● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ شانزدهم، شمارهٔ ۳، ص ۲۳۲-۲۲۵، ۱۳۸۸

مقالهٔ پژوهشی

# ردیابی سلول‌های سرطانی و بررسی الگوی DNA به روش فلوسیتومتری در لاواژ مایع پریتوان بیماران مبتلا به سرطان معده

دکتر احمدرضا دیانی* [۱]، دکتر شاهپور شاه‌قاسم‌پور [۲]، دکتر مهرداد مقیمی [۳]، دکتر فرشته کمانی [۳]، دکتر سیما سیدغفوری [۴]، دکتر حبیب‌الله پیروی [۵]

**خلاصه**

**مقدمه:** سرطان معده دومین سرطان شایع و رو به افزایش در ایران است که متأسفانه اغلب در مراحل اولیه هیچ علامت تشخیصی ندارد و عمدتاً بیماران زمانی مراجعه می‌کنند که بیماری پیشرفت کرده‌است. با توجه به نقش عوامل ژنتیکی و محیطی در تغییر سلول‌های بافت معده به سمت سرطانی شدن، اهداف این مطالعه ردیابی سلول‌های سرطانی به خارج از معده جهت شناسایی دقیق مرحله بیماری و بررسی میزان محتویات DNA سلول‌های سرطانی و مقایسه آن با سلول‌های طبیعی به‌عنوان یک شاخص برای پیش‌بینی سیر بیماری و ارائه برنامه‌ریزی دقیق‌تر در درمان بیماری می‌باشد.

**روش:** در این مطالعه ۲۷ نمونه جمع‌آوری و از این تعداد ۲۲ نمونه مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های موجود در لاواژ مایع پریتوان بیماران توسط سانتریفیوژ رسوب داده شدند. سپس از این سلول‌ها به میزان مشخص (۱۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر) با کیت رنگ‌آمیزی DNA رنگ‌آمیزی شد و DNA آنها به‌وسیله فلوسیتومتری و با نرم‌افزار modfit مورد بررسی قرار گرفت و سپس هیستوگرام‌های مربوط به آنالیز DNA سلول سرطانی با سلول‌های طبیعی مورد مقایسه قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در مجموع ۱۲ مورد از ۲۲ نمونه مثبت بود. DNA ploidy در ۳۳/۳٪ سلول‌های سرطانی مشاهده شد. افزایش SPF سلولی در سلول‌های سرطانی ۲۲/۲٪ بود که این شاخص ارتباط مستقیم با تکثیر سلول دارد.

**نتیجه‌گیری:** اندازه‌گیری SPF سلولی احتمالاً به‌عنوان یک شاخص در رفتار سلول سرطانی مطرح می‌باشد که بیانگر میزان تهاجمی بودن آن است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که DNA-ploidy و افزایش SPF در سلول‌های سرطانی وجود دارد و با اندازه‌گیری این دو می‌توان سیر تهاجمی بیماری را تخمین زد تا بر اساس آن تصمیم‌گیری برای عمل جراحی گسترده وکمک گرفتن از روش‌های شیمی درمانی مؤثر انجام شود و از اعمال جراحی بی‌نتیجه و همراه با عارضه خودداری شود.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان معده، فلوسیتومتری، مایع لاواژ پریتوان، DNA ploidy

۱- دستیار جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۲- استادیار ایمنی‌شناسی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۳- استادیار جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۴- دستیار مامایی و بیماری‌های زنان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران ۵- استاد جراحی عمومی و فوق تخصص جراحی عروق، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** دفتر گروه جراحی، بیمارستان افضلی‌پور، کرمان ● **آدرس پست الکترونیک:** drahmaddayan@yahoo.com

**دریافت مقاله:** ۱۳۸۷/۱۱/۲ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۸/۲/۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۸/۲/۲۳

**مقدمه**

سرطان معده دومین سرطان شایع در جهان می‌باشد (۱). امروزه این سرطان در کشورهای پیشرفته حتی در میان ۱۰ سرطان شایع هم نمی‌باشد در حالی‌که متأسفانه در ایران به‌نظر می‌رسد شیوع آن رو به افزایش است و احتمال آن می‌رود که از بروز جهانی نیز پیشی گرفته و به‌عنوان شایع‌ترین سرطان مطرح شود. عوامل محیطی و ژنتیکی زیادی در ایجاد بیماری دخالت دارند و به همین دلیل بروز بیماری از پراکندگی جغرافیایی زیادی برخوردار است (۳-۱). ادنوکارسینوم معده در سال ۱۹۳۰ بیشترین علت مرگ مردان و سومین علت مرگ زنان بود (۱) در حالی‌که شیوع آن در دهه‌های اخیر در امریکا و غرب کمتر شده است ولی در کشورهای در حال توسعه هنوز بیشترین علت مرگ‌ومیر می‌باشد (۱). کربوهیدرات‌ها خصوصاً همراه با نمک (۴)، نوشیدنی‌های حاوی نیترات (۵) و سیگار (۶) در ایجاد بیماری دخیل هستند.

ژن APC، جهش K-ras و افزایش پرزانتاسیون ERBB2 پروتئین، ارتباط مستقیم با قدرت تهاجمی تومور دارد (۷). همچنین ترکیبات نیترات و نیتریت نیز در ایجاد بیماری نقش دارند. میزان نیترات موجود درآب به‌خصوص در کشورهای توسعه‌نیافته خود می‌تواند دلیلی بر افزایش شیوع بیماری در این مناطق باشد. نقش آفلاتوکسین و فلفل و یا کمبود مواد معدنی و ویتامین‌ها نیز در جای خود حائز اهمیت است. شاید آفلاتوکسین موجود در نان خشک و غلات و مصرف بدون نظارت آنها توسط دام و احشام در اردبیل و شمال ایران و مصرف لبنیات آلوده حاصله در بروز بیماری نقش داشته باشد (۸). حد اکثر بروز بیماری در مردان بالای ۶۰ سال می‌باشد (۹) و مصرف داروهایی همچون امپرازول نیز در بروز بیماری نقش داشته‌اند (۱۰).

درمان بیماری در مراحل ۱ تا ۳ جراحی و در مرحله ۴ تسکینی و شیمی‌درمانی می‌باشد. سیر بیماری بدفرجام است و امروزه تقریباً علاج قطعی ندارد و امید به زندگی بعد از درمان در طی ۵ سال کمتر از ۲۲ درصد می‌باشد (۱). خوشبختانه پیشرفت سریع علوم جدید (از جمله بررسی محتویات DNA) و تشخیص زود هنگام بیماری آینده‌ای روشن را امید می‌دهد (۱۱)، که هدف این مطالعه نیز همین است.

الگوی DNA-PLOIDY بدین‌گونه است که در مخاط معده به‌طور طبیعی سلول‌ها DIPLOID هستند حال آنکه در سرطان ۴ حالت زیر وجود دارد:

۱- Diploid mode (٪۶۸)

۲- hetero ploid mode (٪۱۵)

۳- diploid & hetero ploid (٪۱۳)

۴- mosaic of several hetero ploid (٪۴)

پلی‌پلوئید هم در مراحل اولیه و هم در مراحل پیشرفته بیماری قابل مشاهده است .

به‌طور خلاصه از علل مؤثر در ایجاد سرطان مصرف نشاسته، ماهی و گوشت دودی و سبزیجات خشک شده می‌باشد. Benzpyrene موجود در غذاهای دودی، نیتروزامین موجود در آب و خاک و همچنین در گوشت و سبزیجات بسته‌بندی شده از جمله دیگر عوامل سرطان‌زا می‌باشند. برعکس انجماد (refrigeration) سبب مهار تبدیل نیترات به نیتریت می‌شود و به عنوان یک عامل محافظتی عمل می‌کند. همچنین مصرف شیر و سبزیجات تازه حاوی ویتامین ث به دلیل مهار نیتروزاسیون آمین‌ها به عنوان عوامل محافظت‌کننده مطرح هستند (۱۲). از جمله عوامل ژنتیکی مؤثر در ایجاد سرطان HNPCC و گروه خونی A می‌باشند. از عوامل مؤثر دیگر آلودگی به هلیکوباکترپیلوری، طبقات اجتماعی پایین، گاستریت اتروفیک، انمی‌پرنیسیوز، ساب‌توتال گاسترکتومی و پولیپ‌های ادنوماتوی معده می‌باشند (۱۳).

**روش بررسی**

نمونه‌های بررسی شده در مطالعه از بیمارانی جدا شدند که به‌دلیل سرطان معده در بخش جراحی بیمارستان طالقانی بستری می‌شدند. معیار ورود به مطالعه بیمارانی بودند که از نظر بالینی و آزمایشگاهی و رادیولوژیکی شواهدی به نفع تهاجم تومور به خارج از معده (کبد و ارگان‌های اطراف معده و پریتوان ومزوی روده‌ها) نداشته و قادر به تحمل عمل جراحی نیز بودند.

پس از آماده‌کردن بیمار برای عمل جراحی و پس از شروع جراحی در ابتدا بیماران با ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول نرمال‌سالین ۰/۹٪ (هم دمای بدن) تحت شستشوی حفره شکم قرار گرفتند. مایع به آرامی به مدت یک دقیقه به همه قسمت‌های حفره شکم هدایت وسپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از مایع با سرنگ تومی کشیده و در یک ظرف ذخیره شد و بلافاصله درون یخ قرار گرفته و در کمتر از یک ساعت به واحد فلوسیتومتری منتقل شده و در دمای منهای هشتاد درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفتند. این نمونه‌ها طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶ بالغ بر ۲۷ نمونه بودند که ۵ نمونه به‌دلیل شرایط نامناسب نگهداری خراب شدند و نهایتاً ۲۲ نمونه مورد بررسی قرار گرفتند.

سلول‌های موجود در مایع لاواژ بعد از جمع‌آوری به‌وسیله دستگاه سانتریفیوژ رسوب داده می‌شدند. از این سلول‌ها به میزان مشخص (۱۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر) با کیت مخصوص رنگ‌آمیزی DNA (PROPIDIUM IODIDE) رنگ‌آمیزی شده و به‌وسیله دستگاه فلوسیتومتری، DNA رنگ‌آمیزی می‌شد. پس از فلوسیتومتری بر روی DNA نمونه‌ها، با نرم‌افزار MODFIT، هیستوگرام‌های مربوط به آنالیز DNA تعیین می‌شدند که شامل بررسی سیستماتیک DNA-PLOIDY، DI(DNA-Index) و SPF (درصد سلول‌های موجود در مرحله سنتز = S-phase fraction%) بود. در نهایت هیستوگرام‌های این نمونه‌ها با هیستوگرام‌های سلول‌های طبیعی که حاوی DNA-diploid بودند، مقایسه می‌شدند. سلول‌های توموری با DI-1 به‌عنوان سلول دیپلوییید و سلول‌های سرطانی با DI بالای ۱/۲ به‌عنوان آنوپلوییید معرفی شدند، این به‌شرطی است که مجموع سلول‌های آنوپلوییدی حداقل بیش از ۱۰٪ مجموع سلول‌های ارزیابی شده باشند.

با فلوسیتومتری پارامترهای DNA ploidy ، total-S-phase peak و G2M – phase peak بر روی نمونه‌های کنترل و نمونه‌های سرطانی ارزیابی گردیدند که DNA-aneuploidy به‌طور میانگین با DI بیش از ۱/۲ از نمونه‌های سرطانی مشاهده گردید.

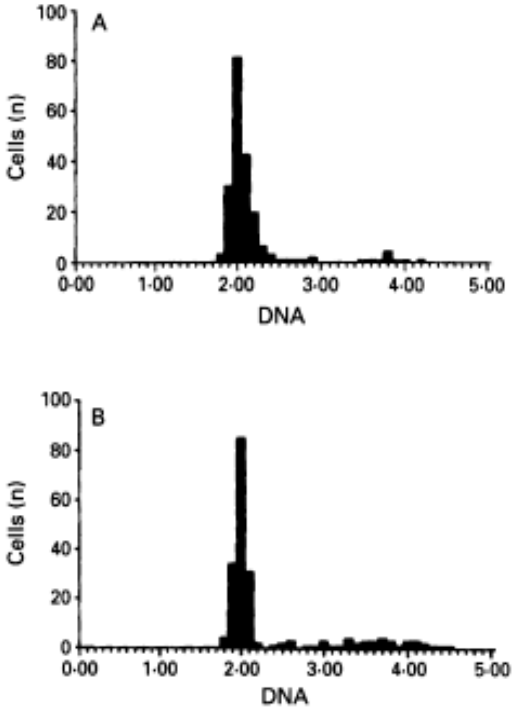
در این مطالعه علاوه بر میزان DNA ploidy ، درصد SPF نیز از روی هیستوگرام‌های به‌دست آمده، مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوان به تشخیص قابل قبولی بین سلول‌های سرطانی و سلول‌های عادی رسید چرا که سلول‌های سرطانی تمایل زیادی برای تکثیر داشته و در مرحله سنتز میزان DNA سلول ۲ برابر می‌شود.

**نتایج**

افرادی که از آنها نمونه تهیه شد، ۱۴ نفر (۶۳/۶٪) مرد و ۸ نفر (۳۶/۴٪) زن بودند. میانگین سنی مردها ۱۲/۶±۵۸/۷ سال و میانگین سنی زن‌ها ۱۴/۷±۵۵/۶ سال بود. در مجموع ۱۳ نفر (۵۹/۱٪) درگیری گره لنفی داشتند. محل درگیری در ۱۱ نفر (۵۰٪) آنتر معده، ۶ نفر (۲۷/۳٪) بدنه، ۲ نفر (۹/۱٪) خم کوچک و ۱ نفر (۴/۵٪) هم کل معده بود.

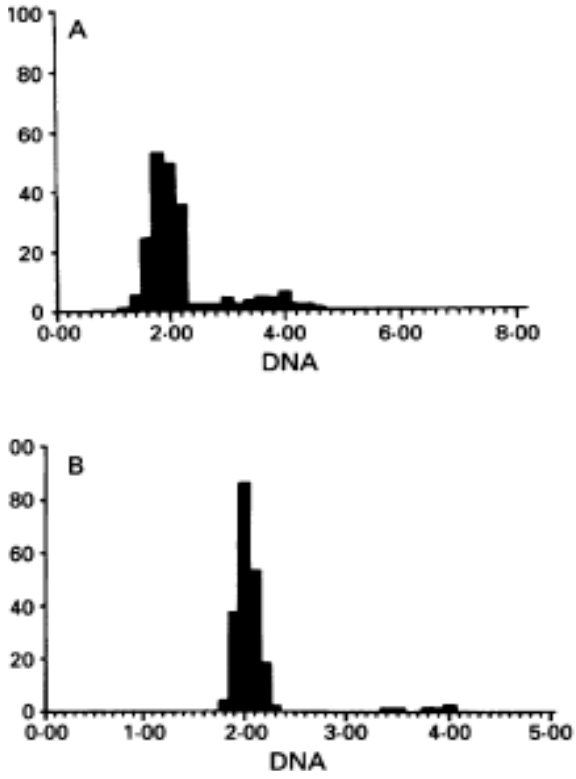
افزایش SPF سلولی، سرطانی بودن سلول را مطرح می‌کند. در این مطالعه میانگین SPF سلول‌های سرطانی ۲۲/۹٪ بود. لازم به یادآوری است که نمونه‌های کنترل، آنوپلوئیدی از خود نشان ندادند و این نمونه‌ها Total S-phase پایین و شاخص سنتزی کمتری از خود نشان دادند. مطالعه

حاضر نشان داد که اندازه‌گیری SPF می‌تواند احتمالاً به‌عنوان یک شاخص خوب در تشخیص سرطان‌های با قدرت تهاجمی بالا استفاده شود. شکل ۱ مقایسه دو سلول طبیعی (A) و سرطانی (B) را از نظر الگوی DNA-diploidy نشان می‌دهد. شکل۲ میزان SPF در سلول‌های طبیعی (A) و سرطانی (B) را با هم مقایسه می‌کند. همچنان که مشاهده می‌شود سلول‌های طبیعی در مقایسه با سلول‌های سرطانی ازدیاد تکثیری با SPF بالاتری از خود نشان داده‌اند و SPF سلولی در سلول‌های سرطانی کمتر بوده است. شکل۳ توزیع DNA آنوپلوییدی و پلی‌پلوییدی در برخی از سرطان‌های با میل تهاجمی زیاد را نشان می‌دهد. شکل ۴ هیستوگرام سلول نرمال معده (A) و سلول‌های آنوپلوییدی و پلی‌پلوییدی (B) را در برخی از نمونه‌های ایمنوهیستوگرام با میل تهاجمی زیاد نشان می‌دهد.



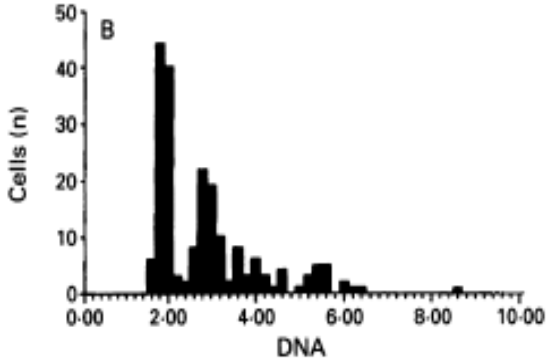

**شکل ۱.** *میزان شدت نور فلورسانس در هسته سلول عادی و سلول سرطانی*

هیستوگرام A بیانگر توزیع الگوی DNA در یک سلول طبیعی و هیستوگرام B DNA دیپلوییدی یک سلول سرطانی معده می‌باشد.



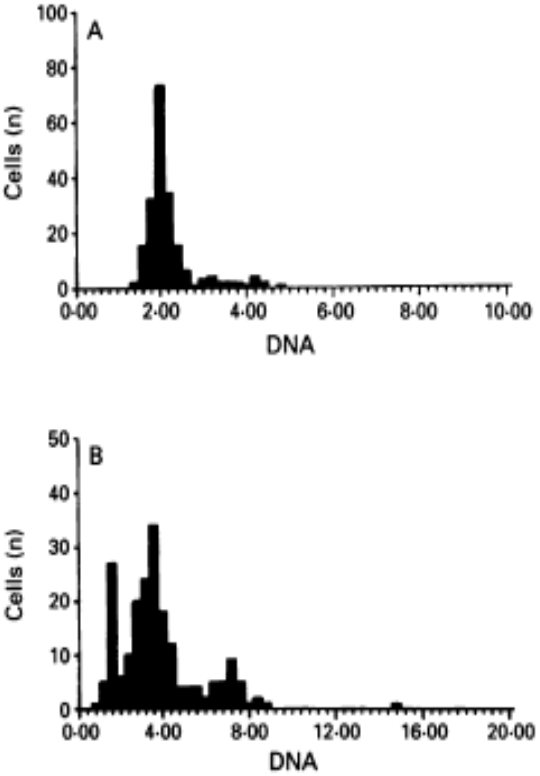

**شکل ۲.** *سلول‌های اپی‌تلیال معده*

هیستوگرام A بیانگر ازدیاد تکثیری با SPF بالا می‌باشد و در هیستوگرام B سلول‌ها دارای SPF کم می‌باشند.




**شکل ۳.** *هیستوگرام سلول‌های سرطانی با توزیع DNA آنوپلوییدی و پلی‌پلوییدی*

در برخی از سرطان‌های با میل تهاجمی زیاد مشاهده گردید.




**شکل ٤.** *هیستوگرام A سلول طبیعی معده و هیستوگرام B بیانگر سلول‌های آنوپلوییدی و پولی‌پلوییدی که در برخی از نمونه‌های با میل تهاجمی زیاد مشاهده گردید*

## بحث و نتیجه‌گیری

در یک مطالعه انجام شده بر روی ۱۷۷۸ بیمار مشخص شده است که بروز نوع منتشر سرطان معده با افزایش سن کم و نوع روده‌ای بعد از ۵۰ سالگی به‌طور زیادی افزایش می‌یابد (۱۴). در یک مطالعه دیگر مشاهده شده است که میزان مرگ‌ومیر و عوارض در سنین پیری (۶۹ تا ۹۰ سالگی ) و سنین کمتر از ۶۵ با هم تفاوتی ندارند و محققین به این نتیجه رسیدند که اگرمراقبت قبل و بعداز جراحی به‌صورت کامل و دقیق انجام شودجراحی معده محدودیت سنی ندارد (۱۵).

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، می‌توان مطرح کرد که اندازه‌گیری DNA-content و SPF می‌توانند در تعیین مرحله بیماری (pathological staging) استفاده شوند و از این راه با ضریب اطمینان بالاتری می‌توان نسبت به سیر بیماری اظهارنظر کرد. همچنین با توجه به اینکه سلول‌های سرطانی را از طریق بیوپسی اندوسکوپی نیز می‌توان تهیه کرد، با اندازه‌گیری و ردیابی میزان SPF و DNA-content سلول‌های سرطانی می‌توان نسبت به رفتار تومور و تهاجمی بودن و یا نبودن آن قضاوت کرد و براساس این یافته می‌توان انجام یک عمل جراحی گسترده را در دستور کار قرار داد و یا از انجام یک عمل جراحی همراه با مرگ‌ومیر و عوارض بالا و بدون تأثیر خودداری نمود .

نکته دیگر در این مطالعه، یافتن سلول‌های سرطانی در خارج از معده بود. در حالیکه با توجه به معاینات بالینی و بررسی‌های قبل از عمل و بر اساس مرحله‌بندی بالینی تصور می‌شد تومور محدود به معده است، تنها ۱۲ نفر از مجموع ۲۲ بیمار حاوی سلول‌های سرطانی در حفره پریتوان بودند که این مرحله‌بندی بیماری را تغییر داده و طرح درمانی را نیز تغییر داد.

در چرخه سلولی هرچه فاز سنتز، طولانی‌تر باشد احتمال تغییرات ژنتیک بیشتر می‌شود. در سلول‌های سرطانی نیز هر چه میل به تکثیر سلولی بیشتر (SPF بالاتر) باشد احتمالاً تغییرات آنوپلوییدی بیشتر به‌چشم می‌خورد. در مطالعه حاضر نیز درصد انوپلوییدی در سلول‌های سرطانی که ازSPF بالاتری برخوردار بودند نسبت به سلول‌های عادی، بیشتر بود و جالب اینکه بر خلاف مطالعات قبلی (۱۶،۱۷) این درصد تغییرات آنوپلوییدی ارتباطی با محل تومور نداشت.

## نتیجه‌گیری

با لاواژ مایع پریتوان قبل از انجام عمل جراحی و ردیابی سلول‌های سرطانی می‌توان مرحله‌بندی تومور را به‌طور دقیق‌تری بررسی کرد، به عبارتی در صورت مثبت بودن

مایع لاواژ از نظر سلول‌های سرطانی، تومور در یک مرحله بالاتر قرار می‌گیرد که باعث تغییر طرح درمانی می‌شود.

در صورتی که یافته‌های این مطالعه توسط مطالعات آینده و مراکز دیگر تأیید شود، در این صورت می‌توان توصیه کرد به‌دنبال تشخیص اندوسکوپیک بیماری، از نمونه بیوپسی جهت ردیابی DNA-aneuploidy وSPF نیز استفاده کرد. در صورتی که نمونه از این نظر مثبت بود، باید از طرح درمانی تهاجمی‌تری مثل برداشتن غدد لنفاوی همراه تومور و یا استفاده از داروهای شیمی درمانی قوی‌تر استفاده کرد تا میزان عود تومور و یا مرگ و میر ناشی ازآن کمتر شود.

**سپاسگزاری**

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی که حمایت مالی این طرح تحقیقاتی را بر عهده داشته‌اند، کارکنان زحمتکش اتاق عمل بیمارستان طالقانی به‌خصوص سرکار خانم اویسی و آقای احمدوند و سلیمانی جهت تهیه نمونه‌ها و واحد نانوتکنولوژی بیمارستان طالقانی تهران به‌دلیل نگهداری نمونه‌ها و واحد فلوسیتومتری دانشگاه علوم پزشکی ایران سپاسگزاری می‌شود.

## Evaluation of DNA-content of Peritoneal Lavage Cells by Flow Cytometry in Patients with Gasteric Cancer

**Dayani A.R., M.D.,[1*], Shahghasempour Sh., Ph.D.[2], Moghimi M., M.D.[3], Kamani F., M.D.[3], Seyed Ghafoori S., M.D.[4], Peyravi H., M.D.[5]**

1. Resident of General Surgery, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor of General Surgery, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Resident of Obstetrics & Gynecology, School of Medicine, Iran, University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Professor of General Surgery, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran..

* Corresponding author, e-mail: drahmaddayan@yahoo.com

(Received 22 Jan. 2009 Accepted 13 May 2009)

## Abstract

**Background & Aims:** Gastric cancer is the second common cancer in Iran and it has unfortunately no diagnostic signs in early stages. Considering the role of genetic and environmental factors in the development of gastric cancer, this study aimed at evaluating DNA-content of stomach cells in patients with gastric cancer in order to find a reliable index for prediction of disease prognosis and providing more exact therapeutic procedure.

**Methods:** A total of 22 samples taken from patients with gastric cancer were evaluated. Peritoneal lavage cells were centrifuged and stained with DNA-staining kit. Then DNA-content was analyzed and compared with that in normal cells by employing flow cytometry and using modfit software.

**Results:** In whole, 12 out of 22 samples were positive and DNA aneuploidy was present in 33.3%. SPF increase was observed in 22.2% of positive cases.

**Conclusion:** SPF can be used as a reliable indicator in pathological staging of cancer and consequently in decision making for treatment.

**Keywords:** DNA, Ploidy, Flow cytometry, Stomach neoplasms

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2009; 16(3): 225-232

## References


1. Dempsey D.T. Stomach. In: Andersen D.K., Billiar T.R., Dunn D.L., Hunter J.G., Pollock R.E (editors) Schwartz's principles of surgery. 8th ed., New York, McGraw Hill Co., 2005; 933-96.
2. Yamada T.T., Alpers D.H., Owyang C, Powel D.W., Silverstein F.E. Textbook of gastroenterology, 2nd ed., Philadelphia, LWW, 1995; pp1303-554.
3. Parkin D.M., Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993; 19; 54(4): 594-606.
4. Correa P, Cuello C, Fajardo L.F., Haenszel W, Bolaños O, de Ramírez B. Diet and gastric cancer: nutrition survey in a high-risk area. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70(4): 673-8.
5. Haenszel W, Correa P, Cuello C, Guzman N, Burbano LC, Lores H, Muñoz J. Gastric cancer in Colombia. II. Case-control epidemiologic study of precursor lesions. *J Natl Cancer Inst* 1976 57(5): 1021-61
6. Kneller R.W., You W.C., Chang Y.S., Liu W.D., Zhang L, Zhao L, Xu G.W., Fraumeni J.F. Jr, Blot W.J. Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(16):1261-6
7. Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, Fushida S, Kimura H, Ohoyama S, *et al.* Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991; 51(3): 1034-8.
8. Caygill C.P., Hill M.J., Kirkham J.S., Northfield T.C. Mortality from gastric cancer following gastric surgery for peptic ulcer. *Lancet* 1986; 1(8487): 929-31.
9. Devesa S.S., Blot W.J., Fraumeni J.F. Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83(10): 2049-53.
10. Lamberts R, Creutzfeldt W, Strüber H.G., Brunner G, Solcia E. Long-term omeprazole therapy in peptic ulcer disease: gastrin, endocrine cell growth, and gastritis. *Gastroenterology* 1993; 104(5): 1356-70.
11. Zinner M.J., Ashley S.W. Maingot's Abdominal operation. 11th ed., USA, McGraw Hill, 2007; pp997-1049.
12. Rubin R., Strayer D.S., Rubin's pathology 5th ed., Philadelphia, LWW, 2008; pp557-72.
13. Chen Liu & James M. Crawford The Gastrointestinal Tract.. Rubin's pathology 5th edition 2008;13:569
14. Hermanek P Hepatogastroentrology 1985; 81:747
15. Edelman D.S., Russin D.J., Wallack M.K. Gastric cancer in the elderly. *Am Surg* 1987; 53(3): 170-3.

16. Victorzon M, Roberts P.J., Haglund C, von Boguslawsky K, Nordling S. Ki-67 immunoreactivity, ploidy and S-phase fraction as prognostic factors in patients with gastric carcinoma. *Oncology* 1996; 53(3): 182-91.

17. Nanus D.M., Kelsen D.P., Niedzwiecki D, Chapman D, Brennan M, Cheng E, Melamed M. Flow cytometry as a predictive indicator in patients with operable gastric cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7(8): 1105-12.