживување на пациентите со напреднат рак на желудникот сепак останува ниска, поради што медицинскиот третман на ракот ургентно на желудникот изискува нови тераписки можности. Петгодишното преживување на пациентите со ГК, по спроведена соодветна терапија во прв стадиум изнесува 58-78%, во II стадиум изнесува околу 34%, во III стадиум изнесува 8-20% и во IV стадиум изнесува околу 7% [34,63, 66, 71-74].

Третманот на болните со напреднат стадиум на карцином на желудникот останува и понатаму предизвик и важна задача во клиничката хируршка пракса. Напредокот во третманот, кој датира од неодамна, почна да се занимава со биолошките геномски перспективи, што доведе до целно ориентирана терапија наменета за напреднат ГК [75-80].

Транстузумаб (херцептин), моноклонално антитело кое интерферира со HER2 рецепторот (блокатор на EGFR рецепторот 2) во комбинација со хемотерапевтските протоколи, го подобрува исходот и времето на преживување кај пациентите со повеќе различни хумани карциноми, вклучувајќи го и карциномот на желудникот [77,78]. Но, сепак, некои пациенти развиваат резистенција на терапијата со ова антитело, поради што понатамошните истражувања на HER2 рецепторот сè уште остануваат актуелни [77,80].

Одредувањето на HER2 експресијата кај карциномот на желудникот во корелација со веќе утврдени прогностички фактори, кои ги вклучуваат параметрите кои го одредуваат TNM стадиумот на болеста, би можело да претставува основа за понатамошни истражувања во областа на молекуларната

таргет и персонализирана терапија, додека, пак, утврдувањето на асоцираноста на гастричниот карцином со EBV инфекцијата може да даде поттик за фокусирање кон превенцијата на овој карцином.

2.0. Мотив за изработка на истражувањето и работна хипотеза

Мотив за изработка на оваа студија беше ниската стапка на преживување на пациентите со карцином на желудникот, и покрај развиените хируршки техники и напредокот во дополнителните предоперативни, неoadјувантни и адјувантни протоколи за хемотерапија. Утврдувањето на можните причинители/механизми и разбирањето на молекуларните основи на неоплазмите доведуваат до развој на нови молекуларни таргет терапии, кои интерферираат во различни сигнални каскади вклучени во клеточната пролиферација, преживување и диференцијација. Оттука, утврдување на здруженоста на гастричниот карцином со инфекцијата со EBV како еден од факторите кој може да учествува во карциногенезата на оваа неоплазма и експресијата на HER2 протеинот како молекул за таргет терапијата може да дадат придонес во развојот на нови превентивни и терапевтски стратегии за продолжување на животот на пациентите со гастричен карцином.

Во оваа студија се појде од претпоставката (**работна хипотеза**) дека степенот на имуноекспресија на HER2 е во корелација со клиничко-патолошките параметри. Се претпоставува дека зголемената експресија на HER2 е во позитивна корелација со диференцираноста на туморот, локалниот раст и присуството на регионални лимфни и далечни метастази, што претставува посебна задача која требаше да се докаже со ова истражување. **Хипотетички** со имунобоењето за EBV се очекуваше да се потврди присуство на EBVaGC во испитуваната група пациенти и кај нив да се потврди позитивна корелација со гореспоменатите клиничко-патолошки параметри.

3.0. Цели на истражувањето

1. Да се одреди имуноекспресијата за HER2 кај карциномите на желудникот.
2. Да се одреди имуноекспресијата за EBV кај карциномите на желудникот.
3. Овие параметри да се корелираат меѓу себе и со елементите од TNM класификацијата за карцином на желудник:

Локален раст на туморот (Т статус)

Присуство/отсуство на метастази во регионалните лимфни жлезди

Присуство/отсуство на далечни метастази

Стадиум на болеста

Диференцираност на туморот

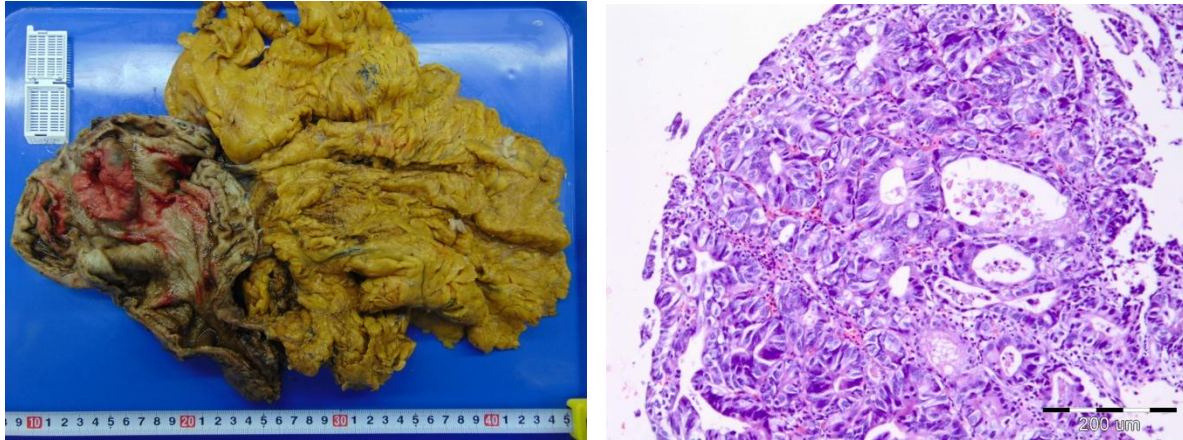
4.0. Материјал и методи

4.1. Избор на пациенти

Предмет на ова истражување беа 149 пациенти со гастричен карцином оперирани на Универзитетската клиника за дигестивна хирургија во Скопје, без претходен третман (хемотерапија или радиотерапија), кои писмено се согласија да учествуваат во студијата.

При изборот на пациентите се оценуваа резултатите од претходно стандардната дијагностичка постапка со позитивен наод за ГК (гастроскопски и хистопатолошки), и по направниот радиолошки имиџинг и стејџинг, беше спроведена предоперативна подготовка на болните. Кај сите испитаници се спроведе стандардна оперативна постапка според локализацијата на туморот со локорегионална или системска лимфаденектомија (суптотална ресекција со лимфаденектомија и тотална гастректомија со лимфаденектомија) (слика1). Оперативниот материјал беше испратен на Институтот за патологија за хистопатолошка и имунохистохемиска обработка за HER2 експресија. Ретроспективно беа обработени 100 пациенти, при што се користеа историјата на болеста од Универзитетската клиника за дигестивна хирургија и архивските парафински блокови, хистопатолошки препарати и хистопатолошки наоди од

Институтот за патологија, а проспективно беа обработени останатите 49 пациенти. Од серијата на 149 пациенти, кај 80 дополнително се направија имунохистохемиски боења на ткивните исечоци од ГК за EBV експресија. За дополнителните имунохистохемиски боења беа направени дополнителни пресеци од постојните парафински калапи од неоплазмата на пациентите.



Слика 1. а) Тотална гастректомија поради ГК, видлив во предел на кардија б) Микрофотографија од умерено диференциран ГК (H.E. x 200)

4.2. Методи на истражувањето

За секој испитаник се пополнуваше протоколарен лист во кој се нотираа следните клинички параметри:

1. Пол
2. Возраст
3. Етникум
4. Локализација на неоплазмата
5. Присуство на далечни метастази (со помош на сликовни дијагностики или интраоперативно).

Од испратениот оперативен материјал на Институтот за патологија во Скопје, врз основа на макроскопскиот, хистолошкиот, имунохистохемискиот и FISH наод се добиваше патохистолошки извештај за секој пациент посебно. Од добиените извештаи се нотираа и анализираа следните податоци:

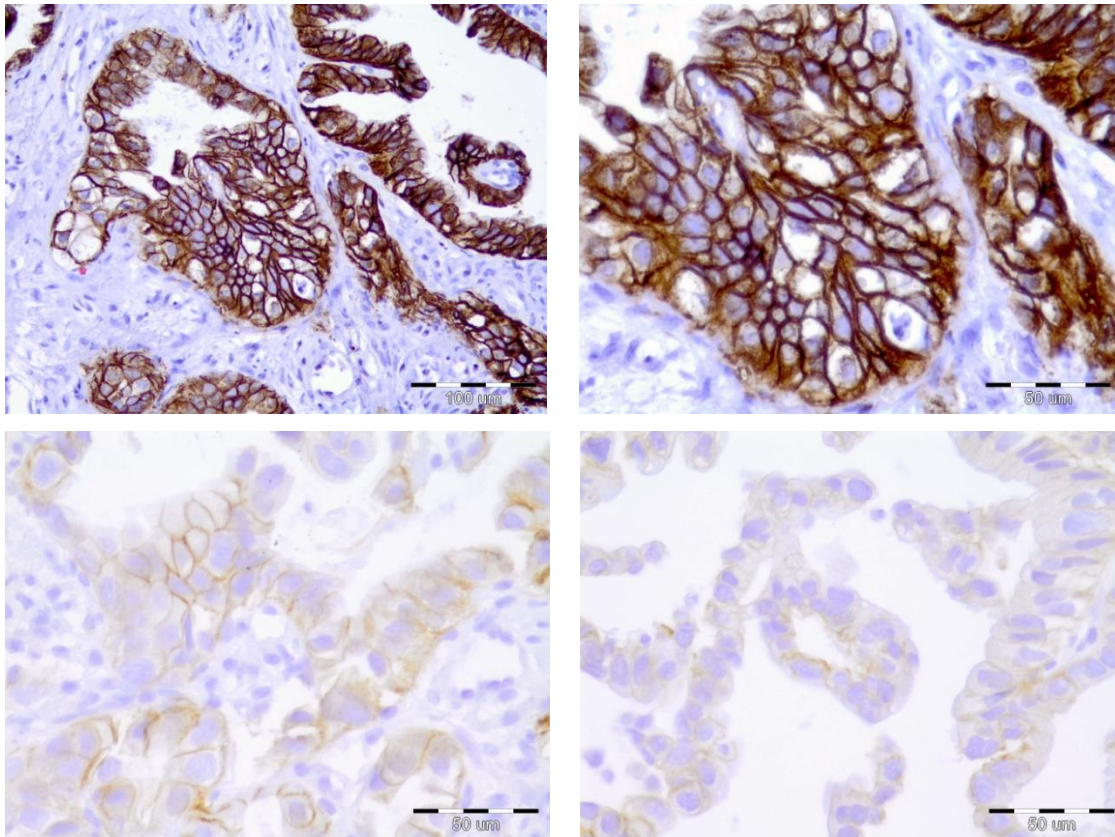
1. Степенот на диференцијација на клетките (G - градус) [64].
2. T, N и M параметарите за соодветните стадиуми од pTNM класификацијата (AJCC 2010) [64].
3. Стадиумот на болеста (патолошки, контролиран со клиничкиот стадиум во однос на далечни метастази) [64].
4. Имунохистохемиските и FISH наодите за експресијата на HER2.

Ткивни исечоци од ГК на сите 149 пациенти беа имунохистохемиски обоени со HER2-антитело (Ventana Medical Systems, Roche, anti-HER2/neu Rabbit Monoclonal Primary Antibody Clone 4B5), со што се добија пациентите кои беа позитивни и кај кои беше присутна имуноекспресија на HER2 протеинот.

Контрола на добиените резултати беше направена со стандардизирана FISH метода на Институтот за патологија во Скопје.

Кај примероците со позитивна имуноекспресија на HER2 се одредуваше и **степенот на експресија** на HER2, и тоа во 4 хистолошки шеми (слика2):

- 3+ силна, целосна базолатерална или латерална мембранозна реактивност во повеќе или еднакво на 10% од туморски клетки;
- 2+ слаба до умерена целосна, базолатерална или латерално мембранозна реактивност во повеќе или еднакво на 10% од туморските клетки;
- 1+ одвај забележлива мембранска реактивност во повеќе или еднакво на 10% од туморските клетки; туморските клетки се реактивни само во дел од нивните мембрани;
- нема реактивност или мембранска реактивност во помалку од 10% од туморските клетки.



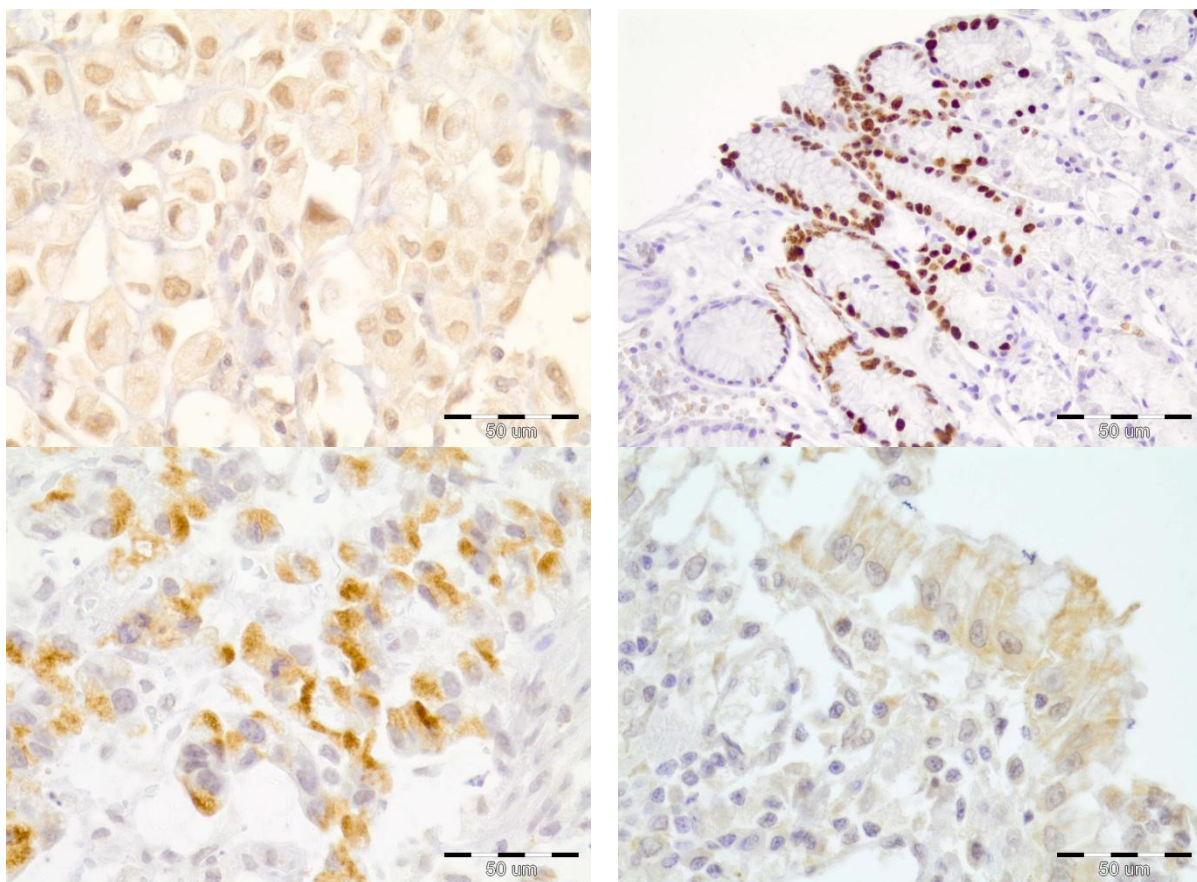
Слика 2: а) Her2+++ шема на експресија (x 200) б) Her2+++ шема на експресија на поголемо зголемување (x400) в) Her2 ++ шема на експресија (x 400) г) Her2 + шема на експресија (x400)

Дополнителните имунохистохемиски боења за експресија на EBV се изведоа со стандардна процедура користена на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје, со користење на Immunoperoxidase LSAB + system и специфично примарно моноклонално антитело против EBV (DAKO – Monoclonal Mouse, Anti-Epstein Barr Virus, LMP. Clones CS. 1-4. Code IR753).

Експресијата на EBV се одредуваше во ткивни исечоци на гастричниот карцином во 2 хистолошки шеми (слика 3):

1. присуство на обоен протеин во јадрото, и
2. присуство на обоен протеин во цитоплазмата.

Како контрола за боењата беше користена стандардна комерцијална контрола.



Слика 3. а) Нуклеарен позитивитет на EBV во прстен печатник тип на ГК (10 x 20) б) Нуклеарен позитивитет на EBV во група на жлезди во перитуморската мукоза која покажува интестинална метаплазија (10 x10) в) Цитоплазматски позитивитет за EBV во ГК (10 x20) г) Цитоплазматски позитивитет за EBV во перитуморски цилиндрични клетки и плазма клетки присутни во субмукозата на желудникот (10 x 20)

4.3. Статистичка обработка на податоците

Добиените податоци од ова истражување беа статистички обработени и овде се графички и табеларно прикажани.

Беа користени повеќе статистички операции:

1. Структурата на нумеричките статистички серии беше анализирана со помош на централна тенденција (просек) и мерките на дисперзија (стандардна девијација);
2. Анализата на односите помеѓу нумеричките статистички серии беше направена со помош на Pearson-ов коефициент на корелација;
3. Структурата на атрибутивните статистички серии беше анализирана со помош на односи и пропорции;

4. Анализата на односите помеѓу атрибутивните статистички серии беше направена со помош на Pearson-овиот χ^2 тест, а доколку станува збор за неправилна дистрибуција со Fisher exact test, и Spearman Rank Order Correlations;
5. Тестирање на значајност на разлики помеѓу две аритметички средини;
6. Кај зависните примероци (во испитуваните групи) беше направен Student-ов t-тест за зависни примероци, а при неправилна дистрибуција со непараметарскиот Wilcoxon-ов тест на еквивалентни парови;
7. Тестирање на значајност на разликите помеѓу две аритметички средини кај независните примероци (помеѓу испитуваните групи) беше направено со Student-овиот t-тест за независни примероци, а при неправилна дистрибуција со непараметарскиот Mann Whitney U Test.

За статистички значајна разлика се сметаше ако вредноста на p беше $p < 0,05$, а за високозначајна се сметаше ако вредноста на p беше $< 0,01$.

5. РЕЗУЛТАТИ

Во овој дел од истражувањето прикажани се резултатите добиени со обработка и анализа на 149 случаи на пациенти со карцином на желудникот, кои беа оперирани на Универзитетската клиника за дигестивна хирургија во Скопје.

5.1. Демографска структура

Според пол, во студијата беа вклучени 41 (27,52%) машки и 108 (72,48%) женски пациенти.

Пациентите беа на возраст од 40 до 86 години, со просечна возраст од $65,19 \pm 10,1$ години.

Во однос на етничката припадност, 114 (76,51%) испитаници беа Македонци, а 35 (23,49%) беа Албанци (табела 3, слика 4)

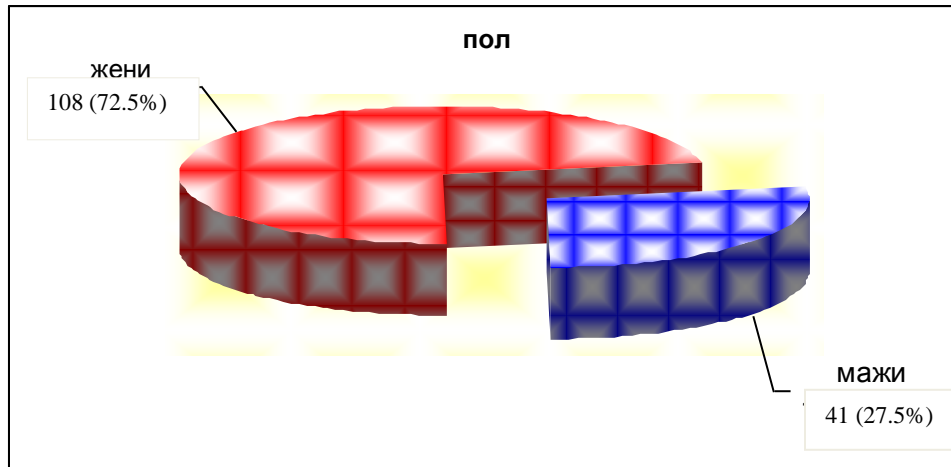
Табела 3. Демографска структура на испитаниците

Варијабла	n (%)
Пол	
мажи	41 (27,52)
жени	108 (72,48)

mean \pm SD (65,19 \pm 10,1) min-max (40 – 86)

Националност

Македонец	114 (76,51)
Албанец	35 (23,49)



Слика 4. Дистрибуција на гастричен карцином според пол

Во табелата 4 прикажани се клиничките и патохистолошките карактеристики на карциномите на желудник кај овие пациенти.

Најчеста локализација на карциномот на желудникот во самиот желудник, односно интрагастрично беше на cardia - 61 (40,94%) пациент, по што следеа карциноми на желудник локализирани на antrum/pylorus кај 51 (34,23%) пациент, и на corpus кај 37 (24,83%) пациенти.

Според Т статусот (локален раст), односно големината на туморот, повеќе од половина испитаници, односно 84 (56,38%) имаа карцином на желудник со Т4 статус.

Позитивни регионални лимфни јазли беа детектирани кај 113 (75,84%) пациенти, при што со N3 беа 56 (37,58%) пациенти.

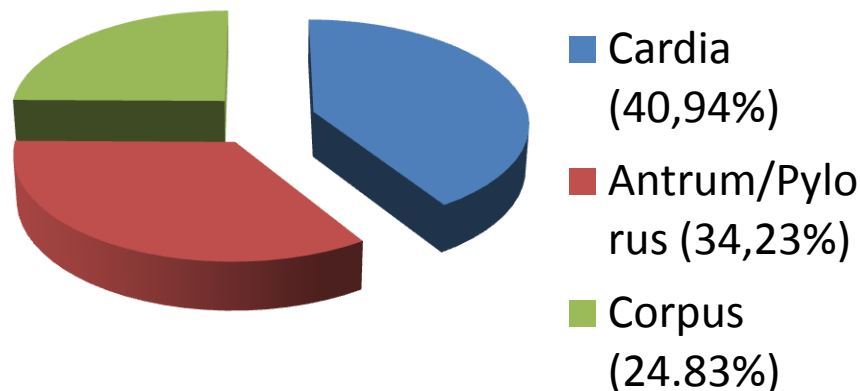
Далечни метастатски лезии во анализираната група беа детектирани кај 13 (8,72%) пациенти.

Според диференцираноста на туморот, во оваа група пациенти мнозинството имаа слабо диференциран карцином на желудник - 81 (54,36%), додека според стадиумот, карциномите беа најчесто дијагностицирани во стадиум III - 88 (59,06%) (табела 2, слика 2).

Табела 4. Клинички и патохистолошки карактеристики на карциномите на желудник кај испитаниците

Варијабла	n (%)
Локализација	
cardia	61 (40,94)
corpus	37 (24,83)
antrum/pylorus	51 (34,23)
T	
1	5 (3,6)
2	19 (12,75)
3	41 (27,52)
4	84 (56,38)
Лимфни јазли	
негативни	36 (24,16)
позитивни	113 (75,84)
N	
0	36 (24,16)
1	27 (18,12)
2	30 (20,13)
3	56 (37,58)
Далечни метастази	
нема	136 (91,27)
далечни метастази	13 (8,72)
Градус	
добро диференциран	2,68)
умерено диференциран	64 (42,95)
лошо диференциран	81 (54,36)
Стадиум	
1	11 (7,38)
2	37 (24,83)
3	88 (59,06)
4	13 (8,72)

Интрагастрична локализација



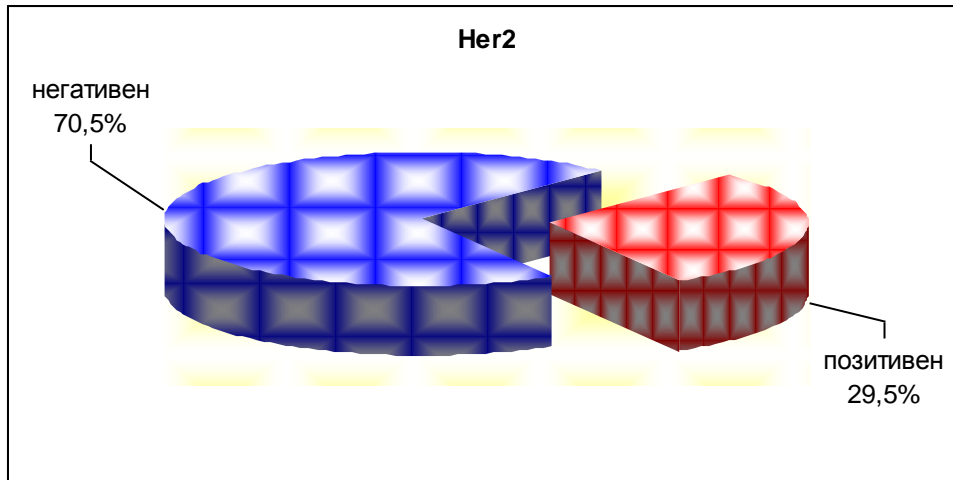
Слика 5. Дистрибуција на ГК според интрагастричната локализација

Имунохистохемиските резултати за присуство на HER2 протеинот покажаа HER2 експресија кај 44 (29,53%) карциноми, од кои кај 10 (6,71%) слаба експресија, кај 7 (4,69%) умерена експресија, и кај 27 (18,12%) силна HER2 експресија.

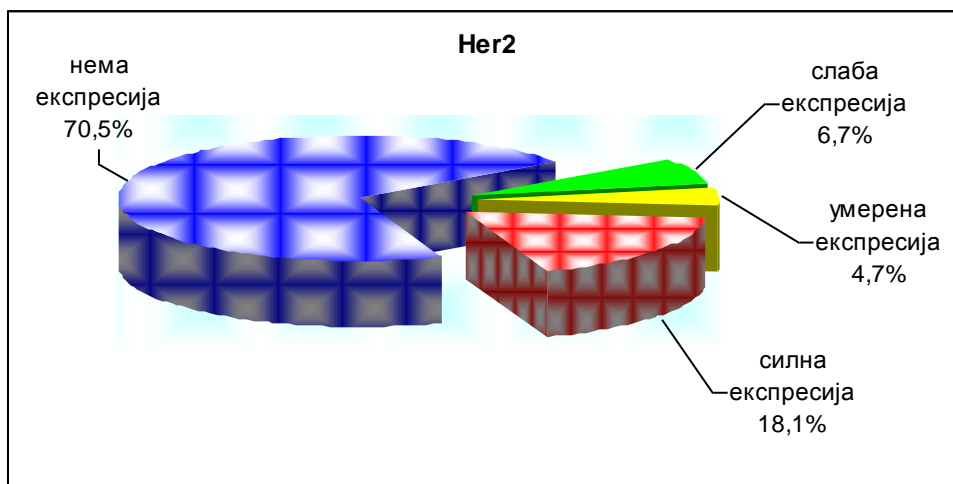
Асоцираност на гастричниот карцином со Епштајн-Бар вирусот, односно со инфекцијата со EBV имаше кај 19 (12,75%) пациенти (табела 5, слика 6, 7 и 8).

Табела 5. Експресија на HER2 и EBV кај испитаниците

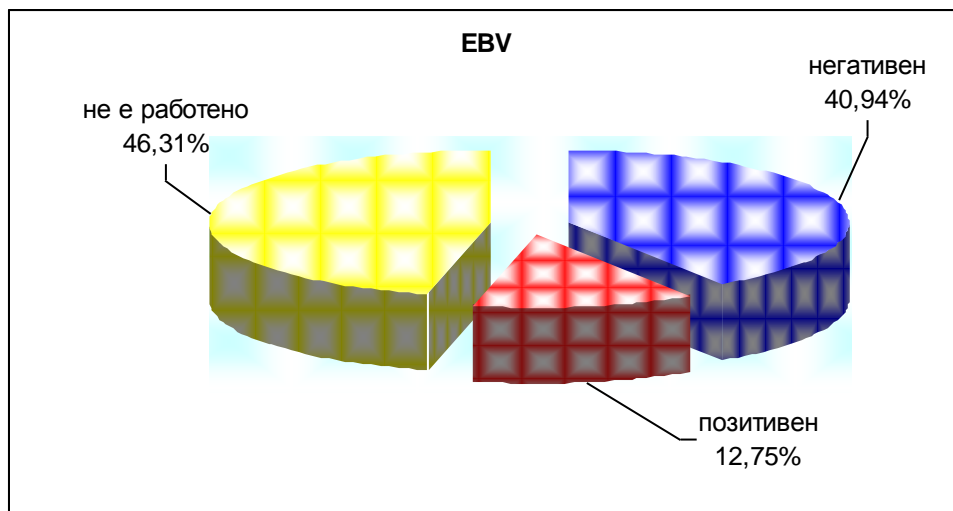
Варијабла	n (%)
HER2 шема	
нема експресија	105 (70,47)
слаба експресија (+)	10 (6,71)
умерена експресија (++)	7 (4,69)
силна експресија (+++)	27 (18,12)
HER2/neu	
негативен	105 (70,47)
позитивен	44 (29,53)
EBV	
негативен	61 (40,94)
позитивен	19 (12,75)
не е работено	69 (46,31)



Слика 6. Графички приказ на експресијата на HER2 протеинот



Слика 7. Графички приказ на експресијата на HER2 според позитивитетот и шемата на експресија



Слика 8. Графички приказ на експресијата на EBV (n=149)

5.2. Асоцираност на HER2 имуноекспресијата со демографските и клиничко-патолошки карактеристики на пациентите со карцином на желудникот

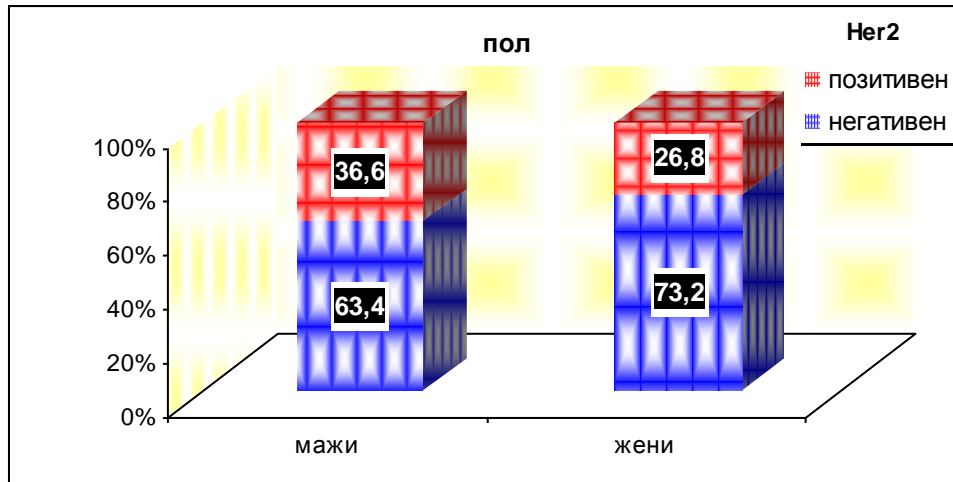
Во табелата 6 прикажана е дистрибуцијата на пациентите со позитивен и негативен HER2 протеин, во зависност од нивниот пол.

Кај машките пациенти со карцином на желудник во споредба со женските пациенти несигнификантно почесто беше регистрирана експресија на HER2 - 15 (36,59%) наспроти 29 (26,85%) ($p=0,24$) (слика 9).

Табела 6. Експресија на HER2 во зависност од полот

Пол	HER2		p-value
	N		
мажи	41	негативен 26 (63,41) позитивен 15 (36,59)	0,24 ns
жени	108	негативен 79 (73,15) позитивен 29 (26,85)	

p (Chi-square test)



Слика 9. Графички приказ на HER2 експресија во зависност од полот

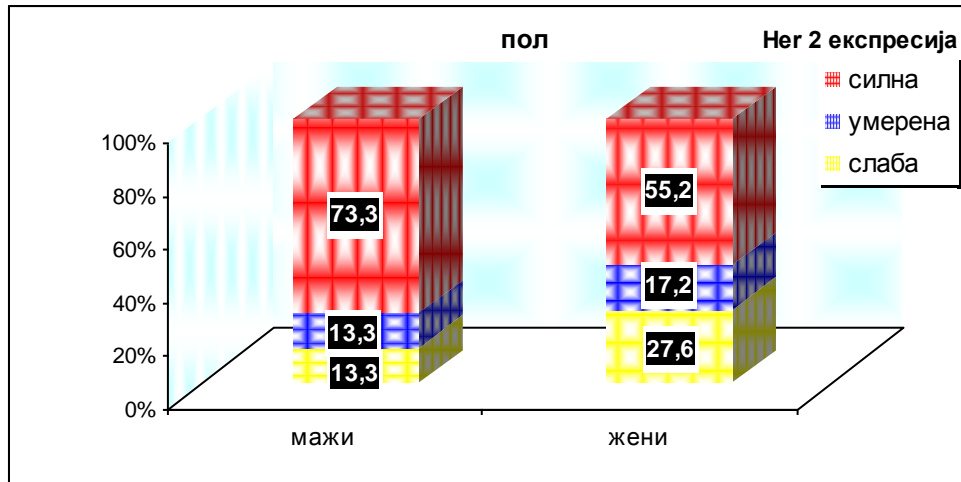
Машките и женските испитаници несигнификантно се разликуваа во однос на степенот на експресија на HER2 ($p=0,4$).

Карциноми на желудник со слаба експресија почесто имаа женските пациенти (27,59% наспроти 13,33%), карциноми со умерена експресија на HER2 исто така почесто беа дијагностицирани кај женските пациенти (17,24% наспроти 13,33%), додека машките пациенти почесто од женските имаа карцином на желудник со силна HER2 експресија (73,33% наспроти 55,17%). Овие опишани разлики во дистрибуцијата на машки и женски испитаници во однос на степенот на експресија на HER2 протеинот не беа доволни за статистичка сигнификантност (табела 7, слика 10).

Табела 7. Степен на позитивна HER 2 експресија според полот (n=44)

Пол	HER2 експресија			p-value	
	N	слаба	умерена		силна
мажи	15	2 (13,33)	2 (13,33)	11 (73,33)	0,4 ns
жени	29	8 (27,59)	5 (17,24)	16 (55,17)	

p (Fisher exact test)



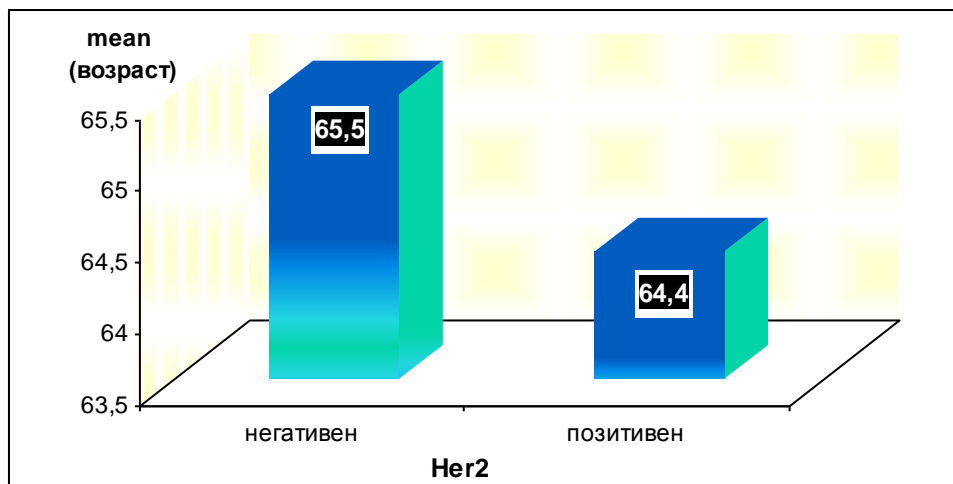
Слика 10. Приказ на HER2 експресија според полот

Пациентите со карцином на желудник кои покажаа позитивитет на имунобоењето за HER2 протеин беа на просечна возраст од $65,5 \pm 9,8$ години, а пациентите без позитивно боење за HER2 протеин беа на просечна возраст од $64,4 \pm 10,7$ години. Статистичката анализа како несигнификантна ја потврди разликата во просечната возраст на пациентите со позитивно и негативно HER2 имунобоење ($p=0,55$) (табела 8, слика 11).

Табела 8. Експресија на HER2 според возраста

HER2/neu	Дескриптивна статистика - возраст			p-value
	N	mean \pm SD	min-max	
негативен	105	$65,51 \pm 9,8$	42 – 86	0,55 ns
позитивен	44	$64,43 \pm 10,7$	40 – 86	

p (Student t-test)



Слика 11. Графички приказ на експресија на HER2 и возраст

Просечната возраст на испитаниците со слаба HER2 експресија беше $64,0 \pm 10,4$ години; просечната возраст на испитаниците со умерена експресија беше $61,7 \pm 7,4$ години, а испитаниците со силно изразена експресија на HER2 имаа просечна возраст од $65,3 \pm 11,6$ години.

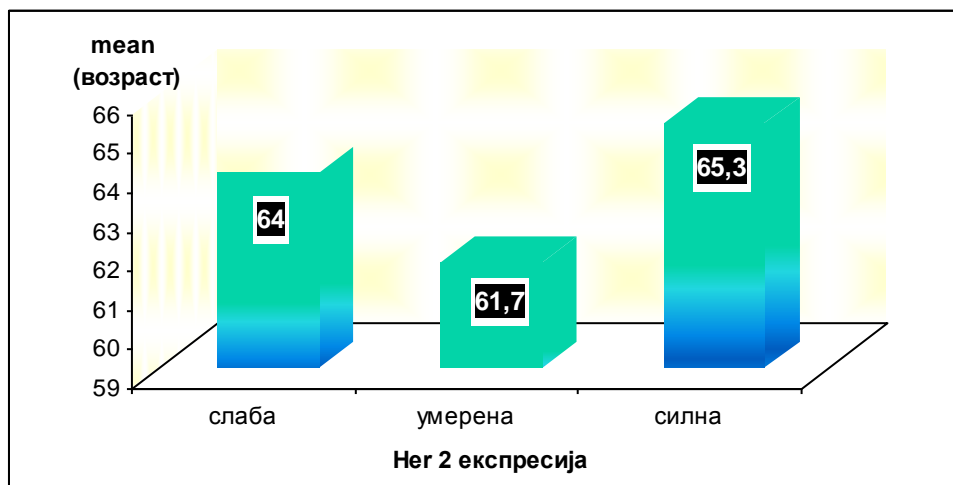
Просечната возраст на испитаниците со слаба HER2 експресија беше $64,0 \pm 10,4$ години; просечната возраст на испитаниците со умерена експресија беше $61,7 \pm 7,4$ години, а испитаниците со силно изразена експресија на HER2 имаа просечна возраст од $65,3 \pm 11,6$ години.

Разликата во просечната возраст на пациентите со карцином на желудник со слаба, умерена и силна експресија на HER2 протеинот беше статистички несигнификантна, односно возраста на пациентите со карцином на желудник и позитивен HER2 немаше сигнификантно влијание врз степенот на неговата експресија ($p=0,73$) (табела 9, слика 12).

Табела 9. Степен на експресија на HER2 според возраста

HER2	Дескриптивна статистика - возраст			p-value
	N	mean \pm SD	min-max	
слаба	10	$64,0 \pm 10,4$	51 – 79	0,73 ns
умерена	7	$61,71 \pm 7,4$	50 – 72	
силна	27	$65,29 \pm 11,6$	40 – 86	

p (Analysis of Variance)

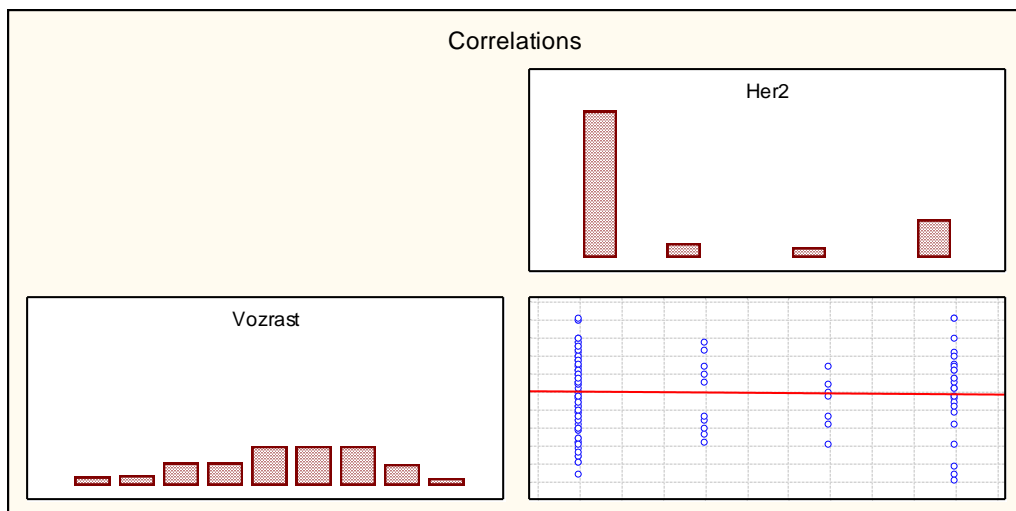


Слика 12. Графички приказ на степенот на експресија на HER2 според возраста

Во нашето истражување беше анализирана корелацијата, односно поврзаноста помеѓу возраста на пациентите со карцином на желудник и степенот на експресија на HER2 протеинот. Добиената вредност на Spearman-овиот коефициент на корелација од $R = -0,036$ покажа дека возраста на пациентите и степенот на експресија на HER2 негативно, односно индиректно корелираат помеѓу себе, односно кај постарите пациенти беа дијагностицирани карциноми на желудник со послаба експресија на HER2 протеинот. Статистичката анализа оваа корелација ја потврди како несигнификантна, односно незначајна ($p=0,66$) (табела 10, слика 13).

Табела 10. Сооднос на возраста со HER2 експресијата

	Spearman R	t-test t	p-level p
Возраст/HER2	-0,036	t=0,44	p=0,66 ns



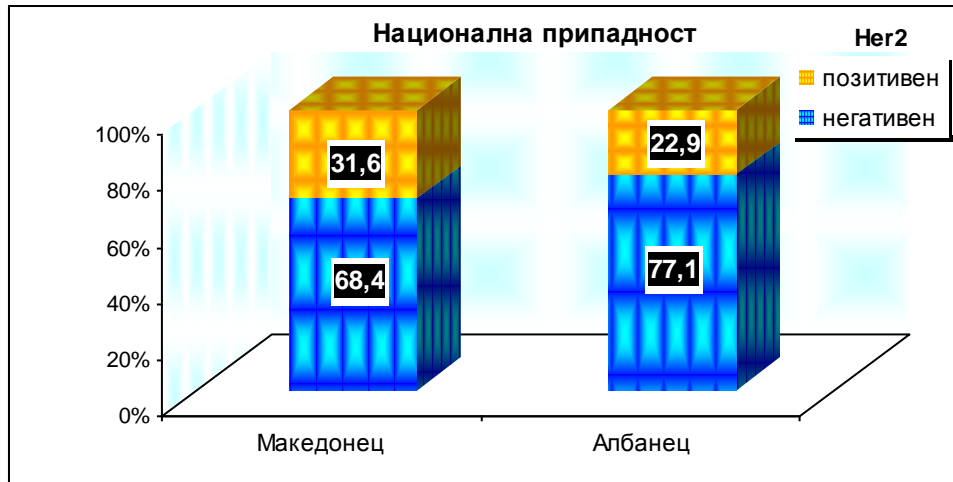
Слика 13. Сооднос на возраста со HER2 експресијата

Во групата македонски испитаници, позитивен HER2 протеин беше детектиран кај 36 (31,58%) пациенти, а во групата албански испитаници 8 (22,86%) пациенти имаа присутен HER2 протеин. Почестото детектирање на HER2 протеин во групата пациенти од македонска националност во споредба со пациентите од албанска националност не се потврди како статистички значајно ($p=0,32$) (табела 11, слика 14).

Табела 11. Дистрибуција на HER2 експресијата според националноста

Припадност	HER2		p-value	
	N	негативен		позитивен
Македонец	114	78 (68,42)	36 (31,58)	0,32 ns
Албанец	35	27 (77,14)	8 (22,86)	

p (Chi-square test)



Слика 14. Графички приказ на дистрибуција на HER2 експресијата според националноста

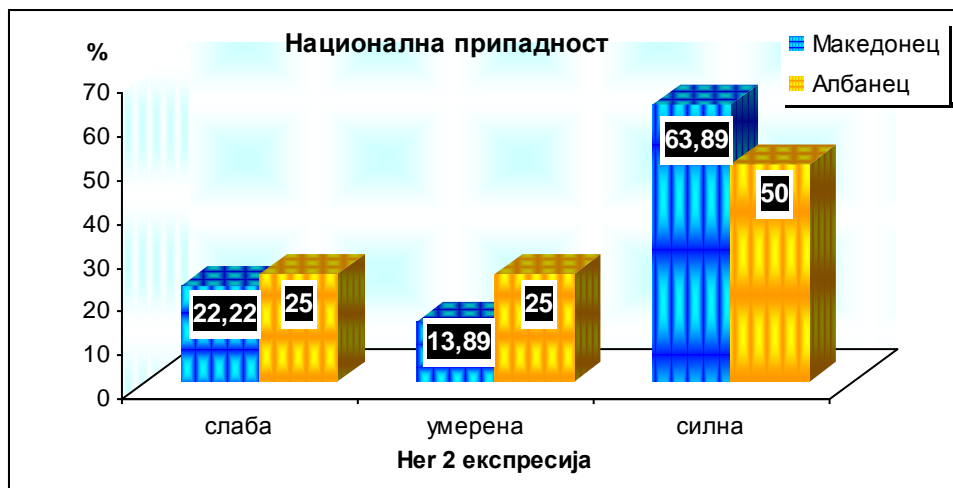
Степенот на HER2 експресија не зависеше сигнификантно од националната припадност на пациентите со карцином на желудник ($p=0,64$).

Силна експресија на HER2 протеин беше регистрирана незначајно почесто кај пациентите Македонци (63,89% наспроти 50%), додека слаба и умерена HER2 експресија беше регистрирана незначајно почесто кај пациентите Албанци (25% наспроти 22,22%; 25,0% наспроти 13,89%, соодветно) (табела 12, слика 15).

Табела 12. Дистрибуција на степенот на HER2 експресија според национална припадност

Припадност	N	HER 2 експресија			p-value
		слаба	умерена	силна	
Македонец	114	8 (22,22)	5 (13,89)	23 (63,89)	0,64 ns
Албанец	35	2 (25,0)	2 (25,0)	4 (50,0)	

p (Fisher exact test)



Слика 15. Графички приказ на дистрибуција на степенот на HER2 експресија според националната припадност

5.2.1. Интрагастрична локализација на ГК

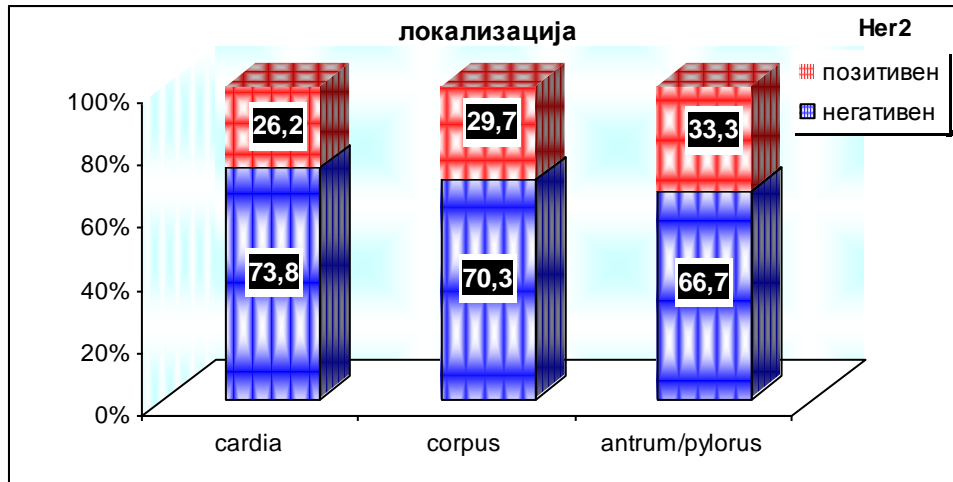
Резултатите од истражувањето не покажаа сигнификантна разлика во наодот на позитивен HER2 протеин во зависност од локализацијата на карциномот на желудник ($p=0,71$).

HER2 протеин беше детектиран кај 16 (26,23%) карциноми локализирани на cardia, 11 (29,73%) локализирани на corpus, и кај 17 (33,33%) карциноми со локализација на antrum/pylorus, односно локализацијата на карциномот на желудник на antrum/pylorus незначајно почесто од локализација на другите делови на желудник беше поврзана со наод на HER2 протеин (табела 13, слика 16)

Табела 13. Дистрибуција на HER2 позитивни случаи според интрагастричната локализација

Локализација	N	HER2		p-value
		негативен	позитивен	
cardia	61	45 (73,77)	16 (26,23)	0,71 ns
corpus	37	26 (70,27)	11 (29,73)	
antrum/pylorus	51	34 (66,67)	17 (33,33)	

p (Chi-square test)



Слика 16. Графички приказ на дистрибуцијата на HER2 позитивни случаи според интрагастричната локализација

HER2+ експресија беше почесто регистрирана кај карциномите на телото на желудникот (54,55%) во споредба со локализацијата на antrum/pylorus (17,65%) и на cardia (6,25%).

HER2++ експресија беше најчесто регистрирана кај карциномите на cardia на желудник (31,25%), а кај ниту еден карцином на телото на желудник.

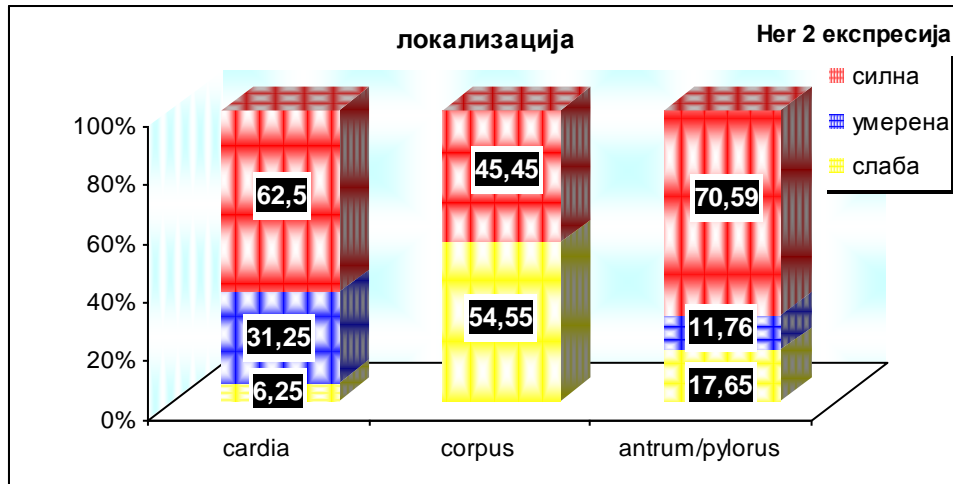
HER2+++ експресија беше почесто регистрирана кај карциномите на желудник локализирани на antrum/pylorus, споредено со локализациите на cardia и corpus (70,59%, 62,5%, 45,45%, соодветно).

За $p=0.005$ беше потврдена статистички сигнификантна разлика во степенот на HER2 експресија во зависност од интрагастричната локализација на карциномот на желудник (табела 14, слика 17).

Табела 14. Степен на HER2 експресија според локализацијата на ГК

Локализација	HER2 експресија			p-value	
	N	слаба	умерена		силна
cardia	61	1 (6,25)	5 (31,25)	10 (62,50)	0,005 sig
corpus	37	6 (54,55)	0	5 (45,45)	
antrum/pylorus	51	3 (17,65)	2 (11,76)	12 (70,59)	

p (Fisher exact test)



Слика 17. Графикон за степенот на HER2 експресија и локализација на ГЖК

5.2.2. Т статус

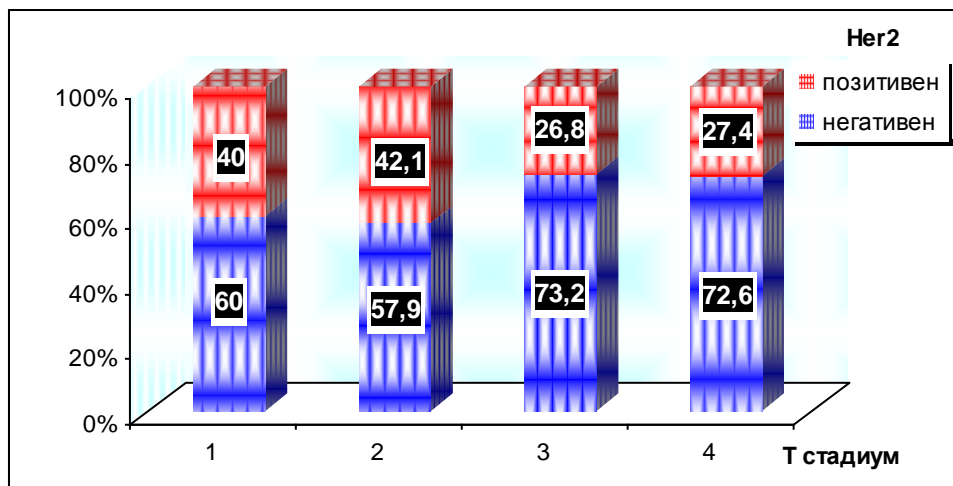
Пациентите со карцином на желудник со понизок Т статус почесто покажуваа присуство на експресија на HER2 протеин. Во оваа серија на пациенти, HER2 протеинот беше детектиран кај 2 (40%) пациента со карцином во Т1 статус, кај 8 (42,11%) со карцином во Т2 статус, кај 11 (26,83%) пациенти со карцином во Т3 статус, и кај 23 (27,38%) пациенти со карцином на желудник во Т4 статус.

Овие опишани разлики во дистрибуцијата на HER2 позитивни и негативни карциноми на желудник, а во зависност од Т статусот не беа доволни за статистичка сигнификантност ($p=0,54$) (табела 15, слика 18).

Табела 15. Дистрибуција на HER2 позитивни и негативни пациенти според Т статусот

Т стадиум	HER2		p-value	
	n=149	Негативен n (%)		Позитивен n (%)
1	5	3 (60)	2 (40)	0,54 ns
2	19	11 (57,89)	8 (42,11)	
3	41	30 (73,17)	11 (26,83)	
4	84	61 (72,62)	23 (27,38)	

p (Fisher exact test)



Слика 18. Графички приказ на дистрибуцијата на HER2 позитивни и негативни пациенти според Т статусот

Пациентите со карцином на желудник со понизок Т статус почесто имаа посилно изразена експресија на HER2 протеинот.

Дистрибуцијата во табелата 16 покажува дека слаба HER2 експресија имаа најчесто пациентите со Т3 статус (36,36%), а потоа следат пациентите со Т4 статус (21,74%), умерена HER2 експресија имаа исто така најчесто пациентите со Т3 статус (27,27%), а потоа и со Т4 статус (13,04%), додека, пак, силна HER2 експресија имаа двајцата пациенти со Т1 статус, 75% пациенти со карцином во Т2 статус, 36,36% со карцином во Т3 статус, и 65,22% пациенти со карцином во Т4 статус.

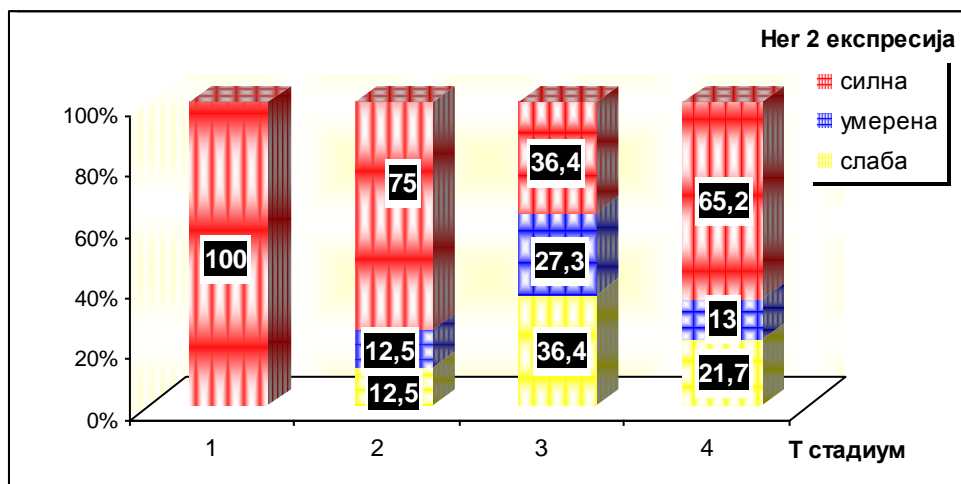
Статистичката анализа како несигнификантна ја потврди разликата во дистрибуцијата на пациентите со слаба, умерена и силна HER2 експресија, а во зависност од Т статусот во кој е дијагностициран карциномот на желудникот ($p=0,63$) (табела 16, слика 19).

Табела 16. Степен на HER2 експресија според Т статусот

Т статус	HER2 експресија			p-value	
	n=44	Слаба n (%)	Умерена n (%)		Силна n (%)
1	2	0	0	2 (100)	0,63 ns
2	8	1 (12,5)	1 (12,5)	6 (75)	

3	11	4 (36,36)	3 (27,27)	4 (36,36)
4	23	5 (21,74)	3 (13,04)	15 (65,22)

p (Fisher exact test)

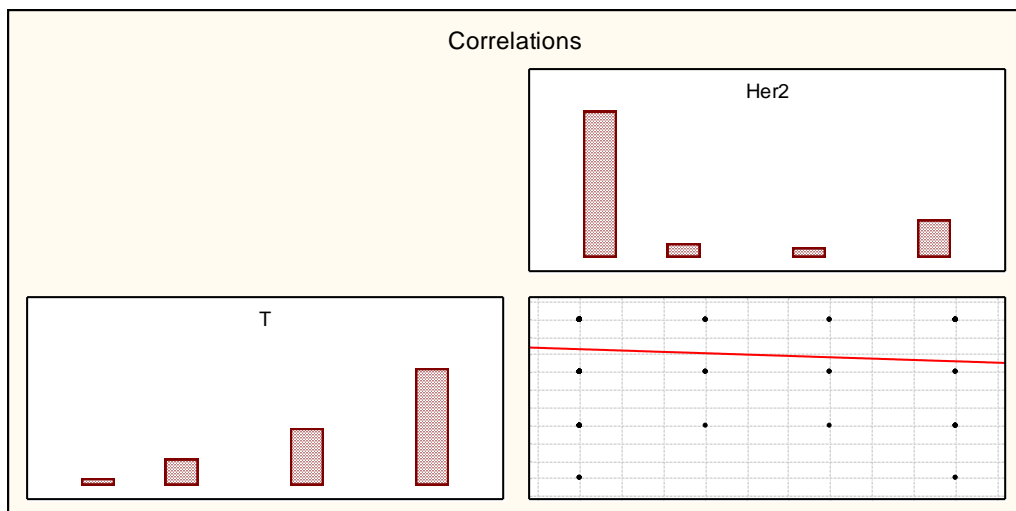


Слика 19. Графички приказ на степенот на HER2 експресија според Т статусот

Испитуваната корелација помеѓу Т статусот на карциномот на желудник и степенот на експресија на HER2 протеинот беше негативна, односно индиректна ($R = -0,08$), што покажува дека повисок Т статус на карцином на желудник е поврзан со послаба HER2 експресија, и обратно. Но, статистички оваа корелација не беше потврдена како сигнификантна, односно значајна ($p=0,33$) (табела 17, слика 20).

Табела 17. Сооднос на Т статусот и степенот на експресија на HER2

	Spearman R	t-test	p-level
Т статус / Her2	-0,079	t=0,97	p=0,33 ns



Слика 20. Корелација помеѓу T статусот и степенот на експресија на HER2

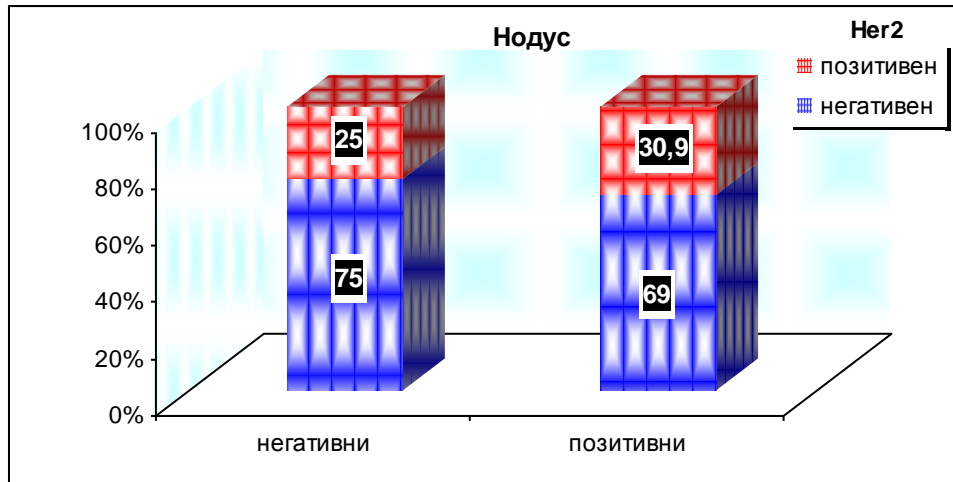
5.2.3. N статус

Во групата пациенти без зафатени регионални лимфни јазли, кај 9 (25%) беше детектиран HER2 протеин, додека во групата пациенти со позитивни регионални лимфни јазли, HER2 протеин беше детектиран почесто, односно кај 35 (30,97%) пациенти. Но, оваа разлика во дистрибуцијата на пациенти со негативен и позитивен HER2 во однос на негативни и позитивни регионални лимфни јазли не беше доволна за статистичка сигнификантност ($p=0,49$) (табела 18, слика 21).

Табела 18. Експресија на HER2 протеинот во ГК кај пациенти со позитивни и негативни лимфни јазли

Нодус	N	HER2		p-value
		негативен	позитивен	
негативни	36	27 (75)	9 (25)	0,49 ns
позитивни	113	78 (69,03)	35 (30,97)	

p (Chi-square test)



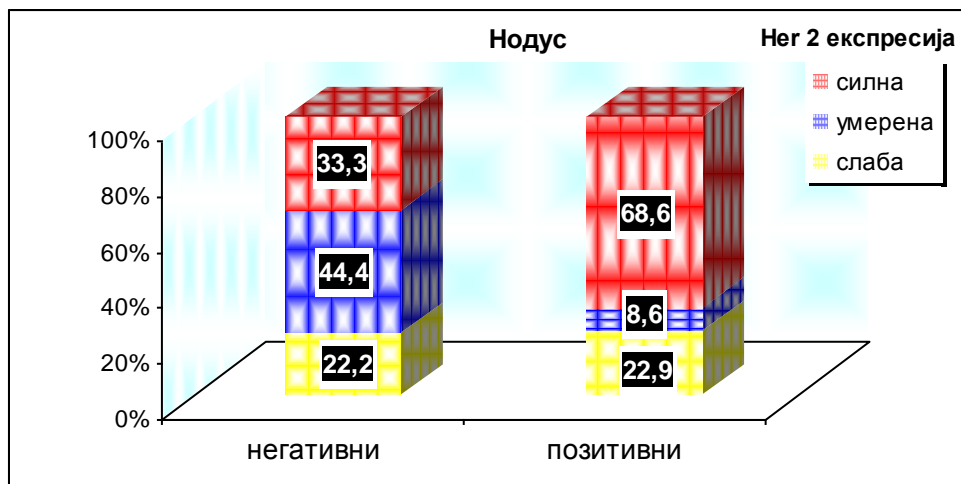
Слика 21. Графички приказ на позитивна експресија на HER2 во ГК кај пациенти со позитивни и негативни лимфни јазли

Шемата на HER2 експресија сигнификантно се разликуваше кај пациентите со карцином на желудник со негативни и позитивни лимфни јазли ($p=0,03$). Силна експресија на HER2 протеинот беше значајно почесто регистрирана кај пациентите со позитивни регионални лимфни јазли, односно кај 33,33% од пациентите со негативни лимфни јазли, и кај 68,57% пациенти со позитивни лимфни јазли (табела 19, слика 22).

Табела 19. Степен на HER2 експресија во ГК кај пациентите со и без метастази во лимфните јазли

Нодус	HER2 експресија			p-value	
	N	слаба	умерена		силна
негативни	9	2 (22,22)	4 (44,44)	3 (33,33)	0,03 sig
позитивни	35	8 (22,86)	3 (8,57)	24 (68,57)	

p (Fisher exact test)



Слика 22. Графички приказ на степенот на HER2 експресија во ГК кај пациентите со и без метастази во лимфните јазли

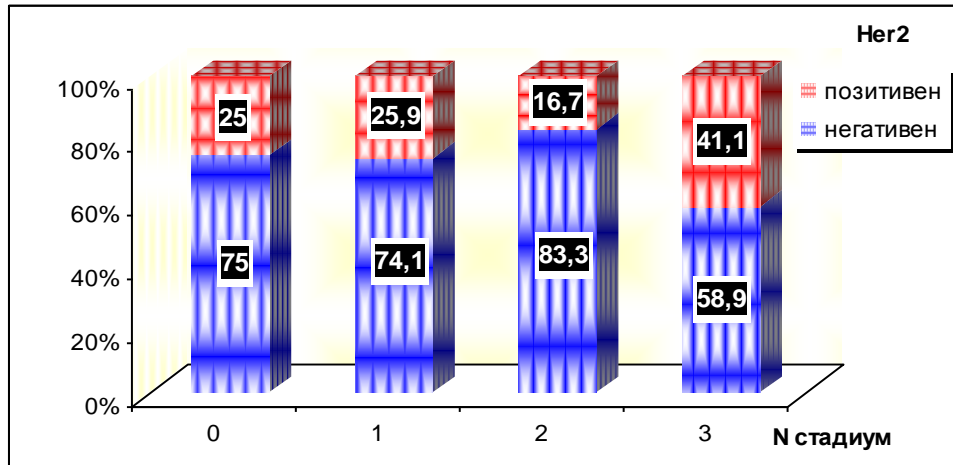
Резултатите за позитивитетот на HER2 протеинот во зависност од N статусот (N статус) на туморот, кога N статусот се расчлени на N0, N1, N2 и N3 покажаа дека овој протеин беше детектиран кај 9 (25%) пациенти со карцином на желудник во N0 статус, 7 (25,93%) со N1 статус, 5 (16,67%) пациенти со N2 статус, и кај 23 (41,07%) пациенти со карцином на желудник во N3 статус.

Статистичката анализа не потврди сигнификантна разлика во дистрибуцијата на пациентите со негативен и позитивен HER2 протеин, а во зависност од N статусот на туморот ($p=0,089$) (табела 20, слика 23)

Табела 20. Експресија на HER2 протеинот според N статусот

N статус	N	HER2		p-value
		негативен	позитивен	
0	36	27 (75)	9 (25)	0,089 ns
1	27	20 (74,07)	7 (25,93)	
2	30	25 (83,33)	5 (16,67)	
3	56	33 (58,93)	23 (41,07)	

p (Chi-square test)



Слика 23. Графички приказ на експресијата на HER2 протеинот според N статусот

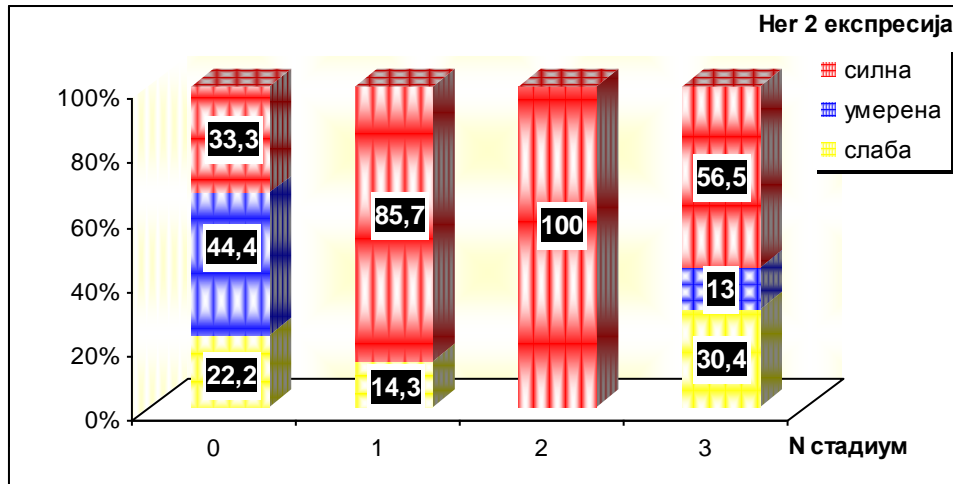
Не беше потврдена статистички сигнификантна разлика и во шемата на HER2 експресија во зависност од N статусот на туморот ($p=0,12$).

Дистрибуцијата на резултати прикажана во табелата 19 покажува дека во групата пациенти со карцином на желудник со N0 статус, кај најголем број, односно процент беше присутен HER2 протеин со умерена експресија – 4 (44,44%); во групата пациенти со N1 статус, кај 6/7 (85,71%) беше регистрирана умерена HER2 експресија; сите 5 пациенти со N2 статус имаа силна експресија на HER2 протеинот; во групата пациенти со N3 статус и позитивен HER2 протеин, кај 7 (30,43%) беше детектирана негова слаба експресија, кај 3 (13,04%) умерена експресија, а кај повеќе од 50% од пациентите со овој статус беше детектирана силна HER2 експресија - 13 (56,52%) (табела 21, слика 24).

Табела 21. Степен на HER2 експресија во зависност од N статусот кај пациентите со ГК

N статус	HER2 експресија				p-value
	N	Слаба (+)	Умерена (++)	Силна (+++)	
0	9	2 (22,22)	4 (44,44)	3 (33,33)	0,12 ns
1	7	1 (14,29)	0	6 (85,71)	
2	5	0	0	5 (100)	
3	23	7 (30,43)	3 (13,04)	13 (56,52)	

p (Fisher exact test)

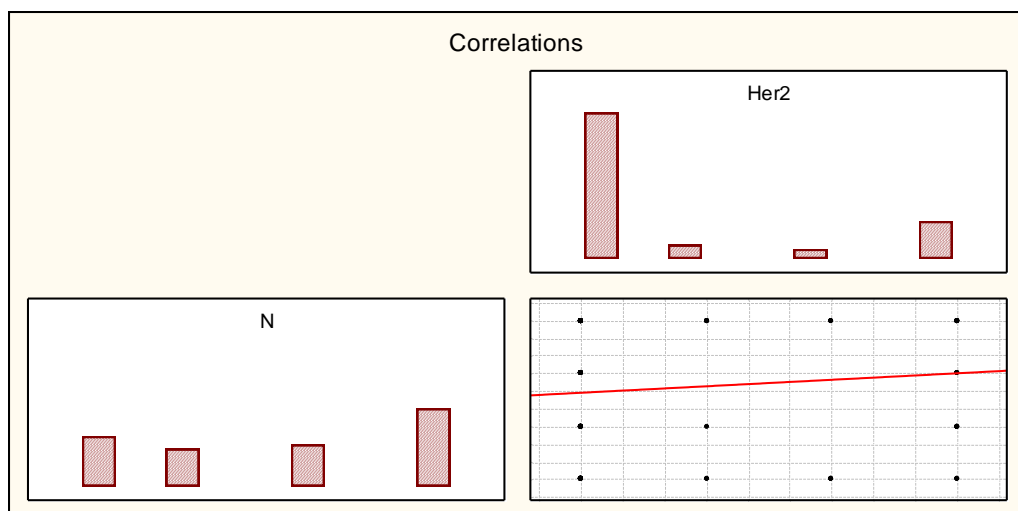


Слика 24. Графички приказ на степенот на HER2 експресија во зависност од N статусот кај пациентите со ГК

Според вредноста на Spearman-овиот коефициент на корелација, испитуваната корелација помеѓу шемата на HER2 експресија и N статусот кај пациентите со карцином на желудник беше позитивна, односно овие два параметра беа поврзани пропорционално ($R=0,142$); посилна HER2 експресија беше поврзана со повисок N статус, и обратно. Статистичката сигнификантност на оваа корелација беше изразена преку вредност на $p=0,08$ (табела 22, слика 25).

Табела 22. Сооднос помеѓу степенот на HER2 експресија и N статусот

Варијабла	Spearman R	t-test	p-level
N статус / HER2	0,142	t=1,74	p=0,083 ns



Слика 25. Графички приказ на соодносот помеѓу степенот на HER2 експресија и N статусот кај пациентите со ГК

5.2.4. M статус

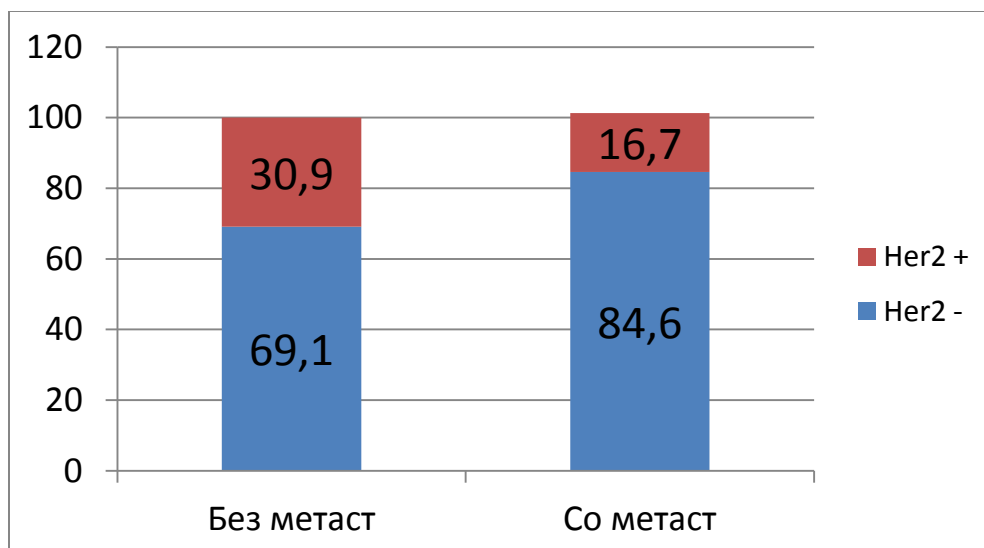
Резултатите од нашето истражување не покажаа сигнификантна разлика во дистрибуцијата на пациентите со и без HER2 позитивен протеин, а во зависност од присутни метастази ($p=0,65$).

Во оваа група пациенти со карцином на желудник, со позитивен HER2 протеин беа 42 (30,88%) пациенти без далечни метастази и 2 (16,67%) пациента со метастази (табела 23, слика 26).

Табела 23. Експресија на HER2 протеинот во ГК кај пациенти со и без далечни метастази

Метастази	Her2		p-value
	N	негативен позитивен	
отсутни	136	94 (69,12) 42 (30,88)	0,65 ns
присутни	13	11 (84,61) 2 (16,67)	

p (Fisher exact test)



Слика 26. Графички приказ на експресијата на HER2 протеинот во ГК кај пациентите со и без далечни метастази

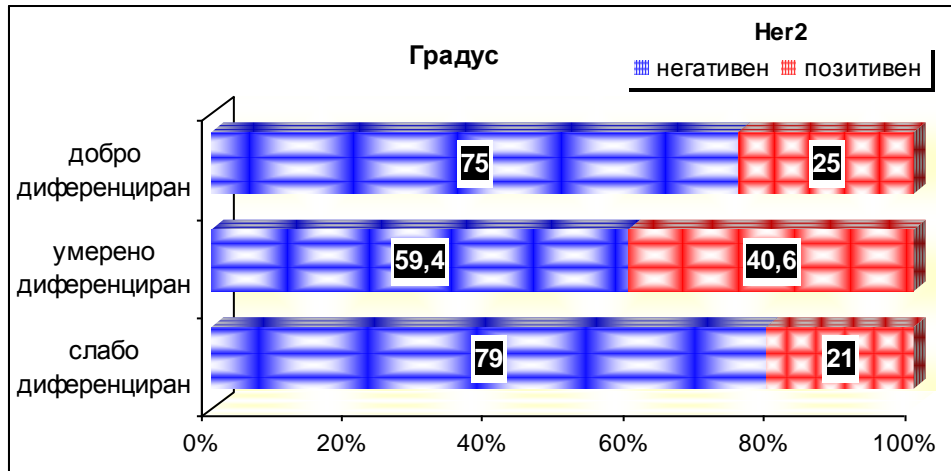
5.2.5 G – степен на диференцираност на туморот

За $p=0,034$ беше потврдена статистички сигнификантна разлика во степенот на диференцираност на туморот кај пациентите со негативен и позитивен HER2 протеин. Оваа сигнификантност се должи на почеста детекција на HER2 протеинот кај пациентите со умерено диференциран тумор во споредба со пациентите со слабо диференциран тумор (40,63% наспроти 20,99%; $p=0,01$) (табела 24, слика 27).

Табела 24. Дистрибуција на HER2 експресијата според диференцираноста на ГК

Градус	N	Her2		p-value
		негативен	позитивен	
добро диференциран	4	3 (75)	1 (25)	0,034 sig
умерено диференциран	64	38 (59,38)	26 (40,63)	
слабо диференциран	81	64 (79,01)	17 (20,99)	

p (Fisher exact test)



Слика 27. Графички приказ на HER2 експресијата според диференцираноста на ГК

Кај пациентот со добро диференциран тумор и позитивен HER2 протеин беше регистрирана негова силна експресија.

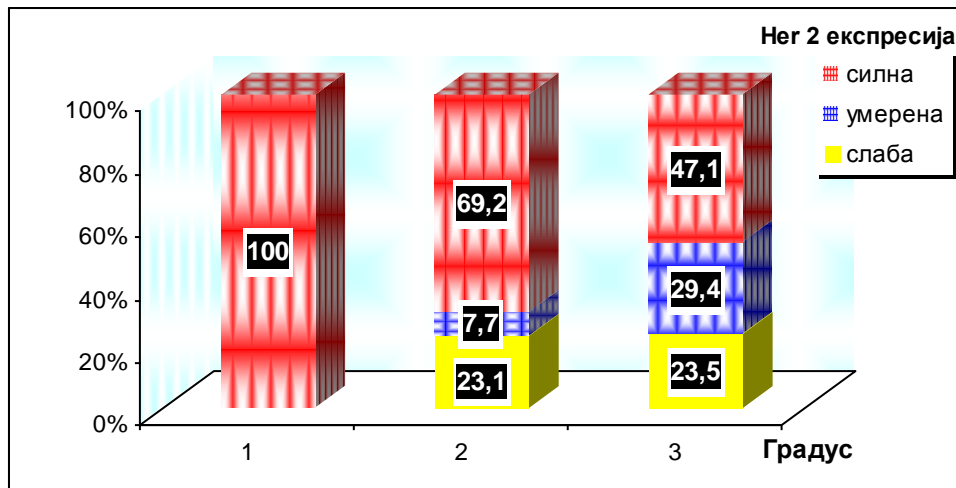
Шема HER2+ експресија речиси подеднакво беше застапена кај умерено диференцираните и слабо диференцираните тумори (23,08% наспроти 23,53%); шема HER2++ експресија беше почест наод кај слабо диференцираните тумори споредено со умерено диференцираните (29,41% наспроти 7,69%); шема HER2+++ експресија почесто беше детектирана кај умерено диференцираните тумори споредено со лошо диференцираните (69,23% наспроти 47,06%).

Статистичката анализа не ја потврди како сигнификантна разликата во шемите на HER2 експресија во зависност од диференцираноста на туморот ($p=0,28$) (табела 25, слика 28).

Табела 25. Степен на HER2 експресија според диференцираноста на ГК

Градус	N	HER2 експресија			p-value
		Слаба (+)	Умерена (++)	Силна (+++)	
добро диференциран	1	0	0	1 (100)	0,28 ns
умерено диференциран	26	6 (23,08)	2 (7,69)	18 (69,23)	
лошо диференциран	17	4 (23,53)	5 (29,41)	8 (47,06)	

p (Fisher exact test)

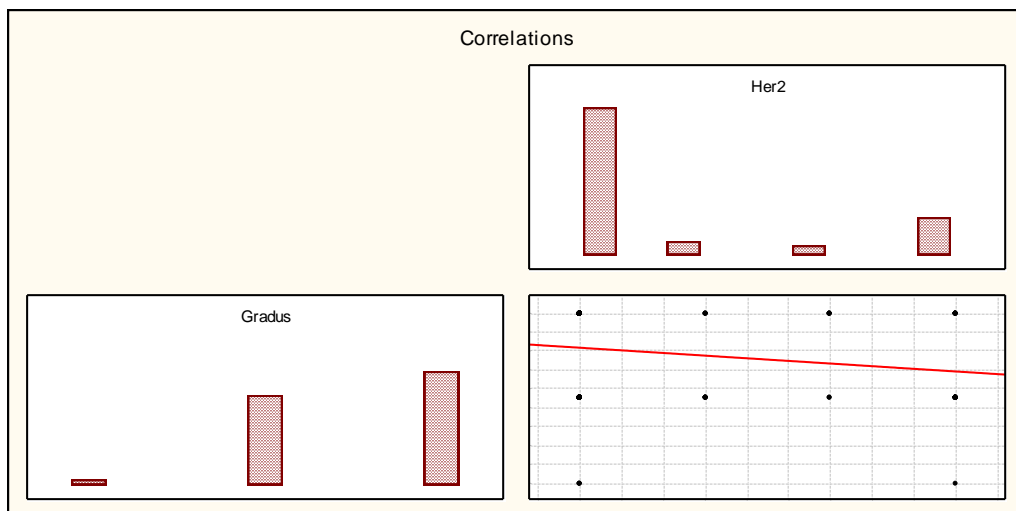


Слика 28. Графички приказ на степенот на HER2 експресијата според диференцираноста на ГК

Статистички сигнификантна корелација, односно поврзаност беше потврдена помеѓу степенот на експресија на HER2 протеинот и дифренцираноста на туморот ($p=0,01$). Во однос на правецот на корелацијата, таа беше негативна, односно индиректна, со вредност на $R= - 0,209$, што покажува дека посилна HER2 експресија беше поврзана со подобра диференцираност на туморот, и обратно (табела 26, слика 29).

Табела 26. Поврзаност помеѓу диференцираноста на ГК и степенот на експресија на HER2

Варијабла	Spearman R	t-test	p-level
Градус & HER2	-0,209	t=2,59	$p=0,01$ sig



Слика 29. Корелација помеѓу диференцираноста на ГК и степенот на експресија на HER2

5.2.6. Стадиум на болеста

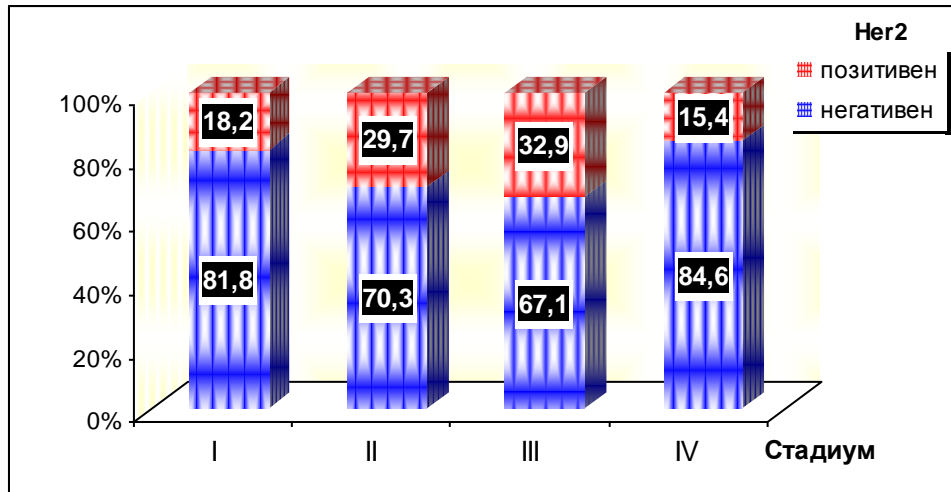
Наодот на HER2 протеин не зависеше сигнификантно од стадиумот на болеста на пациентите со карцином на желудникот ($p=0,56$).

Позитивен HER2 протеин имаа 2 (18,18%) пациента со карцином на желудник во стадиум I, 11 (29,73%) пациенти со карцином во стадиум II, 17 (58,62%) во стадиум III, и двајцата пациенти со карцином на желудник во стадиум IV (табела 27, слика 30).

Табела 27. Дистрибуција на HER2 експресијата кај пациентите со ГК според стадиумот на болеста

Стадиум	N	HER2		p-value
		негативен	позитивен	
I	11	9 (81,82)	2 (18,18)	0,56 ns
II	37	26 (70,27)	11 (29,73)	
III	88	59(67,05)	29 (32,95)	
IV	13	11 (84,62)	2 (15,38)	

p (Fisher exact test)



Слика 30. Графички приказ на дистрибуција на HER2 експресијата кај пациентите со ГК според стадиумот на болеста

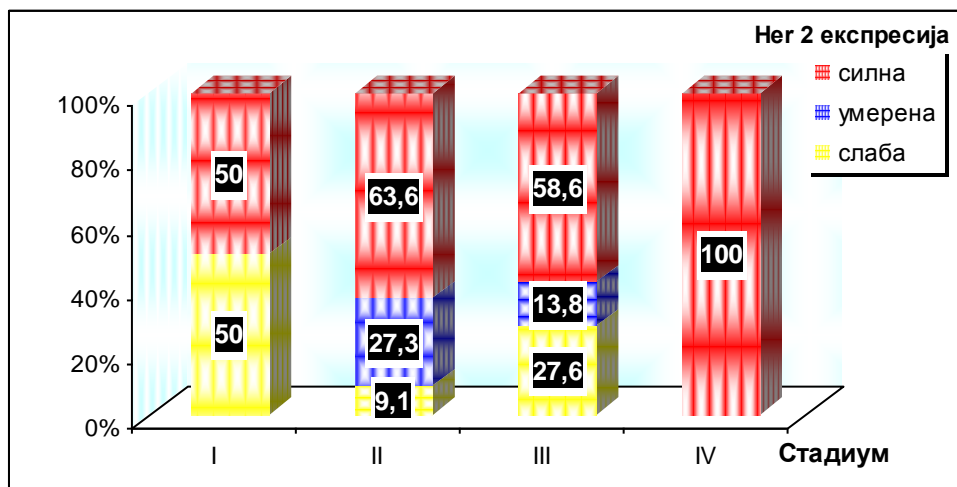
Стадиумот на дијагностициран карцином на желудник немаше сигнификантно влијание врз степенот на HER2 експресија кај пациентите со позитивен HER2 протеин ($p=0,61$).

Слаба HER2 експресија беше регистрирана кај еден пациент со карцином на желудник во прв стадиум, 1 пациент со карцином во втор стадиум, и 8 (27,59%) пациенти со карцином во трет стадиум. Умерена HER2 експресија беше регистрирана кај 3 (27,27%) пациенти со карцином во втор стадиум, и кај 4 (13,79%) во трет стадиум. Силна HER2 експресија беше регистрирана кај еден пациент со карцином на желудник во прв стадиум, 7 (63,64%) пациенти со карцином во втор стадиум, 17 (58,62%) пациенти со карцином во трет стадиум, и кај двајцата пациенти со дијагностициран четврти стадиум на карцином на желудник (табела 28, слика 31).

Табела 28. Степен на експресија на HER2 протеинот според стадиумот на болеста

Стадиум	N	HER2 експресија шема			p-value
		Слаба (+)	Умерена (++)	Силна (+++)	
I	2	1 (50)	0	1 (50)	0,61 ns
II	11	1 (9,09)	3 (27,27)	7 (63,64)	
III	29	8 (27,59)	4 (13,79)	17 (58,62)	
IV	2	0	0	2 (100)	

p (Fisher exact test)

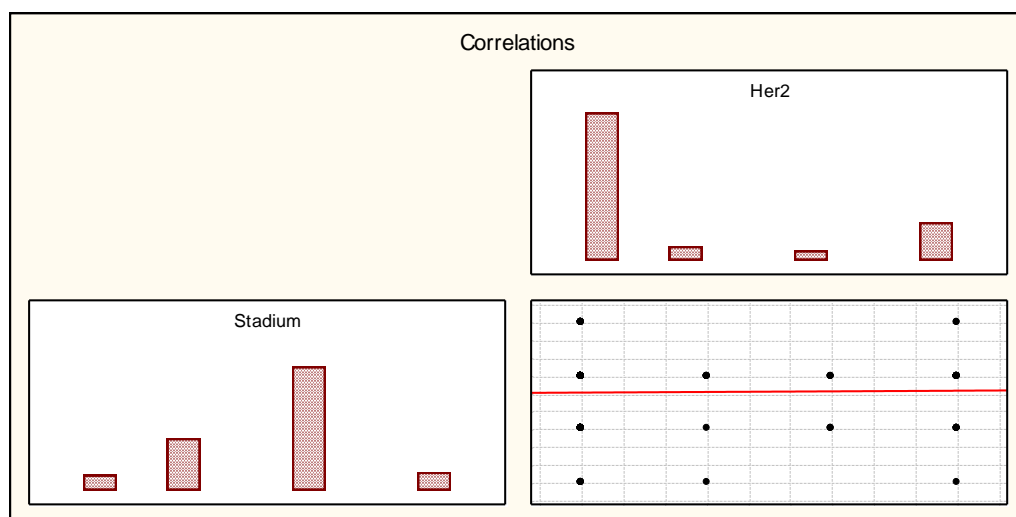


Слика 31. Графички приказ на степенот на експресија на HER2 протеинот според стадиумот на болеста

Помеѓу експресијата на HER2 протеинот и стадиумот во кој беше дијагностицирана болеста не беше регистрирана корелација, односно поврзаност ($R=0,0067$; $p=0,9$) (табела 28а, слика 31а)

Табела 28а. Сооднос помеѓу стадиумот на ГК и HER2 експресијата

Варијабла	Spearman R	t-test	p-level
Стадиум & HER2	0,0067	t=0,081	p=0,93



Слика 31а. Графички приказ на соодносот помеѓу стадиумот на ГК и HER2 експресијата

5.3. Асоцираност на EBV со демографските и клиничко-патолошките карактеристики на гастричниот карцином

5.3.1. Демографски карактеристики на пациентите асоцирани со EBV

Во оваа студија за EBV инфекција беа анализирани 80 пациенти со карцином на желудникот.

Во табелата 29 се прикажани клиничко-патолошките карактеристики на оваа група пациенти и нивните тумори.

Табела 29. Клиничко-патолошки карактеристики на пациентите

Параметар	EBV експресија			
	N	EBV -	EBV+	p-value
Пол				
Маж	25	21(84%)	4 (16)	0,27 ns p (Chi-square test)
Жена	55	40 (72,73)	15 (27,27)	
Интрагастрична локализација				
Cardia	31	23 (74,19)	8 (25,81)	0,55 ns p (Fisher exact test)
Corpus	20	14 (70)	6 (30)	
Pylorus	29	24 (82,76)	5 (17,24)	
Т				
T1	4	4 (100%)	0	0,25 ns p (Fisher exact test)
T2	13	11 (84,62)	2 (15,38)	
T3	14	8 (57,14)	6 (42,86)	
T4	49	38 (77,55)	11 (22,45)	
Метастази во лимфните јазли				
Не	16	12 (75%)	4 (25%)	1.0ns p (Fisher exact test)
Да	64	49(76,56%)	15 (23,44%)	
Далечни метастази				
No	72	53 (73,61)	19 (26,39)	<0,0001 sig P (Fisher exact test)
Yes	8	0	8 (100)	
Стадиум				
I	7	7 (100%)	0	0,076 ns P (Fisher exact test)
II	17	11 (64,71)	6 (35,29)	
III	47	34 (72,34)	13 (27,66)	
IV	9	9 (100)	0	
Градус				
G1	1	0	1 (100%)	0,12 ns P (Fisher exact test)
G2	36	30 (83,33)	6 (16,67)	
G3	43	31 (72,09)	12 (27,91)	

Етникум				
Македонци	62	52 (83,87)	10 (16,13)	0,009 sig P (Fisher exact test)
Албанци	18	9 (50)	9 (50)	

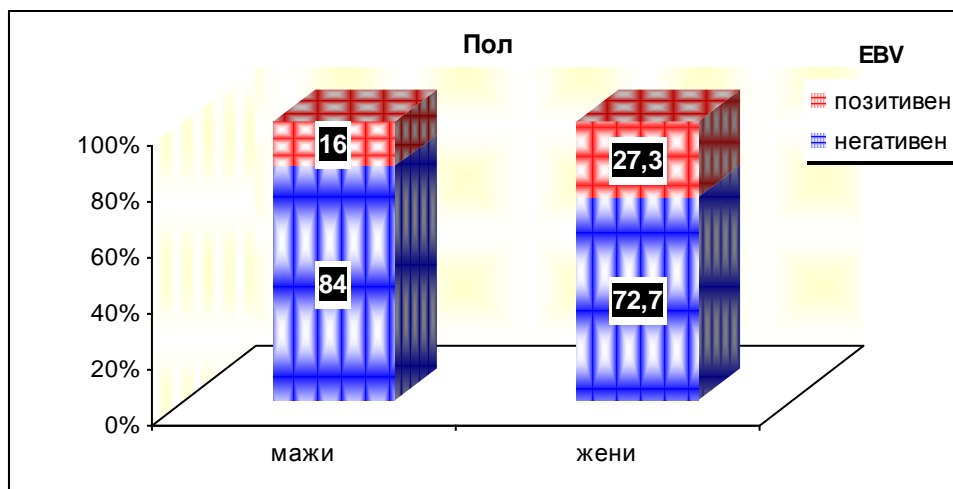
Во табелата 28а прикажана е дистрибуцијата на пациентите со позитивна и негативна експресија на EBV во зависност од нивниот пол.

Кај пациентите со карцином на желудник, инфекција со Епштајн– Бар вирусот несигнификантно почесто беше регистрирана кај женските во однос на машките пациенти - 15 (27,27%) наспроти 4 (16%) ($p=0,27$) (слика 30).

Табела 30. Дистрибуција на EBV експресијата кај пациентите со ГК според пол (n=80)

Пол	N	EBV		p-value
		негативен	позитивен	
мажи	25	21 (84)	4 (16)	0,27 ns
жени	55	40 (72,73)	15 (27,27)	

p (Chi-square test)



Слика 32. Графички приказ на дистрибуцијата на EBV експресијата кај пациентите со ГК според пол (n=80)

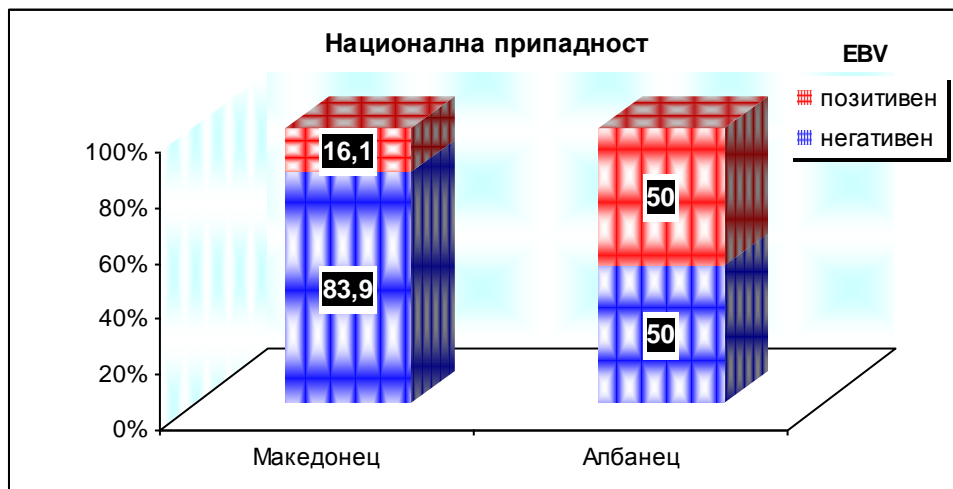
Резултатите од ова истражување покажаа сигнификантна асоцираност на националноста на пациентите со карцином на желудник со EBV инфекцијата. Кај пациентите од албанска националност сигнификантно почесто беше регистрирана инфекција со Епштајн-Бар вирусот споредено со пациентите од македонска националност ($p=0,009$). Во групата пациенти од албанска националност кај 9

(50%) беше детектирана имуноекспресија на EBV, наспроти 10 (16,13%) пациенти од групата со македонска националност (табела 31, слика 33).

Табела 31. Дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според националност

Национална припадност	N	EBV		p-value
		негативен	позитивен	
Македонец	62	52 (83,87)	10 (16,13)	0,009 sig
Албанец	18	9 (50)	9 (50)	

0,009 sig



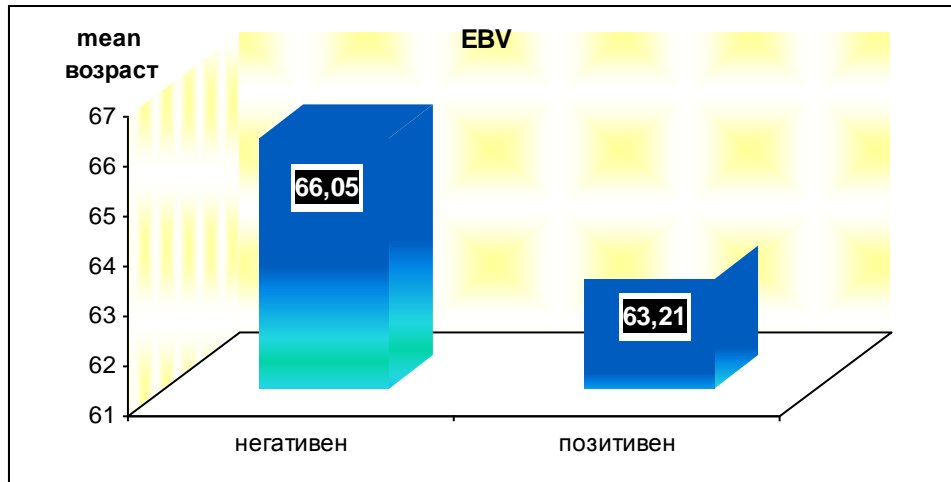
Слика 33. Графички приказ на дистрибуцијата на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според националност

Пациентите со негативна EBV експресија беа на просечна возраст од $66,05 \pm 10,6$ години, а пациентите со позитивна EBV експресија беа помлади и на просечна возраст од $63,2 \pm 9,5$ години. Разликата во возраста на пациентите со и без EBV инфекција статистички беше несигнификантна, односно незначајна ($p=0,3$) (табела 32, слика 34).

Табела 32. Дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според возраст

EBV	Дескриптивна статистика - возраст			p-value
	N	mean \pm SD	min-max	
негативен	61	$66,05 \pm 10,6$	40 – 86	0,3 ns
позитивен	19	$63,21 \pm 9,5$	49 – 78	

p (Student t-test)



Слика 34. Графички приказ на дистрибуцијата на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според возраст

5.3.2. Локализација

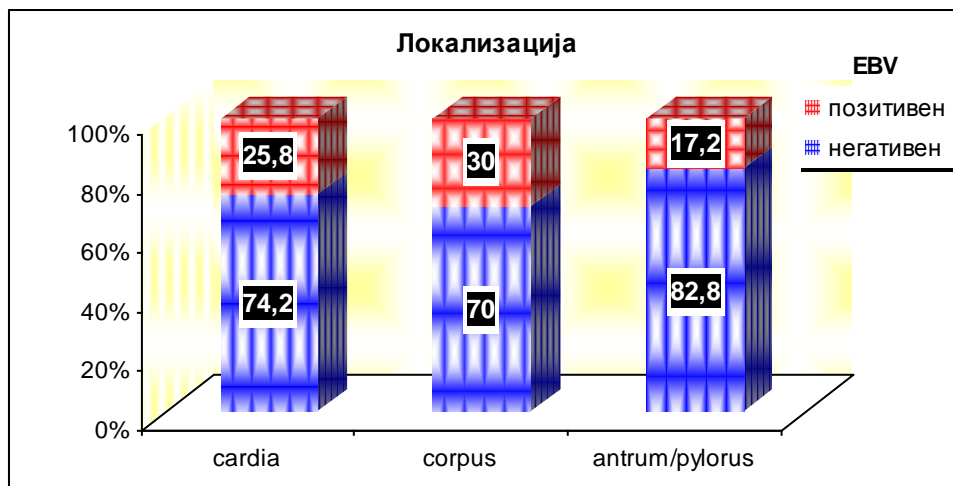
Пациентите со карцином на телото на желудникот имаа најчест наод на EBV – 6 (30%), по кои следеа пациентите со локализација на карциномот на cardia – 8 (25,81%) и на antrum/pylorus – 5 (17,24%).

Почестата експресија на EBV при локализација на карцином на желудник на corpus во однос на останатите локализации не беше потврдена и статистички како сигнификантна, односно значајна ($p=0,55$) (табела 33, слика 35)

Табела 33. Дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според интрагастричната локализација на туморот

Локализација	EBV			p-value
	N	негативен	позитивен	
cardia	31	23 (74,19)	8 (25,81)	0,55 ns
corpus	20	14 (70)	6 (30)	
antrum/pylorus	29	24 (82,76)	5 (17,24)	

p (Fisher exact test)



Слика 35. Графички приказ на дистрибуцијата на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според интрагастричната локализација на туморот

5.3.3. T статус

Во табелата 34 е прикажана дистрибуцијата на пациентите со негативна и позитивна експресија на EBV, а во зависност од T статусот на туморот.

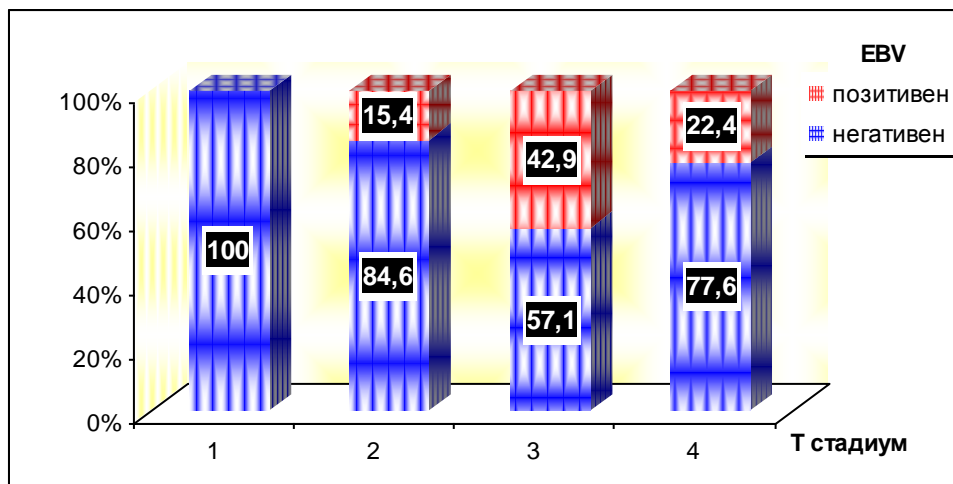
Сите 4 пациенти со карцином на желудник во T1 статус беа негативни за EBV, додека EBV експресија беше регистрирана кај 2 (15,38%) пациенти со карцином во T2 статус, 6 (42,86%) пациенти со карцином во T3 статус, и кај 11 (22,45%) пациенти со карцином на желудник дијагностициран во T4 статус.

Не беше докажана статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата на пациенти со и без инфекција со Епштајн-Бар вирусот, а во зависност од T статусот на туморот ($p=0,25$) (табела 34, слика 36).

Табела 34. Дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според T статусот на неоплазмата

T статус	N	EBV		p-value
		негативен	позитивен	
1	4	4 (100)	0	0,25 ns
2	13	11 (84,62)	2 (15,38)	
3	14	8 (57,14)	6 (42,86)	
4	49	38 (77,55)	11 (22,45)	

p (Fisher exact test)



Слика 36. Графички приказ на дистрибуцијата на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според T статусот на неоплазмата

5.3.4. N статус

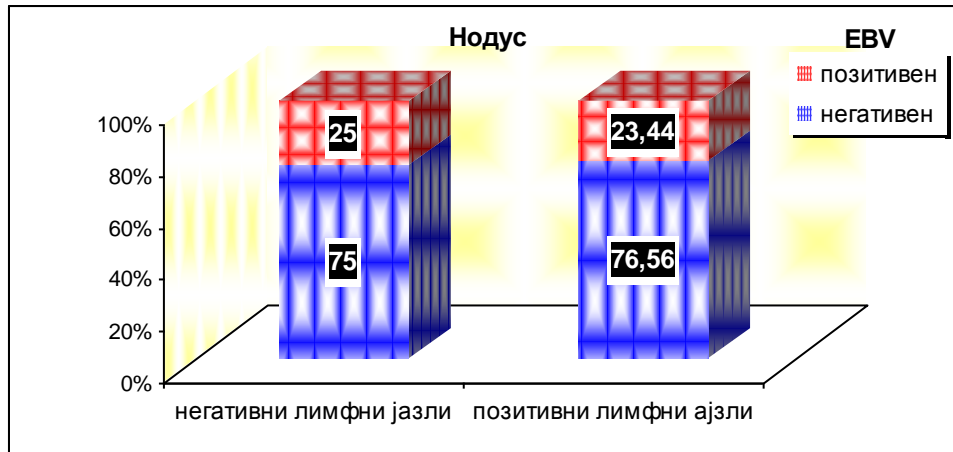
Во анализираната група од 80 пациенти со ГК, за EBV инфекција позитивни лимфни јазли имаа 64 пациенти.

Наодот на позитивни регионални лимфни јазли не беше сигнификантно асоциран со EBV експресија ($p=1,0$). EBV експресија беше регистрирана кај 25% од пациентите со негативни регионални лимфни јазли и кај 23,44% од пациентите со позитивни регионални лимфни јазли (табела 35, слика 37).

Табела 35. Дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според присуството на метастази во лимфните јазли

Нодус	EBV		p-value	
	N	негативен		позитивен
негативни лимфни јазли	16	12 (75)	4 (25)	1,0 ns
позитивни лимфни јазли	64	49 (76,56)	15 (23,44)	

p (Fisher exact test)



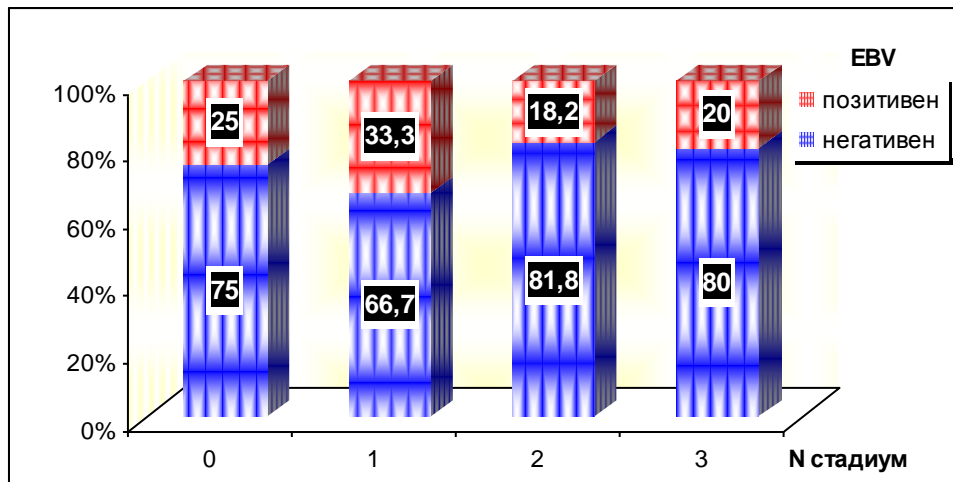
Слика 37. Графички приказ на дистрибуцијата на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според присуството на метастази во лимфните јазли

Резултатите од истражувањето за разликата во позитивитетот на EBV помеѓу пациентите со карцином на желудник со различен N статус покажаа најчеста EBV експресија во групата пациенти со N1 статус – 6 (33,33%), по што следеше групата со N0 статус – 4 (25%), N3 статус – 7 (20%), и N2 статус – 2 (18,18%) (табела 36, слика 38).

Табела 36. Дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според N статусот

N статус	EBV		p-value	
	N	негативен		позитивен
0	16	12 (75)	4 (25)	0,74 ns
1	18	12 (66,67)	6 (33,33)	
2	11	9 (81,82)	2 (18,18)	
3	35	28 (80)	7 (20)	

p (Fisher exact test)



Слика 38. Графички приказ на дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според N статусот

5.3.5. M статус

Во групата од 80 пациенти анализирани за EBV асоцираност, 8 пациенти имаа далечни метастази.

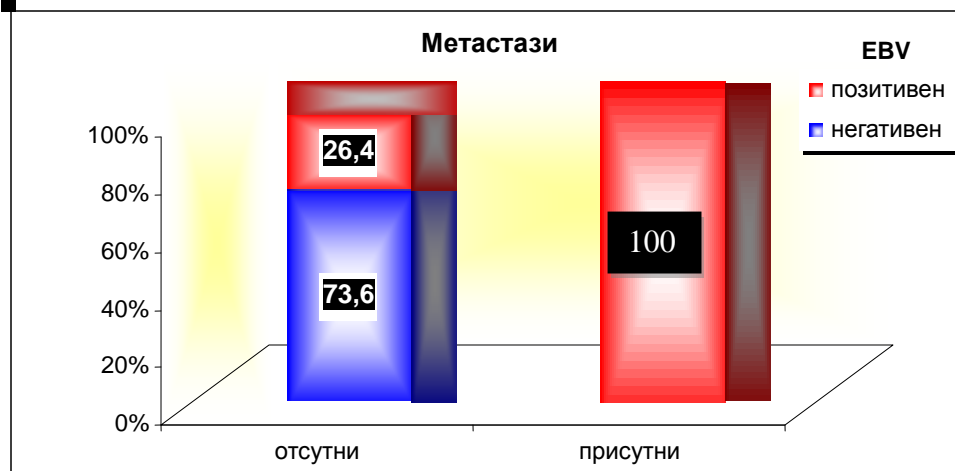
Сите 8 пациенти со далечни метастази од оваа група пациенти беа позитивни за EBV, додека во групата пациенти без метастатски промени, кај 19 (26,39%) беше потврдено присуство на EBV.

Опишаната разлика во позитивна и негативна EBV експресија помеѓу пациентите без и со далечни метастази и статистички се потврди како сигнификантна за $p < 0,0001$. Кај пациентите со гастричен карцином, присуството на инфекција со EBV сигнификантно беше асоцирана со присуство на далечни метастази (табела 37, слика 39).

Табела 37. Дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според присуството/отсуството на далечни метастази

Метастази	N	EBV		p-value
		негативен	позитивен	
отсутни	72	53 (73,61)	19 (26,39)	$<0,0001$ sig
присутни	8	0	8 (100)	

p (Fisher exact test)



Слика 39. Графички приказ на дистрибуцијата на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според присуството/отсуството на далечни метастази

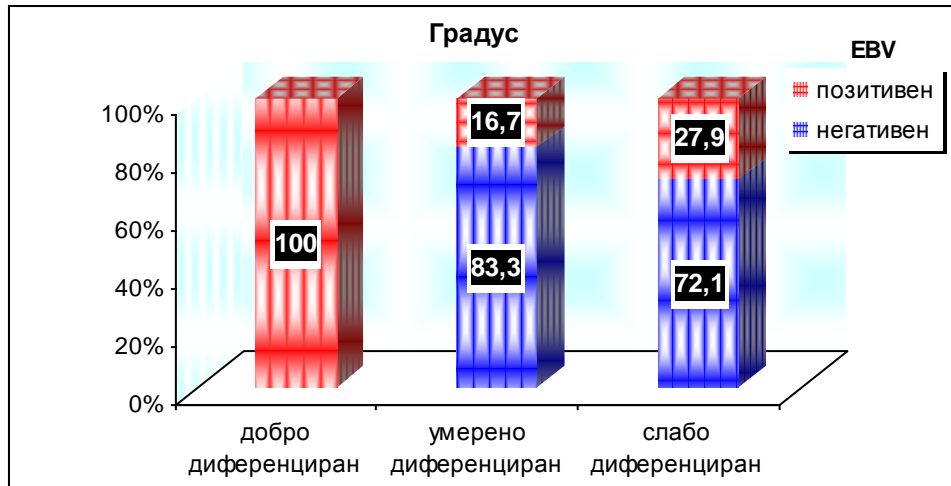
5.3.6 G - степен на диференцираност

Анализата за експресијата на EBV во зависност од диференцираноста на туморот покажа дека наод на EBV почесто имаа пациентите со лошо диференциран гастричен карцином во споредба со умерено диференцираните гастрични карциноми, ако се из земе пациентот кој беше со добро диференциран тумор и EBV позитивен (27,91% наспроти 16,67%). Во оваа серија пациенти со карцином на желудник не се докажа сигнификантна разлика помеѓу пациентите со позитивна и негативна EBV експресија, а во зависност од диференцираноста на туморот ($p=0,12$) (табела 38, слика 40).

Табела 38. Дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според степенот на диференцираност на туморот

Градус	EBV		p-value
	N	негативен позитивен	
добро диференциран	1	0 1 (100)	0,12 ns
умерено диференциран	36	30 (83,33) 6 (16,67)	
слабо диференциран	43	31 (72,09) 12 (27,91)	

p(Fisher exact test)



Слика 40. Графички приказ на дистрибуцијата на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според степенот на диференцираност на туморот

5.3.7. Стадиум

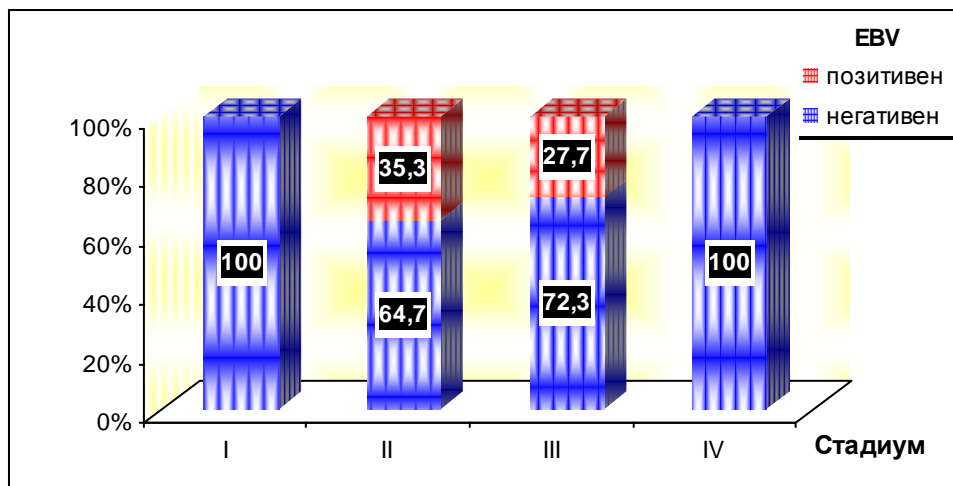
Сите 7 пациенти со карцином на желудник во I стадиум, и сите 9 пациенти со карцином на желудник во четврти стадиум беа негативни за EBV. Инфекција со Епштајн-Бар вирус беше потврдена кај 6 (35,29%) пациенти со втор стадиум на гастричен карцином, и кај 13 (27,66%) пациенти со трет стадиум на гастричен карцином.

Не беше потврдена статистички сигнификантна разлика помеѓу EBV позитивните и EBV негативните гастрични карциноми во однос на стадиумот во кој беа дијагностицирани ($p=0,076$) (табела 39, слика 41).

Табела 39. Дистрибуција на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според стадиумот на болеста

Стадиум	N	EBV		p-value
		негативен	позитивен	
I	7	7 (100)	0	0,076 ns
II	17	11 (64,71)	6 (35,29)	
III	47	34 (72,34)	13 (27,66)	
IV	9	9 (100)	0	

p (Fisher exact test)



Слика 41. Графички приказ на дистрибуцијата на EBV инфекцијата кај пациентите со ГК според стадиумот на болеста

5.4. Корелација помеѓу HER2 и EBV експресијата кај гастричниот карцином

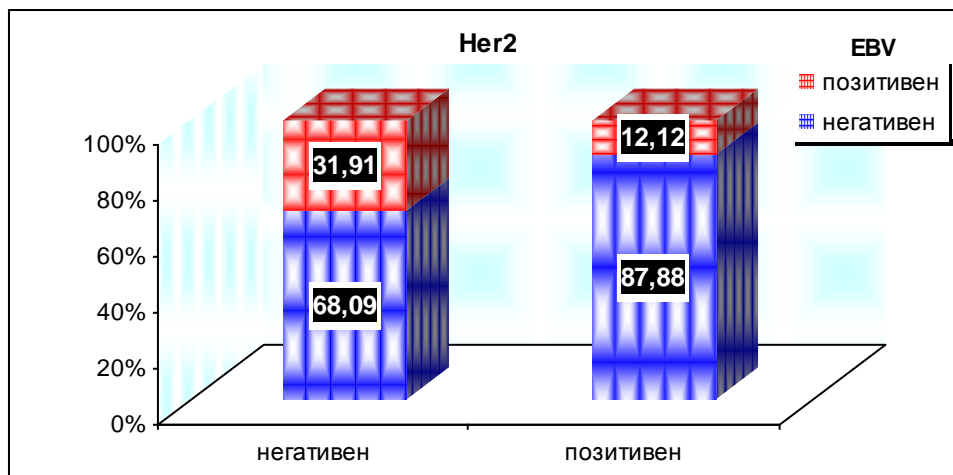
Во ова истражување се потврди сигнификантна асоцираност помеѓу HER2 и EBV експресијата ($p=0,041$). Значајно почеста експресија на HER2 беше детектирана кај EBV негативните гастрични карциноми.

Во дистрибуцијата прикажана во табелата 40, во групата од 47 пациенти со HER2 негативен гастричен карцином, кај 15 (31,91%) беше потврдена EBV инфекција, додека во групата од 33 пациенти со HER2 позитивен гастричен карцином, инфекција со EBV беше потврдена кај 4 (12,12%) пациенти (табела 40, слика 42).

Табела 40. Сооднос на експресијата на HER2 протеинот и EBV инфекцијата

HER2	EBV		p-value	
	N	негативен		позитивен
негативен	47	32 (68,09)	15 (31,91)	0,041sig
позитивен	33	29 (87,88)	4 (12,12)	

p (McNemar test)



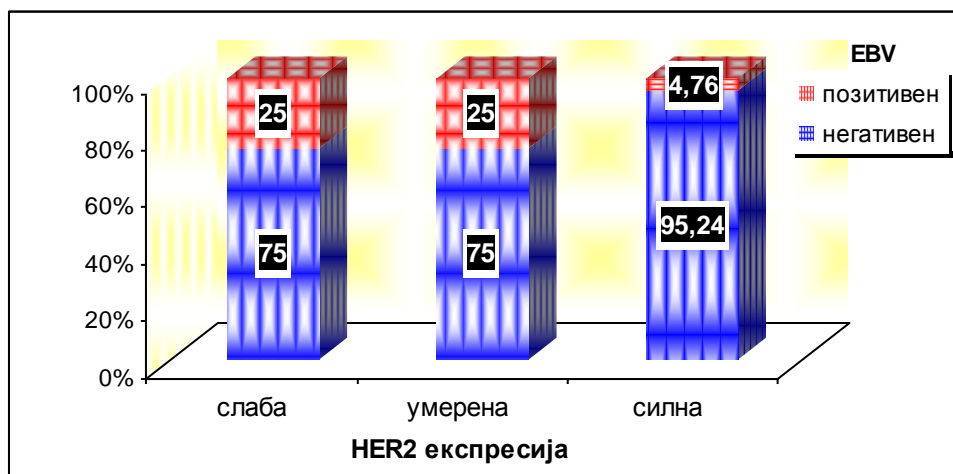
Слика 42. Графички приказ на соодносот на експресијата на HER2 протеинот и EBV инфекцијата

Во групата од 33 HER2 позитивни гастрични карциноми не беше најдена сигнификантна разлика помеѓу EBV негативните и EBV позитивните карциноми, а во однос на степенот на HER2 експресија ($p=0,16$). Инфекција со Епштајн-Бар вирус беше потврдена кај 2 пациенти со слаба HER2 експресија, еден пациент со умерена, и еден пациент со силна HER2 експресија (табела 41, слика 43).

Табела 41. Сооднос помеѓу степенот на HER2 експресија и EBV инфекцијата

HER2 експресија	N	EBV		p-value
		негативен	позитивен	
+	8	6 (75)	2 (25)	0,16 ns
++	4	3 (75)	1 (25)	
+++	21	20 (95,24)	1 (4,76)	

p (Fisher exact test)

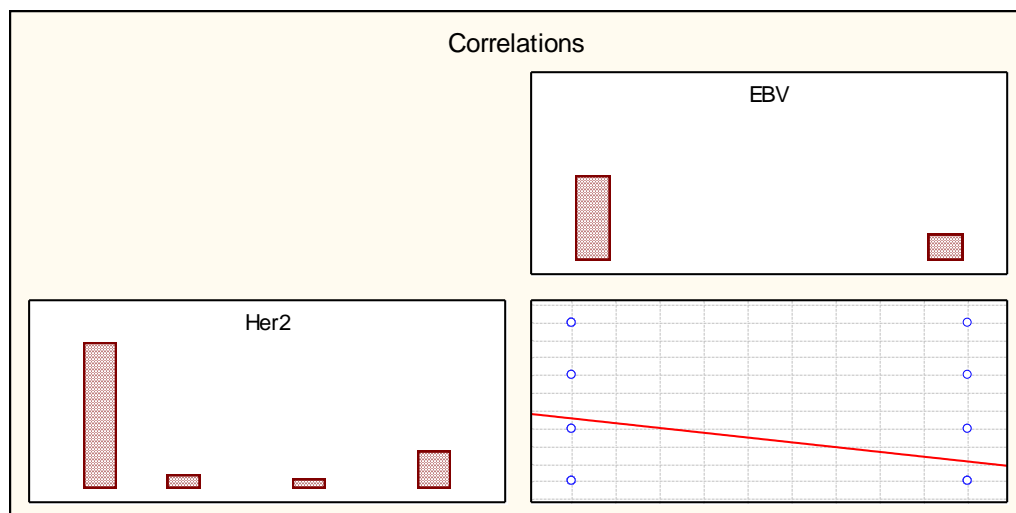


Слика 43. Графички приказ на соодносот помеѓу степенот на HER2 експресија и EBV инфекцијата

Корелацијата, односно поврзаноста во степенот на HER2 експресија помеѓу EBV негативните и позитивни гастрични карциноми ја анализиравме и со Spearman-овиот коефициент на корелација. Добиената вредност за овој коефициент од $R = -0,258$ укажува на негативна, односно индиректна поврзаност на HER2 и EBV експресијата, односно нивна обратнопропорционална зависност. За ниво на $p=0,02$, оваа корелација се потврди и статистички како сигнификантна, односно јачината на HER2 експресија кај гастричните карциноми значајно беше поврзана со EBV експресијата (табела 42, слика 44).

Табела 42. Сооднос помеѓу степенот на HER2 експресијата и EBV инфекцијата

Варијабла	Spearman R	t-test	p-level
HER2 & EBV	-0,258	t=2,36	p=0,021 sig



Слика 44. Графички приказ на соодност помеѓу степенот на HER2 експресијата и EBV

6.0. ДИСКУСИЈА

Разоткривањето и разбирањето на молекуларните основи на неоплазмите отвори нова ера за рана детекција и ран современ третман на ракот на желудникот, со можност за поголем процент на преживување.

Од патолошка гледна точка, ГК претставува комплексно, мултифакторско заболување кое во својата заднина вклучува разни генетски и епигенетски промени [3,5,7,8,18,33,35,38]. Како главен метод со кој се прогнозира исходот од болеста кај пациентите со ГК е клиничко-патолошката стратификација која ја користи ТНМ класификацијата, а степенот на диференцијација на туморот е дел од оваа класификација. Во пракса, појавата на мноштво разлики во исходот (при иста класификација и стратификација сосема различен исход), им наметна на клиничарите потреба од пронаоѓање нови порелевантни начини со кои ќе може попрецизно да се идентификуваат биолошките подгрупи при ГК.

Yasui W. [43] со соработниците во 2011 година посочиле дека ГК главно се должи на многу промени во гастричните епителијални клетки, а процесот на карциногенеза останува комплексен и тешко разбирлив и се должи и на дополнителни фактори како што се: микрооколината, инфламацијата, оксидативниот стрес и хипооксијата [66].

Неопходно е подлабоко разбирање на патогенезата како и на биолошките случувања при ГК за понатамошен развој на рани методи за детекција и третман. Откривањето на нови биомаркери и нивната апликација во пракса, здружени со традиционалните методи за дијагноза, стратификација и прогноза, помагаат да се подобри раното откривање на ГК, раната грижа за болните и спроведување на соодветна терапија.

Постојат 4 типа биомаркери: дијагностички, предиктивни, прогностички и терапевтски. Предиктивните биомаркери се дефинирани како маркери кои може да бидат употребени за да ги покажат суппопулациите на пациентите кои најверојатно би одговориле на една таргетирана терапија [81].

Новите молекуларни таргет терапии интерферираат во различни сигнални каскади вклучени во клеточната пролиферација, кои директно влијаат врз преживувањето и диференцијацијата на туморите.

HER2 е еден од биомаркерите при ГК. Тој покажува имуноекспресија од нормални и канцерски клетки, чијашто генска амплификација резултира со протеинска преголема експресија, пролиферација на субсеквентните клетки, раст и клеточно преживување.

Податоците за HER2 како прогностички фактор кај карциномот на желудникот не се конзистентни и објавените резултати во литературата се различни поради што проценката на вредноста на HER2 кај гастричниот карцином во корелација со други клиничко-патолошки прогностички фактори сè уште е актуелна [53,78,75].

Актуелните истражувања во светот се насочени и кон пронаоѓање асоцираност помеѓу гастричниот карцином со Епштајн-Бар вирусот (EBV), кој се смета дека има улога во карциногенезата на оваа неоплазма. Уште повеќе, во 2014 година, во спсанието „Nature“ Конзорциумот на „Cancer Genome Atlas“ објавува четири соматски разбирливи категории на ГК и предлага EBV позитивните случаи да се во една од тие групи. Тие ги предлагаат групите на ГК: 1. EBV-позитивни случаи; 2. микросателитска нестабилност (МСИ) - позитивни случаи; 3. геномски стабилни ГК (близу-диплоиден тип); 4. со хромозомска нестабилност (ЦИН-тип) [70].

Оттука, ова истражување, кое имаше за цел да утврди дали во нашиот клинички материјал кај пациентите со гастричен карцином (ГК) постои и кој е степенот на имуноекспресија на HER2 протеинот и постоењето на здруженост помеѓу гастричниот карцином со EBV инфекцијата, дава придонес во развојот на нови превентивни и терапевтски стратегии за продолжување на животот на пациентите со гастричен карцином.

6.1. Демографски особености на карциномите на желудникот и асоцираноста со HER2 и EBV експресија

Демографските особености на пациентите со ГК како и факторите на ризик се испитувани од разни автори во Европа и Азија [65]. Повеќето автори сметаат дека факторите од околината како што се карциногените во индустриските региони, се директни предизвикувачи на ГК. Овие автори сметаат дека тоа е причина зошто кај машките лица кои биле почесто експонирани на карциногените фактори од околината почесто се јавува ГК.. Во една студија од Kokkola (1996), *инфекцијата со H. pylori се смета за ризик-фактор за ГК кај младите машки лица, што подоцна е оспорено и е докажано дека факторот околина како причинител е еднакво присутен и кај старите и кај жените [15].*

6.1.1. Пол

Во истражувањето направено за изработка на оваа докторска дисертација беа вклучени 149 пациенти, кај кои беше спроведена оперативна интервенција заради карцином на желудникот и преовладуваа пациентите од женски пол (108 наспроти 41), или за 45% повеќето од пациентите беа жени. Овој податок не се совпаѓа со податоците во литературата каде се апострофира за еднаква застапеност на карциномот на желудникот кај мажите и жените, а според некои автори карциномот на телото на желудникот е во сооднос машки спрема женски од приближно 2 : 1 [1, 2].

Една од главните цели на овој докторат беше да се одреди **експресијата на HER2** протеинот кај сите испитаници со ГК (n=149). HER2-хуманиот епидермален рецептор на факторот на раст (human epidermal growth factor receptor 2), е протоонкоген кој го енкодира трансмембранскиот протеин со тирозин киназна активност, и е вклучен во сигнални трансдуктивни патишта одговорни за клеточен раст и диференцијација [43]. Иако имунохистохемскиот (ИHC) метод за одредување на прекумерната експресија на HER2 протеинот е опишан уште во 1986-88 година [43], првите објавувања за позитивна експресија кај туморите се објавени во 1990-та со стапка на позитивност од 3-38% [84]. Gravalos C. во 2007

година реферира за прекумерна експресија на HER2 протеинот кај 23% од болните од болните со ГК [55]. Во 2008 година, истиот автор прави анализа, во која ги споредува наодите на повеќе автори и се забележува варијации во наодите во Европа и Азија од 13-91% [87-89]. Сепак, повеќето автори се согласуваат дека честотата на прекумерна експресија на HER2 кај желудочните и гастроэзофагеалните карциноми се движи од 4,4% до 53,4%, со средна вредност од 17,9% [85-92].

Во оваа докторска дисертација, во направената серија на испитувања за воспоставување присуство на прекумерна **експресија на HER2** протеинот, се покажа позитивна експресија кај 44 (29%) испитаници, што не отстапува од податоците кај другите автори [92]. Во однос на споредливоста по полот на пациентите кои покажуваат позитивна и негативна експресија на HER2, не се покажа значајна разлика ($p=0,24$), иако процентот на мажи со позитивна експресија на HER2 беше поголем од оној кај жените (36,59% наспроти 26,85%).

Во нашето истражување, со испитувањето на **степенот на експресија на HER2** (слаба, умерена, силна) кај ГК се покажа почеста силна HER2 експресија кај машките пациенти (73,33%) отколку кај женските (55,17%), но без статистичка значајност ($p=0,4$), податок којшто е во согласност со податоците од литературата [81-91].

Од друга страна, во направената анализа за зачестеност на ГК според пол при присутна здружена инфекција со **EBV** и **ГК**, се покажа дека кај 19 (23,7%) пациенти со позитивен наод постои незначително поголема честота кај жените ($p=0,27$). Овој наод не е во согласност со соопштението од страна на Murphy G. од 2009 година, во кое тој вели дека **EBV**-позитивните тумори кај мажите се среќаваат два пати почесто отколку кај жените. Студијата е направена на 15.952 случаи и реферирани се 70 публикации [18].

6.1.2. Етничка припадност

Во однос на поврзаноста на етничката припадност со HER2 експресијата и EBV експресијата, во ова истражување се констатираше дека повеќето испитаници беа Македонци (76,51%) наспроти Албанци (23,49%) и не се најде сигнификантна

асоцираност на прекумерната експресија на HER2 протеинот според националноста ($p=0,32$). Меѓутоа, наодите од ова истражување покажаа статистички значајна разлика при здруженост на карциномот на желудник со EBV-позитивна експресија кај пациентите од албанска националност ($p=0,009$).

Во литературата во една мета-анализа на 48 студии за EBV здружен гастричен карцином (EBVaGC) е утврдено дека постои сигнификантна здруженост со националноста и дека EBVaGC е почест кај: мажи и млади лица, белци и Латиноамериканци, во кардија и кај дифузниот хистолошки тип [26].

6.1.3. Возраст

Возраста како фактор кој влијае врз патогенезата на ГК честопати била предмет на истражување. Во однос на возраста, испитаниците во оваа студија беа на возраст од 40 до 86 години, што претставува вообичаена возраст за оваа патологија ($65,19 \pm 10,1$). Во направената анализа за поврзаноста на возраста со HER2 експресијата, се покажа дека не постои статистички значајна разлика помеѓу бројот на пациентите со позитивен и негативен HER2 наод ($p=0,55$). Исто така, се докажа дека разликите во степенот на експресија на HER2 (слаба, умерена и силна) и возраста статистички значајно не се разликуваат ($p=0,73$). Во направената корелација за поврзаноста помеѓу возраста на пациентите со карциномот на желудник, и степенот на експресија на HER2 протеинот се покажа $R= -0,036$, т.е. индиректна корелација: постарите пациенти со карцином на желудник имаа послаба експресија на HER2 протеинот, но без статистичка значајност ($p=0,66$). Може да се заклучи дека не постои асоцијација помеѓу HER2 експресијата и возраста кај пациентите со ГК.

Исто така, во испитувањето за поврзаноста на EBV експресијата со возраста не се установи статистички сигнификантна разлика во возраста кај пациентите со и без инфекција со EBV ($p=0,3$). Овие наоди се во согласност со наодите во литературата [27].

6.2. Клинички и патохистолошки особености на ГК

6.2.1. Локализација

Со цел да се изнајде најсоодветниот начин на третман на туморот, а хистолошки да се одредат суптиповите кои се базираат врз мајорните морфолошки компоненти, се наидува на низа тешкотии во однос на класификацијата која се однесува на анатомската локализација на ГК, особено доколку ГК е лоциран во горниот дел од желудникот. Во оваа студија беше користена TNM класификацијата предложена од American Joint Committee on Cancer (AJCC), која се базира на локацијата на туморскиот епицентар и на присуството и отсуството на зафатеност на гастроезофагеалната јункција [64].

Според добиените резултати од ова истражување, најчеста локализација на карциномот на желудник кај испитаниците беше на кардијата, кај 61 (40,94%) пациент, што беше за 6,6% почесто од локализираниот ГК на antrum/pylorus, и за 16,11% од локализациите на ГК на corpus-от.

Консултирајќи ја литературата може да се забележи дека во минатиот век па сè до последната четвртина од овој век, кај повеќето случаи карциномите биле лоцирани во дисталниот дел на желудникот, биле од интестинален тип и добро диференцирани. Во последната четвртина од минатиот век се забележува пораст на слабо диференцирани, дифузно инфилтрирани карциноми на гастроезофагеалната јункција (ГЕЈ) и кардијата. Причината за овој пораст на малигнитет во проксималните партии останува нецелосно разјаснета [92-95]. Во едно истражување објавено во Archives of Oncology во 2004 година од страна на Пешиќ М. и соработниците, кај 13,33% од случаите ГК бил лоциран во проксималниот желудник [96], што претставува помал процент од оној добиен во нашата студија. Последните извештаи во литературата зборуваат дека инциденцијата на карциномот на желудник во проксималните регии се движи помеѓу 25% и 40% [1, 97-99].

Според „Глобалната статистика за канцер“ [1], ракот на желудникот и езофагусот се меѓу водечките причини за морталитет. Експресијата на HER2 игра важна улога во проценката на агресивноста и прогресивноста на ГК [101-111]. Според една мета-анализа за ГК, се сугерира дека HER2 експресијата е лош

прогностички фактор и е поврзан со лош исход [105]. Hofmann уште во 2008 година дал ново рedefинирање на HER2 експресијата на слаба, средна и јака со што сигнификантно се сменети толкувањата на мета-анализите до тогаш [75]. По оваа нова поделба на експресијата се увиде дека HER2 позитивните тумори се почести кај подобро диференцираните (intestinal-type) тумори, со инвазија во лимфните јазли и се почести кај мажите [105,106,112].

Kang Y. во 2008 година, на еден симпозиум за ГК во склоп на ToGA студијата ги објавил своите резултати од истражувањето спроведено кај 2.168 болни со ГК. Тој забележал прекумерна експресија на HER2 кај 22% од испитаниците и дополнително установил многу повисок степен на позитивност кај карциномите на кардија/ГЕС во споредба со карциномите на corpus (34% наспроти 20%) [57].

Во ова истражување направено за изработка на оваа докторска дисертација, локализацијата на карциномот на желудникот не беше статистички значајно поврзана со позитивната експресија на HER2 протеинот ($p=0,71$), но во проширеното испитување направено за степенот на експресија на HER2, се покажа статистички високосигнификантна ($p=0,005$) поврзаност на локализацијата со силна HER2 експресија или шема HER+++ кај ГК. Силна експресија на HER2 протеинот, односно шема HER+++ беше сигнификантно почеста кај ГК локализиран на antrum/pylorus во споредба со другите интрагастрични локализации, што отстапува од наодите во гореспомнатата литература.

6.3. Асоцираност на HER2 имуноекспресија кај ГК според ТНМ класификацијата

Во анализата на испитуваниот материјал се покажа дека 56,38% од испитаниците имаа карцином на желудник со стадиум T4. Овој наод е во согласност со наодите на повеќе автори.

Позитивни регионални лимфни јазли беа детектирани кај 113 (75,84%) пациенти, а со N3 стадиум беа 56 (37,58%) пациенти.

Далечни метастази имаа 13 (8,72%) пациенти.

Според диференцираноста на туморот, мнозинството испитаници имаа слабо диференциран карцином на желудникот - 81 (54,36%).

Според стадиумот, карциномите беа најчесто дијагностицирани во стадиум III - 88 (59,06%).

Главен куративен третман за ГК е хируршка ресекција кај пациентите во ран стадиум на болеста, но повеќето тумори се дијагностицираат во понапредната фаза кога се нересекцибилни [113,114]. Главните прогностички фактори кои го детерминираат преживувањето се: возраста, стадиумот на болеста, локализацијата, хистолошкиот тип и градус на туморот. Aditi R. и соработниците во 2016 година ја анализирале поврзаноста на прекумерната експресија на HER2 протеинот и клиничко-патолошките карактеристики на туморот и утврдиле сигнификантно поизразена HER2 експресија кај интестиналниот тип на ГК, и во малите биопсии во споредба со оперативниот материјал, но не нашле корелација на HER2 експресијата и возраста, полот, големината на туморот и стадиумот на болеста [115].

6.3.1 Т статус

Оваа студија не потврди статистички сигнификантна разлика во HER2 позитивната експресија кај ГК со различен локален раст (Т статус) ($p=0,54$), како и на степенот на HER2 експресијата ($p=0,63$) со Т статусот.

Испитуваната корелација помеѓу Т стадиумот на карциномот на желудник и степенот на експресија на HER2 протеинот е негативна и статистички незначајна ($p=0,33$), што е во согласност со горенаведената студија на Aditi R. и соработниците [115]. За разлика од нив, Gupta P. и соработниците нашле релација помеѓу HER2 експресијата и Т статусот, при што HER2 експресијата била поизразена кај пациентите со Т3 и Т4 статус на локален раст [116].

6.3.2. N статус

Статистички незначајна ($p=0,49$) беше разликата во позитивното имунобоење со HER2 антителото кај пациентите со негативни и позитивни регионални лимфни јазли, додека степенот на HER2 експресија сигнификантно се

разликуваше ($p=0,03$) кај пациентите со метастази во регионалните лимфни јазли во однос на пациентите без метастази во регионалните лимфни јазли. Силна експресија на HER2 протеинот беше значајно почесто регистрирана кај пациентите со позитивни регионални лимфни јазли (68,57% наспроти 33,33%).

Испитувањата направени за позитивност на HER2 протеинот во зависност од N статусот (1,2,3), покажаа највисока застапеност кај болните во N3 статус - 23 (41,07%) пациенти, без сигнификантна разлика во дистрибуцијата ($p=0,089$). Исто така, и степенот на HER2 експресијата во зависност од N статусот на туморот не покажа значајност ($p=0,12$). Корелацијата помеѓу степенот на HER2 експресија и N статусот на ГК покажа дека посилен HER2 експресија е поврзана со повисок N статус, и обратно ($R=0,142$), но несигнификантно, со вредност на $p=0,08$.

Овој наод се совпаѓа со наодите во студиите на Rajagopal I. со соработниците од 2015 година, како на Wang HB. со соработниците од 2017 година [117, 118] и со студијата на Gupta P. и соработниците [116].

6.3.3 M - далечни метастази

Резултатите од ова истражување направено за изработка на оваа докторска дисертација не покажаа значајна разлика во дистрибуцијата на пациентите со и без HER2 позитивна експресија, а во зависност од присутни далечни метастази ($p=0,65$).

Lei YY. и соработниците реферираат [119] дека нашле релација на HER2 прекумерната експресија со полоша прогноза, нодални метастази, различен градус, Лауреновата класификација и далечните метастази, што не беше случај и во нашата студија. За разлика од нив, Grabsch H. и соработниците не нашле сигнификантна поврзаност со HER2 експресијата и параметрите од TNM стадиумот, односно далечните метастази, како што беше случај и во оваа студија [120].

6.3.4 G - диференцираност на туморот

Во истражувањето направено за изработка на оваа докторска дисертација, позитивната HER експресија кај ГК беше статистички значајно почеста кај умерено

диференцираните карциноми во однос на лошо диференцираните карциноми ($p=0,034$). Во однос на правецот на корелацијата, таа беше негативна, односно индиректна, со вредност $R = -0,209$, што покажува дека посилна HER2 експресија е поврзана со подобра диференцираност на туморот, и обратно. Високиот степен на експресија на HER2 (3+) беше во статистички значајна зависност од степенот на диференцираност на карциномот ($p=0,01$). Шема на HER2+++ беше значително почеста кај пациентите со ГК со добра диференцираност на карциномот.

Wang и соработниците во студија од 2017 година, во која ги анализирале клиничко-патолошките фактори здружени со HER2 позитивен ГК, утврдиле дека HER2 позитивитетот бил здружен со машкиот пол, со интестинален тип на тумори и со добро и умерено диференцирани тумори [118]. Gupta P. и соработниците, исто така, нашле почесто HER2 позитивитет кај добро диференцирани ГК, но несигнификантно [116], додека Lei YY. и соработниците утврдиле сигнификантна поврзаност на HER2 позитивитетот и добро диференцираниот градус [119], како што беше најдено и во оваа студија во однос на шемата HER2+++ . Сигнификантно почест HER2 позитивитет во добро и умерено диференцирани ГК утврдиле и Zhou F. и соработниците во една голема студија која вклучила 227 пациенти со ГК [47].

6.3.5. Стадиум на болеста

Со цел да се расветлат контроверзите кои постојат во однос на прогностичката вредност на HER2 протеинот, направени се повеќе студии и мета-анализи [103,104]. Објавени се студии кои не утврдиле прогностичко значење на HER2 експресијата кај ГК [121,122]. За разлика од нив, во мета-анализата која вклучила 42 публикации со вкупно 12.749 пациенти со ГК се покажало дека 71% од авторите се согласуваат дека HER2 позитивната експресија во ГК е поврзана со полошо преживување и полоши клиничко-патолошки параметри поврзани со прогресијата на туморот, како што е продор во серозата, метастази и повисок стадиум на болеста [92]. Kurokawa Y. и соработниците во мултицентрична студија за прогностичкиот импакт на HER2 експресијата во ГК утврдиле дека HER2 експресијата претставува независен прогностички фалтор кај пациентите во кој било стадиум на ресекцибилен ГК [91]. Aditi R и соработниците, во погоре веќе

споменатата студија, анализирајќи ја поврзаноста на прекумерната експресија на HER2 протеинот и клиничко-патолошките карактеристики на туморот не утврдиле корелација на HER2 експресијата и стадиумот на болеста [115], што се совпаѓа со наодите од студијата направена за изработка на оваа докторска дисертација.

Во оваа студија наодот на **позитивен** HER2 протеин не зависеше сигнификантно од стадиумот на болеста ($p=0,56$).

Позитивен HER2 протеин имаа 2 (18,18%) пациенти со карцином на желудник во стадиум I, 11 (29,73%) пациенти со карцином во стадиум II, 17 (58,62%) во стадиум III, и двајцата пациенти со карцином на желудник во стадиум IV.

Се потврди, исто така, дека стадиумот на дијагностициран карцином на желудник нема сигнификантно влијание врз степенот на HER2 експресијата кај пациентите со позитивен HER2 протеин ($p=0,61$), а помеѓу експресијата на HER2 протеинот и стадиумот во кој беше дијагностицирана болеста не беше регистрирана корелација, односно поврзаност ($R=0,0067$; $p=0,9$).

6.4. Експресија на Епштајн-Бар вирусот (EBV) при ГК

Се смета дека EBV е првиот хуман вирус, од фамилијата на херпес-вируси, кој директно е посочен како актер во карциногенезата. Тој како инфективен агенс е присутен кај повеќе од 90% од светската популација, но од неа мал процент развиваат тумори [123].

Познато е дека кај здрави лица EBV може перзистентно да ги инфицира Б помнечките клетки и да активира сигнални патишта на раст и преживување, со што може да придонесат кон развој на Б клеточен лимфом. Моноклонална пролиферација на клетки инфицирани со EBV се гледа и кај карциноми, вклучувајќи го и ГК, но патогенезата на појавата на ГК предизвикан од EBV е нецелосно разјаснета [124-127]. Thompson MP. и Kurzrock R. сметаат дека вирусот ги употребува своите вирални протеини, кои имитираат активност на повеќе фактори на раст, транскриптни фактори и антиапоптоички фактори, кои ја узурпираат контролата врз клеточните патеки кои ги регулираат разните

хомеостатски клеточни функции [123]. Ваквиот став за патогенезата го делат и други автори кои сметаат дека вирусот го спроведува онкогениот ефект преку експресија на EBV нуклеарен антиген и латентни мембрански протеини кои влегуваат во интеракција со бројни тумор-супресорни гени и сигнални патеки [18].

Во последната декада на минатиот век, со користење на полимеразна верижна реакција и *in situ* хибридизација детектирани се EBV геноми во ГК. Ваквото откритие посочувало дека EBV здружените ГК опфаќаат околу 10% од светската популација [124].

Во последната декада од овој век се појавија повеќе студии и низа мета-анализи во кои EBV-ГК се рангира со преваленција од 1,3-20,1% во разни земји [125,126].

Во истражувањето спроведено за изработка на оваа докторска дисертација позитивна имунореакција со антителото против EBV беше најдено кај 19 (23,75%) од вкупно 80 гастрични карциноми, што претставува висок процент во споредба со наодите од други автори [128]. Застапеноста на случаи на EBV здружен ГК покажува географска дистрибуција со приближна преваленција од 9,4% во Америка, 6,1% во Азија и 9,1% во Европа [26, 128-130].

6.4.1. Локализација

Најчест наод на EBV позитивна експресија беше забележан кај пациентите со карцином на телото на желудникот - 6 (30%), потоа cardia - 8 (25,81%) и antrum/pylorus - 5 (17,24%). Овие наоди беа без статистичка значајност ($p=0,55$). Овој наод се совпаѓа со наодите од мета-анализата на 48 студии кои опфатиле 9.738 пациенти, направена од Lee JH. и соработниците, во која е утврдено дека во повеќето студии EBV здружениот ГК почесто е лоциран во кардијата и телото на желудникот отколку на другите локации, потоа дека постои висока корелација помеѓу EBV-ГК и етничката припадност (белци и Латиноамериканци во однос на Азијати) и е почест кај младата популација од машки пол [26].

6.4.2. Демографски карактеристики

Во студијата изведена за изработка на оваа докторска дисертација, EBV здружениот ГК (EBVaGC) несигнификантно почесто беше регистриран кај женските отколку кај машките пациенти - 15 (27,27%) наспроти 4 (16%) ($p=0,27$), и разликата во возраста на пациентите со и без EBV инфекција исто така статистички беше несигнификантна, односно незначајна ($p=0,3$).

Резултатите од ова истражување покажаа сигнификантна асоцираност на националноста на пациентите со карцином на желудник со EBV инфекцијата. Кај пациентите од албанска националност сигнификантно почесто беше регистрирана инфекција со Епштајн-Бар вирусот споредено со пациентите од македонска националност ($p=0,009$).

Во гореспоменатата мета-анализа на Lee JH. и соработниците е утврдена етничка дистрибуција на EBVaGC и почеста застапеност кај помлади лица и кај машкиот пол [26]. Li SY. и соработниците во мета-анализа во која анализирале сооднос на EBV инфекцијата со клиничко-патолошките карактеристики на пациентите со ГК утврдиле значајна разлика во половата дистрибуција [129]. Herrera-Goepfert R. и соработниците во анализа на 330 последователни пациенти со ГК утврдиле сигнификантна разлика во возраста помеѓу EBV позитивните и EBV негативните пациенти.

Овие литературни податоци се во согласност со добиените резултати од оваа студија во однос на етничката припадност, но во оваа студија не се утврди полова или возрасна разлика кај пациентите со и без EBV инфекција.

6.4.3. Клиничко-патолошки карактеристики

Во студијата изведена за изработка на оваа докторска дисертација не беше докажана статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата на пациенти со и без инфекција со Епштајн-Бар вирусот, а во зависност од T статусот на туморот ($p=0,25$). Постоеше тенденција EBVaGC почесто да се јавуваат кај пациенти со повисок T статус, но наодот беше несигнификантен. Од 19 случаи кои беа EBV-позитивни, 11 (57,89%) беа со статус T4 и 6 (31,57%) со статус T3 ($p<0,05$).

Наодот на позитивни регионални лимфни јазли не беше сигнификантно асоциран со EBV експресијата во ГК ($p=1,0$). EBV експресија беше регистрирана кај 25% од пациентите со негативни регионални лимфни јазли и кај 23,44% од пациентите со позитивни регионални лимфни јазли.

Сите 8 пациенти со далечни метастази од оваа група пациенти беа позитивни за EBV, додека во групата пациенти без метастатски промени, кај 19 (26,39%) беше потврдено присуство на EBV.

Опишаната разлика во позитивна и негативна EBV експресија помеѓу пациентите без и со далечни метастази и статистички се потврди како сигнификантна за $p<0,0001$. Кај пациентите со гастричен карциноми, присуството на инфекција со EBV сигнификантно беше асоцирано со присуство на далечни метастази.

Во оваа серија пациенти со карцином на желудник не се докажа сигнификантна разлика помеѓу пациентите со позитивна и негативна EBV експресија, а во зависност од диференцираноста на туморот ($p=0,12$).

Не беше потврдена статистички сигнификантна разлика помеѓу EBV позитивните и EBV негативните гастрични карциноми во однос на стадиумот на болеста ($p=0,076$).

Литературните податоци во врска со EBV инфекцијата кај ГК и неговите клиничко-патолошки карактеристики се разнородни, но оние кои ги вклучуваат параметрите на TNM класификацијата се и релативно ретки. Во достапната литература, почесто се среќава анализа на EBVaGC во однос на присуството и отсуството на лимфни метастази.

Во мета-анализа на 22 истражувања кои вклучиле 5.475 пациенти со ГК, било утврдено дека eBV инфекцијата кај ГК е сигнификантно здружена со метастазите во регионалните лимфни јазли [129]. Tokunaga M. и соработниците исто така нашле сигнификантна здруженост на EBV инфекцијата кај ГК и појавата на лимфни метастази [28]. Спротивно на ова, Lee JH. и соработниците утврдиле дека EBVaGC не бил сигнификантно здружен со метастазите во регионалните лимфни жлезди или клиничкиот стадиум на болеста [26].

6.5. Корелација помеѓу HER2 и EBV експресија кај гастричниот карцином

Во ова истражување направената корелација помеѓу HER2 експресијата и EBV експресијата кај ГК потврди сигнификантна асоцираност помеѓу HER2 и EBV експресија ($p=0,041$). Не се најде статистички значајна разлика помеѓу степенот на HER2 експресијата кај ГК со негативна и позитивна EBV експресија ($p=0,16$), но корелацијата, направена со Spearman-овиот коефициент на корелација, покажа обратнопропорционална зависност ($R= -0.258$) и $p=0,02$, што зборува дека јачината на HER2 експресија кај гастричните карциноми значајно е поврзана со EBV експресијата.

Morita R. и соработниците, откако утврдиле дека нема објавени податоци за EBV инфекцијата и HER2 прекумерната експресија кај клеточни линии од ГК, направиле истражување и потврдиле значајно пониска фреквенција на HER2 прекумерна експресија кај EBVaGC, независно од суптипот според Лаурен и клиничкиот стадиум. Авторите заклучиле дека EBV инфекцијата игра супресивна улога во HER2 експресијата и дека ваквата корелација укажува на тоа дека EBVaGC претставува посебен биолошки ентитет [131]. Mitsuhashi K. и соработниците доаѓаат до слични сознанија во студија во која анализирале здруженост помеѓу EBV инфекцијата и HER2 експресијата на клеточни линии од ГК и на ткиво од хуман ГК. Авторите заклучиле дека EBV ја супримира HER2 експресијата, на протеинско ниво во клеточните линии на ГК, што доведува до редуцирана клеточна пролиферација и миграција. Авторите сметаат дека EBV може да е инволвиран и во регулацијата на HER2 експресијата во ткивото на ГК и дека EBV може да игра улога во резистенцијата на ГК кон трансстумаб.

ПОГОВОР

Од сето горе прикажано се гледа дека податоците за HER2 како прогностички фактор кај карциномот на желудникот се неконзистентни и објавените резултати во литературата се различни поради што проценката на вредноста на HER2 кај гастричниот карцином во корелација со други клиничко-патолошки прогностички фактори сè уште е актуелна [53, 78, 75].

Иако податоците од литературата укажуваат на тоа дека EBVaGC се карактеризира со преминација кај машката популација, локализација во проксималниот дел на желудникот, преминација на лимфоцитоплазма, слична хистологија, релативно добра прогонза и CIMP фенотип [131], поврзаноста на EBV инфекцијата со ГК и влијанието на EBV врз биолошкиот тек на болеста, односно молекуларните механизми кај ГК е сè уште актуелна тема за истражување [131, 132].

Изработката на оваа докторска дисертација се одвиваше во соработка со две институции, Клиниката за дигестивна хирургија и Институтот по патологија на Медицинскиот факултет при УКИМ, Скопје, со што се потврдува неопходноста од тимска работа за постигнување на соодветни научни цели.

Главниот придонес од истражувањето е доказот за неопходност од клиничка примена на имунохистохемиските методи за идентификација на експресијата на HER2 и EBV кај карциномот на желудникот со цел да се овозможи соодветна терапија кај пациентите.

7. ЗАКЛУЧОЦИ

7.1. Во испитаниот материјал позитивна HER2 имуноекспресија во карциномот на желудникот покажаа 29% од испитаниците.

7.2. Високиот степен на експресија на HER2 (3+) беше во статистички значајна зависност со локализацијата на карциномот на желудникот ($p=0,005$). Шема на HER2 +++ беше значително почеста кај пациентите со ГК локализиран во пределот на антро-пилорусниот регион.

7.3 Високиот степен на експресија на HER2 (3+) беше во статистички значајна зависност од присуството на метастази во регионалните лимфни јазли ($p=0,03$). Шема на HER2 +++ беше значително почеста кај пациентите со ГК со метастази во регионалните лимфни јазли.

7.4 Позитивна HER експресија кај ГК беше статистички значајно почеста кај умерено диференцираните карциноми отколку кај лошо диференцираните карциноми ($p=0,034$).

7.5 Високиот степен на експресија на HER2 (3+) беше во статистички значајна зависност од степенот на диференцираност на карциномот ($p=0,01$). Шема на HER2 +++ беше значително почеста кај пациентите со ГК со добра диференцираност на карциномот.

7.6. EBV асоциран карцином на желудникот беше присутен кај 23,7% од анализираните пациенти. Во оваа студија се утврди висок процент на EBV асоциран гастричен карцином.

7.7 EBV асоциран карцином беше сигнификантно почест кај припадниците од албанска националност во споредба со припадниците од македонска националност.

7.8 EBV експресијата во гастричниот карцином беше сигнификантно почеста кај пациентите со далечни метастази ($p<0,0001$).

7.9 Постоеше високосигнификантна корелација помеѓу HER2 позитивитетот и EBV експресијата кај гастричниот карцином ($p=0,041$).

7.10 Шемата на експресија на HER2 беше во негативна корелација ($R = - 0,258$) со EBV експресијата, односно HER2 експресијата беше поизразена кај EBV негативните гастрични карциноми ($p=0,02$).

7.11 Статистички значајната разлика во експресијата на HER2 протеинот во гастричниот карцином кај пациентите со нодални метастази и статистички значајната негативна корелација на HER2 експресијата со градусот на туморот укажуваат на тоа дека HER2 експресијата сигнификантно корелира со

поагресивна болест и можноста за полош исход кај пациентите со гастричен карцином.

7.12 Значајната корелација на EBV имуноекспресијата со далечните метастази кај пациентите со ГК сугерира влијание на EBV инфекцијата во прогресијата на гастричниот карцином.

7.13 Поради релативно оскудните и неконзистентни литературни податоци за EBV здружен гастричен карцином, неопходни се понатамошни студии со цел да се одреди улогата на EBV во однос на етиологијата, третманот и прогнозата кај пациентите со EBV здружен гастричен карцином.

8.0 РЕФЕРЕНЦИ

1. Crew KD, Neuqut A. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(3): 354–62.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
3. Correa P. Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:477–81.
4. Botterwck AA, Van den Brandt PA, Goldbohm RA. Vitamins, carotenoids, dietary fiber and the risk of gastric cancer: result from a prospective study after 6.3 years of follow up. *Cancer* 2000; 88(4):737-48.
5. Wong BC, Zhu GH, Lam SK. Aspirin induced apoptosis in gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 1999; 53:315–18.
6. Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angio genesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest.* 1999; 79:1469–77.
7. Cadiot G, Lehy T, Mignot M. Gastric endocrine cell proliferation and fundic argyrophil carcinoid tumors in patient with Zollinger Ellison syndrome. *Acta Oncol* 1993; 32:135-40.
8. Cammarota G, Cianci R, Gasbarrini G. Long term omeprazole treatment and risk of gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 119:4 1176-7.
9. Gammon MD, Schoenber JB, Absan H, Rish HA, Vaughan TL, Chow WH et al. Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1277-84.
10. Eltze E, Wulfing C, Von Struensee D, Piechota H, et al. Cox-2 and Her2/neu co-expression in invasive bladder cancer. *Int J Oncol* 2005; 26(6):1525–1531.
11. Ito T, Kobayashi D, Uchida K, et al. Helicobacter pylori invades the gastric mucosa and translocates to the gastric lymph nodes. *Lab Invest* 2008; 88:664-81.
12. Necchi V, Candusso ME, Tava F, et al. Intracellular, intercellular and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions and cancer by Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2007; 132:1009-23.
13. Ozbek A, Ozbek E, Dursun H, et al. Can Helicobacter pylori invade human gastric mucosa: an in vivo study using electron microscopy, immunohistochemical methods, and real-time polymerase chain reaction. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:416-22.
14. Masuda G, Tokunaga A, Shirakawa T, Togashi A, Kiyama T, Kato S, Matsukura N, Bou H, Watanabe M, Tajiri T. Helicobacter pylori infection, but not genetic polymorphism of CYP2E1, is highly prevalent in gastric cancer patients younger than 40 years. *Gastric Cancer* 2007; 10:98-103.
15. Kokkola A, Valle J, Haapiainen R, Sipponen P, Kivilaakso E, Puolakkainen P. Helicobacter pylori infection in young patients with gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(7):643-7.

16. Fukuda H, Saito D, Hayashi S, et al. Helicobacter pylori infection, serum pepsinogen level and gastric cancer: a case control study in Japan. Jpn J Cancer Res 1995; 86:64-71.
17. Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, et al. Progression of chronic atrophic gastritis associated with helicobacter. IJC 2004; 109(1):138-43.
18. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo CM, Rabkin C. Meta-analysis Shows That Prevalence of Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Cancer Differs Based on Sex and Anatomic Location. Gastroenterology 2009; 137:824-33.
19. Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, et al. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5455-9.
20. Huen DS, Henderson SA, Croom-Carter D, et al. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. Oncogene 1995; 10:549-60.
21. Stewart S, Dawson CW, Takada K, et al. Epstein-Barr virus encoded LMP2A regulates viral and cellular gene expression by modulation of the NF-kappa B transcription factor pathway. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:15730-35.
22. Burgess DE, Woodman CB, Flavell KJ, et al. Low prevalence of Epstein-Barr virus in incident gastric adenocarcinomas from the United Kingdom. Br J Cancer 2002; 86:702-4.
23. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. Mol Pathol 2000; 53:255-61.
24. Fukayama M, Hayashi Y, Iwasaki Y, et al. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. Lab Invest 1994;71:73-81.
25. Imai S, Koizumi S, Sugiura M, et al. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:9131-5.
26. Lee JH, Kim SH, Han SH, An JS, Lee ES, Kim YS. Clinicopathological and Molecular Characteristics of Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma: A Meta-analysis. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24(3):354-65.
27. Herrera-Goepfert R, Akiba S, Koriyama C, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: evidence of age-dependence among a Mexican population. World J Gastroenterol 2005; 11:6096-103.
28. Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, et al. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. Am J Pathol 1993; 143:1250-4.
29. Wang HH, Wu MS, Shun CT, et al. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the stomach: a subset of gastric carcinoma with distinct clinicopathological features and high prevalence of Epstein-Barr virus infection. Hepatogastroenterol 1999; 46:1214-9.
30. Wu MS, Shun CT, Wu CC, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas: relation to *H. pylori* infection and genetic alterations. Gastroenterology 2000; 118:1031-8.

31. Yanai H, Murakami T, Yoshiyama H, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and atrophic gastritis. *J Clin Gastroenterol* 1999; 29:39–43.
32. Lee JH, Kim SH, Han SH, An JS, Lee ES, Kim YS. Clinicopathological and Molecular Characteristics of Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma: A Meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(3):354-65.
33. Kim JY, Jeon TJ, Bae BN, et al. The prognostic significance of growth factors and growth factor receptors in gastric adenocarcinoma. *APMIS* 2013; 121:95-104.
34. Zali H, Rezaei-Tavirani M, Azodi M. Gastric cancer: prevention, risk factors and treatment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2011; 4(4):175–85.
35. Bazley L A, Gullick W J. The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12:S17–S27. Available from: <http://www.endocrinology-journals.org>
36. Tateishi M, Toda T, Minamisono Y, et al. Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma. *Surg Oncol* 1992; 49:209–12.
37. Sasano H, Date F, Imatani A, et al. Double immunostaining for c-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells. *Hum Pathol* 1993; 24:584–9.
38. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008; 19:1523–9.
39. Kono K, Takahashi A, Sugai H, Fujii H, Choudhury RA, Kiessling R, Matsumoto Y. Dendritic Cells Pulsed with HER-2/neu-derived Peptides Can Induce Specific T-Cell Responses in Patients with Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:3394–400.
40. Jin Z, Jiang W, Wang L. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review) *Oncology Let* 2015; 9:1502-8.
41. Yamanaka S, Olaru AV, An F, et al. MicroRNA-21 inhibits Serpini1, a gene with novel tumour suppressive effects in gastric cancer. *Dig Liver Dis* 2012; 44:589-96.
42. Hudler P. Genetic aspects of gastric cancer instability. *Scientific World J* 2012; 761909. doi: 10.1100/2012/761909
43. Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* 1988; 48:137-41.
44. Sakai K, Mori S, Kawamoto T, et al. Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77:1047-12.
45. Garcia I, Vizoso F, Martin A, et al. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2003; 10:234-41.

46. Terashima M, Kitada K, Ochiai A, et al. ACTS-GC Group: Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18:5992-6000.
47. Zhou F, Li N, Jiang W, et al. Prognosis significance of HER-2/neu overexpression/amplification in Chinese patients with curatively resected gastric cancer after the ToGA clinical trial. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 274.
48. Schuell B, Gruenberger T, Scheithauer W, et al. HER 2/neu protein expression in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2006; 8(6):123.
49. McKenzie SJ, DeSombre KA, Bast BS, et al. Serum levels of HER-2 neu (C-erbB-2) correlate with overexpression of p185neu in human ovarian cancer. *Cancer* 1993; 71:3942-6.
50. Hetzel DJ, Wilson TO, Keeney GL, et al. HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1992; 47:179-85.
51. Hirashima N, Takahashi W, Yoshii S, et al. Protein overexpression and gene amplification of c-erb B-2 in pulmonary carcinomas: a comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2001; 14:556-662.
52. Mitra AB, Murty VVS, Pratap M, et al. ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1994; 54:637-9.
53. Beckhardt RN, Kiyokawa N, Xi L, et al. HER-2/neu oncogene characterization in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121(11):1265-70.
54. Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis MCh, et al. Frequent homogenous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinomas of the esophagus. *Mod Pathol* 2007; 20(1):120-9.
55. Gravalos C, Marquez A, Garcia-Carbonero R, et al. Correlation between Her2/neu overexpression/amplification and clinicopathological parameters in advanced gastric cancer patients: a prospective study. *Gastrointestinal Cancers Symposium*. 2007; 130 (Abstr 89).
56. Lordick F, Bang YJ, Kang YK, et al. HER2-positive advanced gastric cancer: similar HER2-positivity levels to breast cancer. *Eur J Cancer* 2007; 5(4):271 (Abstr 3541).
57. Kang Y, Bang Y, Lordick F, et al. Incidence of gastric and gastro-esophageal cancer in the ToGA trial: correlation with HER2 positivity. 2008; American Society of Clinical Gastrointestinal Cancers Symposium, Orlando. Abstract 11.

58. Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, et al. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. *Cancer* 1993; 72:3179–84.
59. Mizutani T, Onda M, Tokunaga A, et al. Relationship of c-erbB-2 protein expression and gene amplification to invasion and metastasis in human gastric cancer. *Cancer* 1993; 72:2083–8.
60. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erbB-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 1999; 85:1894–902.
61. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998; 85:1457-9.
62. Hu B, El Hji N, Sittler S, Lammert N, Bames R., Meloni-Ehrig. Gastric Cancer: Classification, Histology and Application of Molecular Pathology, *J Gastrointest Oncol.* 2012; 3(3):251–61. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
63. Allum WH, Griffin SM, Watson A, Colin-Jones D. Guidelines for the management of oesophageal and gastric cancer. *Gut* 2002; 50 Suppl 5:1-23.
64. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. 2010
65. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WA. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Management Res* 2018; 10:239–24.
66. Takahashi T, Saikawa S, Kitagawa Y. Gastric Cancer: Current Status of Diagnosis and Treatment. *Cancers (Basel).* 2013; 5(1): 48-63. doi: [10.3390/cancers5010048]
67. Huang Q, Shi J, Feng A, et al. Gastric cardiac carcinomas involving the esophagus are more adequately staged as gastric cancers by the 7th edition of the American Joint Commission on Cancer staging System. *Mod Pathol* 2011; 24:138-46.
68. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *BJC* 2008; 99:1704-11.
69. Yasui W, Sentani K, Sakamoto N, et al. Molecular pathology of gastric cancer, research and practice. *Pthol Res Pract* 2011; 207:608-12.
70. CGARN-Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014; 513:202-9. doi: 10.1038/nature 13480.

71. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *New Eng J Med* 2006; 355(1):11–22.
72. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Eng J Med* 2001; 345(10): 725–30.
73. Sastre J, Garcia-Saenz JA, Diaz-Rubio E. Chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(2):2004–213.
74. Stessin AM, Sherr DL. Demographic Disparities in Patterns of Care and Survival Outcomes for Patients with Resected Gastric Adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(2):223–33.
75. Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathol* 2008; 52(7):797-805.
76. Gu J, Zheng L, Wang Y, et al. Prognostic significance of HER2 expression based on trastuzumab for gastric cancer (ToGA) criteria in gastric cancer: an updated meta-analysis. *Tumour Biol* 2014; 35:5315-21.
77. Development of trastuzumab resistant human gastric carcinoma cell lines and mechanisms of drug resistance. *Science Reports* 5. Article Number: 11634(2015) doi:10.1038/srep11634
78. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2 positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer. *Lancet* 2010; 376: 687-97.
79. Fujimoto-Ouci K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Moti K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59(6):795-805.
80. Baniak N, Senger JL, Ahmed Sh, Kanthan SC, Kanthan R. Gastric biomarkers: a global review. *World J Surg Oncol* 2016; 14:212-26.
81. Carlomagno N, Incollingo P, Tammaro V, Peluso G, Rupealta N, Chiacchio G, et al. Diagnostic, Predictive, Prognostic, and Therapeutic Molecular Biomarkers in Third Millennium: A Breakthrough in Gastric Cancer. *Biomed Res Int* 2017; 7869802. doi: 10.1155/2017/7869802
82. Jin Z, Jiang W, Wang L. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review). *Oncology Let* 2015; 9:1502-8. doi: 10.3892/ol.2015.2959

83. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, et al. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232:1644-6.
84. Yonemura YI, Yamaguchi A, et al. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short-term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 1034-38.
85. Ishida T, Scand Tsujisaki M, Hanzawa Y, et al. Significance of erbB-2 gene product as a target molecule for cancer therapy. *J Immunol* 1994; 39:459-66.
86. Tokunaga A, Onda M, Okuda T, et al. Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor and c- erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer* 1995; 75:1418-25.
87. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008; 19(9):1523-9. doi: 10.1093/annonc/mdn169.
88. He C, Bian XY, Ni XZ, Shen DP, Shen YY, Liu H, Shen ZY, Liu Q. Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19:2171-8.
89. Wang S, Zheng G, Chen L, Xiong B. Effect of HER-2/neu over-expression on prognosis in gastric cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12:1417-42.
90. Baykara M, Benekli M, Ekinci O, Irkkan SC, Karaca H, Demirci U, Akinci MB, Unal OU, Dane F, Turkoz FP. Clinical Significance of HER2 Overexpression in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancers. *J Gastrointest Surg.* 2015; 19:1565-71.
91. Kurokawa Y, Matsuura N, Kimura Y, Adachi S, Fujita J, Imamura H, Kobayashi K, Yokoyama Y, Shaker MN, Takiguchi S. Multicenter large-scale study of prognostic impact of HER2 expression in patients with resectable gastric cancer. *Gastric Cancer* 2015; 18:691-7.
92. Jorgensen JT, Hersom M. HER2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer - A Systematic Analysis of Data from the Literature. *J Cancer* 2012; 3:137-144.
93. Genta RM, Huberman RM, Graham DY. The gastric cardia in *Helicobacter pylori* infection. *Hum Pathol* 1994; 25:915-9.
94. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 1989; 4: 362-6.

95. Chandrasoma PT, Der R, Ma Y, et al. Histology of the gastroesophageal junction: an autopsy study. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:402-9.
96. Pesic M, Karanikolic A, Gjorgjevic N, Katic V, Rancic Z, Radojkovic M, Ignjatovic N, Pesic I. The Importance of Primary Gastric Cancer Location in 5-Year Survival Rate, *Arch Oncol* 2004; 12(Suppl 1):51-3.
97. Terry MB, Gaudet MM, Gammon MD. The epidemiology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12:111-27.
98. Crew DK, Neuhut A. Epidemiology of gastric cancer, *World J Gastroenterol* 2006; 12(3):354–362. doi: 10.3748/wjg.v12.i3.354
99. National Cancer Institute. Surveillance, epidemiology, and end results: incidence, stomach cancer. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>
100. Hu B, El Hijj N, Sittler S, Lammert N, Bames R, Meloni-Ehrig. Gastric Cancer: Classification, Histology and Application of Molecular Pathology. *J Gastrointest Oncol*. 2012; 3(3):251–61. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
101. Badgwell B, Das P, Ajani J. Treatment of localized gastric and gastroesophageal adenocarcinoma: the role of accurate staging and preoperative therapy. *J Hematol Oncol* 2017; 10:149. doi: 10.1186/s13045-017-0517-9
102. Patrick JT, Venkatesh SK. Gastric carcinoma: imaging diagnosis, staging and assessment of treatment response. *Cancer Imaging* 2013; 13(2):212–27.
103. Monges G, Terris B, Chenard MP, Penault-Llorca F, Beauclair S, Bibeau F. Assessment of HER2 status from an epidemiology study in tumor tissue samples of gastric and gastro-esophageal junction cancer: Results from the french cohort of the HER-EAGLE study. *J Clin Oncol* 2017. doi: 10.1200/jco.2013.31.4_suppl.26
104. Chan DS, Twine CP, Lewis WG. Systematic review and meta-analysis of the influence of HER2 expression and amplification in operable oesophageal cancer. *J Gastrointest Surg* 2012; 16(10):1821-9.
105. Wang S, Zheng G, Chen L, Xiong B. Effect of HER-2/neu over-expression on prognosis in gastric cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12:1417-42.

106. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, et al. Amplification of HER2 in gastric carcinoma: association with topoisomerase liagene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to transtuzumab. *Ann Oncol* 2005; 16:273-8.
107. Bartley AN, Washington MK, Ismaila N, Ajani AJ. HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline Summary From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *J Oncol Practice* 2017; 13(1):53-8. doi: 10.1200/JOP.2016.018929
108. Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. HER2 testing in gastric cancer: An update. *World J Gastroenterol* 2016; 22(19): 4619-25.
109. Alvarado-Cabrero I, Gil-Hernández S, Ruelas-Perea A, Villaverde-Rodríguez D, Montes-Ochoa JR, MedranoGuzmán R. Immunohistochemical assessment of HER2 expresson gastric cancer. A clínico-pathologic study of 93 cases. *Cir Cir.* 2017;85:504-9.
110. Abdel-Salam RA, El-Hawary A, Mohamed MA, Gamil T. Immunohistochemical Expression of Her2/neu in Gastric Carcinomas in Egyptian Patients. *J Clin Pathol Diagn* 2018; 1:3.
111. Ayed-Guerfali DB, Abid N, Khabir A, Mnif H, Khanfir A, Boujelbène S, Frikha M, Gargouri R, Boudawara TS. Expression of human epidermal growth factor receptor 2 and p53 in gastric cancer patients: Clinical and prognosis relevance. *Clin Cancer Investig J* 2016;5:424-9.
112. Boku N. HER2-positive gastric cancer. *Gastric Cancer* 2014; 17(1): 1-12. doi: 10.1007/ s10120-013-0252-z.
113. Yamamoto M, Rashid MO, Wong J. Surgical management of gastric cancer: the East vs. West perspective. *J Gastrointest Oncol* 2015; 6(1):79–88. doi: [10.3978/j.issn.2078-6891.2014.097]
114. Hohenberger P, Gretschel S. Gastric cancer. *Lancet.* 2003;362:305–15. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13975-X
115. Aditi R, Aarathi R, Pradeep R, Hemalatha L, Akshatha C, Amar K. HER2 Expression in Gastric Adenocarcinoma - a Study in a Tertiary Care Centre in South India. *Indian J Surg Oncol* 2016; 7(1):18–24. doi: [10.1007/s13193-015-0436-6]
116. Gupta P, Rao S, Bhalla S. Human epidermal growth factor receptor 2 expression in gastric carcinoma and its association with histopathological

parameters in Indian population. *Indian J Cancer* 2016; 53(4):505-11
doi: 10.4103/ijc.IJC_513_16

117. Rajagopal I, Niveditha SR, Sahadev R, Nagapa PK, Rajendra SG. HER 2 Expression in Gastric and Gastro-esophageal Junction (GEJ) Adenocarcinomas. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(3): EC06–EC10.
doi: 10.7860/JCDR/2015/12581.5630
118. Wang HB, Liao XF, Zhang J. Clinicopathological factors associated with HER2-positive gastric cancer: A meta-analysis. *Medicine* 2017; 96:44-8.
119. Lei YY, Huang JY, Zhao QR, Jiang N, Xu HM, Wang ZN, Li HQ, et al. The clinicopathological parameters and prognostic significance of HER2 expression in gastric cancer patients: a meta-analysis of literature. *World J Surg Oncol* 2017; 15:68-75. doi: 10.1186/s12957-017-1132-5
120. Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert EH, Muller W. HER2 Expression in Gastric Cancer: Rare, Heterogeneous and of No Prognostic Value – Conclusions from 924 Cases of Two Independent Series. *Cellular Oncol* 2010; 32(1-2):57-65. <https://doi.org/10.3233/CLO-2009-0497>.
121. He C, Bian XY, Ni XZ, Shen DP, Shen YY, Liu H, Shen ZY, Liu Q. Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19:2171–8.
122. Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* 2000; 18:2201–9.
123. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 1(10):803-21.
124. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, Jinushi M., Yoshiyama M. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Viruses* 2012; 4:3420-39.
doi:10.3390/v4123420
125. Murakami M, Hoshikawa Y, Satoh Y, et al. Tumorigenesis of Epstein-Barr virus-positive epithelial cell lines derived from gastric tissues in the SCID mouse. *Virology* 2000; 277:20-6.
126. Tajima M, Komuro M, Okinaga K. Establishment of Epstein-Barr virus - positive human gastric epithelial cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89(3):262-8.

127. Kim Y, Shin A, Gwack J, Kim CS, Park SK, Hong YC, Kang D, Yoo KY. Epstein-Barr virus antibody level and gastric cancer risk in Korea: a nested case-control study. *Br J Cancer* 2009;101(3):526-9.
128. Burgess DE, Woodman CB, Flavell KJ, et al. Low prevalence of Epstein-Barr virus in incident gastric carcinomas from the United Kingdom. *Brit J Cancer* 2002; 86:702-4.
129. Li SY, Du HJ, Wang Z, Zhou L, Zhao XY, Zeng Y. Meta-analysis of the relationship between Epstein-Barr virus infection and clinicopathological features of patients with gastric carcinoma. *Sci China Life Sci* 2010; 53(4):524-30.
130. Truong CD, Feng W, Li W, Khoury T, et al. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; **28**:14. doi.org/ 10.1186/1756-9966-28-14
131. Morita R, Sukawa Y, Yamamoto H, Yoshida Y, Oikawa R, Matsuo Y, et al. Suppressive effects of EB virus infection on HER2 expression in gastric cancer cells. *Integr Mol Med* 2014; 1(3):57-60 doi: 10.15761/IMM.1000110
132. Mitsuhashi K, Sukawa S, Nakazawa M, Naito T, Ito M, Igarashi H. Association Between EBV Infection and HER2 Expression in Gastric Cancer. *Gastroenterology* 2013; 144(5, Suppl.1):S-353.