

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**TOMISLAV IVANOVIĆ**

**POVEZANOST TUMORSKOG IMUNOG MIKROOKOLIŠA  
S PD-L1 STATUSOM OPERABILNOG KARCINOMA ŽELUCA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**TOMISLAV IVANOVIĆ**

**POVEZANOST TUMORSKOG IMUNOG MIKROOKOLIŠA  
S PD-L1 STATUSOM OPERABILNOG KARCINOMA ŽELUCA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2023.**

Rad je izrađen na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

**Voditeljica rada, mentorica:  
prof. dr. sc. Merica Glavina Durdov, dr. med.**

## ***Zahvala***

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Merici Glavina Durdov na motivaciji, potpori i ustrajnosti. Veliko hvala svim kolegama i suradnicima na njihovu značajnom doprinosu prilikom provedbe istraživanja i izrade ove disertacije.*

*Disertaciju posvećujem svojoj obitelji i zahvaljujem na strpljenju i bezgraničnoj podršci u mom kliničkom i znanstvenom radu kroz sve ove godine.*

## SADRŽAJ PREMA POGLAVLJIMA

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1.	Epidemiologija karcinoma želuca.....	2
1.2.	Vrste raka želuca.....	2
1.3.	Rizični čimbenici za razvoj karcinoma želuca.....	2
1.3.1.	Infekcija <i>Helicobacter pylori</i> .....	2
1.3.2.	Dijagnostika i liječenje infekcije <i>H.pylori</i> .....	4
1.3.3.	Drugi rizični čimbenici.....	5
1.4.	Prevenција karcinoma želuca.....	5
1.4.1.	Primarna prevencija.....	5
1.4.2.	Sekundarna prevencija.....	6
1.5.	Dijagnostika karcinoma želuca.....	7
1.5.1.	Klinička slika i laboratorijski nalazi.....	7
1.5.2.	Endoskopska i slikovna dijagnostika.....	7
1.6.	Klasifikacija karcinoma želuca.....	8
1.6.1.	Makroskopska, patohistološka i molekularna klasifikacija.....	8
1.6.2.	TNM klasifikacija.....	14
1.7.	Liječenje adenokarcinoma želuca.....	17
1.7.1.	Liječenje lokalno ograničene bolesti.....	17
1.7.2.	Liječenje lokoregionalne bolesti.....	18
1.7.3.	Liječenje uznapredovale ili metastatske bolesti.....	19
1.7.4.	Palijativna skrb.....	20
1.8.	Tumorski mikrookoliš i tumorska imunologija.....	20
1.8.1.	Proteini kontrolne točke.....	22
1.8.2.	Kontradiktorna uloga IFN- $\gamma$ u imunitetu.....	26
1.8.3.	Tumor-infiltrirajući makrofagi i Treg stanice.....	29
1.8.4.	Tumorski imuni mikrookoliš u adenokarcinomu želuca.....	29
1.8.5.	Imunoterapija karcinoma želuca.....	30
<b>2.</b>	<b>CILJEVI I HIPOTEZE</b> .....	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>METODE I ISPITANICI</b> .....	<b>35</b>
3.1.	Ustroj istraživanja.....	36
3.2.	Ispitanici.....	36

3.3.	Metode.....	37
3.3.1.	Imunohistokemija.....	37
3.3.2.	Imunoflorescencija.....	40
3.4.	Dijagram tijeka.....	41
3.5.	Statistička analiza podataka.....	43
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>45</b>
4.1.	Demografski i kliničko-patološki pokazatelji.....	46
4.2.	Povezanost između PD-L1 statusa tumora, T limfocita i makrofaga u adenokarcinomu želuca.....	48
4.3.	Povezanost između PD-L1 statusa tumora i praćenih varijabli.....	52
4.4.	Povezanost izražaja IFN- $\gamma$ u tumoru s kliničko-patološkim varijablama.....	55
4.5.	Povezanost gustoće makrofaga s IFN $\gamma$ /CTLA-4 u tumorskom mikrokolišu.....	57
4.6.	Povezanost izražaja EBV, MLH-1 I TP53 s PD-L1 statusom tumora.....	58
4.7.	Analiza općeg preživljenja.....	59
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>POPIS LITERATURE.....</b>	<b>76</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>88</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

APC	adenomatozna polipoza kolona, engl. <i>adenomatous polyposis coli</i>
ARID1A	AT-bogata interakcijska domena 1A, engl. <i>AT-Rich Interaction Domain 1A</i>
AuROC	površina ispod krivulje odnosa specifičnosti i osjetljivosti klasifikatora (engl. <i>area under the ROC curve</i> )
CagA	s citotoksinom povezan gen A, engl. <i>cytotoxin-associated gene A</i>
cag-PAI	cag-patogenični otok, engl. <i>cag-pathogenicity island</i>
CDH1	E-kadherin 1, engl. <i>E cadherin 1</i>
CIN	kromosomska nestabilnost, engl. <i>chromosomal instability</i>
CPS	kombinirani pozitivan skor, engl. <i>combined positive score</i>
CRPIA	konzervirano ponavljanje odgovorno za aktivnost neovisnu o fosforilaciji, engl. <i>conserved repeat responsible for phosphorylation-independent activity</i>
CTLA-4	antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom T, engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DCF	docetaksel, cisplatina i 5-fluorouracil, engl. <i>Docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil</i>
dMMR	nedostatak popravka neusklađenosti, engl. <i>mismatch repair deficiency</i>
EBV	Ebstein - Barr virus, engl. <i>Ebstein-Barr virus</i>
EG	ezofagogastrični, engl. <i>esophagogastric</i>
EGDS	ezofagogastroduodenoskopija, engl. <i>esophagogastroduodenoscopy</i>
EGFR	receptor epidermalnog čimbenika rasta, engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
EPIYA	Gutamin-Prolin-Izoleucin-Alanin motiv, engl. <i>Glutamine-Proline-Isoleucine-Tyrosine-Alanine</i>
ERAS	ubrzani oporavak nakon operativnog zahvata; engl. <i>enhanced recovery after surgery</i>
ERBB2	eritroblastični onkogen B, engl. <i>erythroblastic oncogene B</i>
ESGE	Europsko društvo za gastrointestinalnu endoskopiju, engl. <i>European society for gastrointestinal endoscopy</i>
ESMO	Europsko društvo za medicinsku onkologiju, engl. <i>European society for medical oncology</i>
EUS	endoskopski ultrazvuk, engl. <i>endoscopic ultrasound</i>
FDA	Agencija za hranu i lijekove, engl. <i>Food and drug administration</i>

FDG-PET-CT	fluorodeoksigluoza pozitron emisijska tomografija; engl. <i>fluorodeoxyglucose - positron emission tomography</i>
FGFR2	receptor čimbenika rasta fibroblasta 2, engl. <i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
FLOT	5-fluorouracil, leukovorin, oksaliplatina i docetaksel, engl. <i>5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and docetaxel</i>
GCAYA	Karcinom želuca kod adolescenata i mladih odraslih, engl. <i>Gastric cancer in adolescents and young adults</i>
GERB	gastroezofagealna refluksna bolest, engl. <i>gastroesophageal reflux disease</i>
GIST	gastrointestinalni stromalni tumor, engl. <i>gastrointestinal stromal tumor</i>
GLOBOCAN	globalna incidencija, mortalitet i prevalencija karcinoma, engl. <i>Global cancer incidence, mortality and prevalence</i>
GS	genomski stabilan, engl. <i>genomic stable</i>
GTP-aza	gvanozin trifosfat hidrolaza, engl. <i>guanosine triphosphate hydrolase</i>
HDI	ljudski indeks razvoja, engl. <i>human development index</i>
HER2	receptor ljudskog epidermalnog čimbenika rasta 2, engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	omjer opasnosti, engl. <i>hazard ratio</i>
Hsp-60	protein toplinskog šoka 60, engl. <i>heat shock protein 60</i>
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma, engl. <i>International agency for research on cancer</i>
IFN- $\gamma$	interferon gama, engl. <i>interferon gamma</i>
IHC	imunohistokemija, engl. <i>immunohistochemistry</i>
IL	interleukin, engl. <i>Interleukin</i>
IM	invazivna margina
IPP	inhibitor protonske pumpe, engl. <i>proton pump inhibitor, PPI</i>
JGCA	Japansko društvo za karcinom želuca, engl. <i>Japanese gastric cancer association</i>
LAG-3	gen-3 za aktivaciju limfocita, engl. <i>lymphocyte activation gene-3</i>
LČ	limfni čvor
MALT	limfatično tkivo povezano sa sluznicom, engl. <i>mucosa-associated lymphatic tissue</i>
MAPS	Liječenje prekanceroznih stanja i lezija želuca, engl. <i>Management of precancerous conditions and lesions in the stomach</i>
MET	mezenhimalna epitelna tranzicija, engl. <i>mesenchymal epithelial transition</i>
MHC	glavni kompleks tkivne snošljivosti, engl. <i>major histocompatibility complex</i>



MLH-1	MutL protein homolog 1
MSCT	višeslojna kompjuterizirana tomografija, engl. <i>multislice computed tomography</i>
MSI	mikrosatelitska nestabilnost, engl. <i>microsatellite instability</i>
NAP	čimbenik aktivacije neutrofila, engl. <i>neutrophil activating factor</i>
NF-κB	nuklearni faktor kapa B, engl. <i>nuclear factor kappa B</i>
NK	prirodne stanice ubojice, engl. <i>natural killer cells</i>
OS	opće preživljenje, engl. <i>overall survival</i>
PD-L1	programirani ligand stanične smrti 1, engl. <i>programmed death cell ligand 1</i>
PI3K/AKT	fosfatidilinozitol 3-kinaza/protein kinaza B, engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B</i>
PIK3CA	katalitička podjedinica alfa fosfatidilinozitol 3-kinaze, engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
PFS	preživljenje bez progresije, engl. <i>progression-free survival</i>
RHOA	član A RAS homologne obitelji, engl. <i>RAS homolog family member A</i>
RR	relativni rizik, engl. <i>relative risk</i>
S1	oralni kemoterapeutik, derivat fluoropirimidina, engl. <i>oral chemotherapeutic, fluoropyrimidine derivate</i>
SHP-2	Src homologna regija 2 koja sadrži protein tirozin fosfatazu-2, engl. <i>Src homology region 2 containing protein tyrosine phosphatase 2</i>
SISH	in situ hibridizacija sa srebrom, engl. <i>silver in situ hybridisation</i>
STK11	serin treonin kinaza 11, engl. <i>serine threonine kinase 11</i>
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija, engl. <i>World health organisation, WHO</i>
TCGA	Genomski atlas raka, engl. <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCR	receptor limfocita T, engl. <i>T cell receptor</i>
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta β, engl. <i>transforming growth factor β</i>
TI	tumorski infiltrat
TIM3	T-stanični imunoglobulin i molekula-3 koja sadrži mucinsku domenu, engl. <i>T-cell immunoglobulin and Mucin Domain Containing Molecule-3</i>
TME	tumorski mikrookoliš, engl. <i>tumor microenvironment</i>
TP53	tumor protein 53, engl. <i>Tumor protein 53</i>
VacA	vakuolizirajući citotoksin A, engl. <i>vacuolating cytotoxin A</i>
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta, engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>

## **1. UVOD**

## 1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA ŽELUCA

Od ukupno 193 zemlje na svijetu, u njih 112 rak je prvi ili drugi najčešći uzrok smrti osoba mlađih od 70 godina (1). Karcinom želuca je među vodećim vrstama raka po incidenciji i mortalitetu (2). Prema podacima GLOBOCAN-a (engl. *Global cancer incidence, mortality and prevalence*) za 2020. godinu, peti je po incidenciji s 1 089 103 novootkrivenih slučajeva, odnosno 5,6% od ukupnog broja karcinoma (3). Iako se zadnjih pedesetak godina učestalost karcinoma želuca smanjuje u razvijenim zemljama i zemljama povijesno visoke incidencije (Japan i Koreja), ostaje četvrti najčešći uzrok smrti uzrokovane rakom, sa 768 793 smrti godišnje, odnosno 7,7% od ukupnog broja umrlih od raka. Najveća regionalna incidencija je na Dalekom istoku i u istočnoj Europi, dok je u Sjevernoj Americi, Africi i sjevernoj Europi općenito niska (4). Incidencija u istočnoj Europi je 17,4 na 100 000 muškaraca i 7,1 na 100 000 žena.

U Republici Hrvatskoj je 2020. godine udio raka želuca među zloćudnim tumorima bio 4% za muškarce i 3% za žene (5). U dobno standardiziranoj stopi incidencija je 16,5 muškaraca na 100 000 muškaraca i 7,9 žena na 100 000 žena, a mortalitet 20%, odnosno 16%. Omjer mortaliteta i incidencije je 0,82. Dobno standardizirana stopa u Splitsko-dalmatinskoj županiji veća je od hrvatskog prosjeka (5).

Incidencija karcinoma želuca raste sa životnom dobi i doseže vrhunac između 55. i 80. godine života. U studiji GCAYA (engl. *Gastric Cancer in Adolescents and Young Adults*) analizirana je globalna incidencija u odraslih mlađih od 40 godina i adolescenata i iznosi 0,79 na 100 000, a mortalitet 0,45 na 100 000 (6). Omjer mortaliteta i incidencije je manji u skupini mlađih odraslih i adolescenata (0,61) u odnosu na skupinu u dobi 40 - 64 godine (0,65) te na skupinu stariju od 65 godina (0,75) (5). Ti su omjeri povezani s indeksom ljudskog razvoja (engl. *human development index, HDI*) jer se rak želuca češće javlja u osoba s nižim socio-ekonomskim statusom (5). Tri četvrtine svih slučajeva raka želuca dijagnosticirane su u azijskim zemljama, ponajviše u razvijenim regijama (7).

Morgan i suradnici su na temelju GLOBOCAN baze podataka iz 2020. godine aproksimirali incidenciju i mortalitet od karcinoma želuca za 2040. godinu ovisno o spolu, državi, regiji podrijetla i HDI-u (8). Prema njihovom izračunu, incidencija i mortalitet u 2040. godini povećat će se na 1,8 milijuna novih slučajeva i 1,3 milijuna smrtnih ishoda, što je 66% odnosno 71% više u odnosu na 2020. godinu. Autori su upozorili koje zemlje i regije imaju visok rizik i preporučili uvođenje strogih mjera primarne i sekundarne prevencije. Petogodišnje

preživljenje u razvijenim zapadnim zemljama i zemljama u razvoju je oko 20%. S druge strane, u Koreji i Japanu petogodišnje preživljenje je 67% odnosno 69%, zahvaljujući programima ranog otkrivanja i uporabi minuciozne endoskopske metode za dijagnostiku i liječenje ranog karcinoma želuca (9).

## **1.2. VRSTE RAKA ŽELUCA**

Rak želuca je u 90% slučajeva adenokarcinom podrijetla želučanih žlijezda koje luči sluz i želučani sok (10). Rjeđe vrste raka želuca su ekstranodalni ne-Hodgkinovi limfomi primjerice MALT limfom (engl. *mucose associated lymphatic tissue*) (4%), zatim karcinoid (3%) i gastrointestinalni stromalni tumor (GIST) (<1%) (10). Topografski se adenokarcinom želuca dijeli na karcinom kardije koji nastaje u blizini ezofagogastričnoga spoja i ne-kardijalni karcinom koji nastaje u distalnom dijelu želuca, a imaju različite epidemiološke i rizične čimbenike. Karcinom kardije ima značajno nižu incidenciju nego ne-kardijalni karcinom, 3,3 na 100 000 prema 8,8 na 100 000 (11).

## **1.3. RIZIČNI ČIMBENICI ZA RAZVOJ KARCINOMA ŽELUCA**

### **1.3.1. Infekcija *Helicobacter pylori***

Najvažniji rizični čimbenik u razvoju adenokarcinoma želuca je kolonizacija želučane sluznice bakterijom *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) kojom je zaraženo pola svjetske populacije; infekcija i rak međusobno se prate u geografskoj raspodjeli (12). Zarazna klica prenosi se oralno-oralno ili fekalno-oralno. Prevalencija infekcije je visoka u srednjoj i Južnoj Americi, dijelovima Azije i istočne Europe, a niska u Sjevernoj Americi, Australiji i zapadnoj Europi. Infekcija je povezana s razvojem 89% karcinoma distalnog želuca pa je zbog toga 1994. godine i 2009. godine *H. pylori* proglašen karcinogenom prvog reda (13).

*H. pylori* je Gram-negativni mikroaerofilni zavijeni bacil koji se održava u kiseloj želučanoj sredini modulacijom periplazmatskog pH pomoću ureaze i amonij hidroksida (14). *H. pylori* pomoću flagela dolazi do bazalnog sloja epitela želučanih jamica i veže se adhezivima za membranske receptore. Adhezini djeluju toksično i oštećuju sluznicu. Jedan od njih, NAP (engl. *neutrophil activating factor*) stimulira kisikove radikale iz neutrofila koji oštećuju tkivo i izaziva otpuštanje citokina koji okupljaju makrofage i neutrofile. Drugi adhezini, Hsp-60 (engl.

*heat shock protein 60*) stimulira makrofage na lučenje interleukina 8 (IL-8) koji potiče kemotaksiju granulocita i fagocitozu (14).

Bakterijski citotoksini CagA (engl. *cytotoxin-associated gene A*) i VacA (engl. *vacuolating cytotoxin A*) imaju centralnu ulogu u nastanku gastritisa, ulkusa i karcinoma. Prevalencija CagA pozitivnog *H. pylori* je na Zapadu 60% i u Aziji 90% (15). Molekularna „šprica“ koja injektira CagA u citoplazmu želučane epitelne stanice je tzv. cag-patogenični otok (kratica cag-PAI, od engl. *cag-pathogenicity island*). Translocirani CagA protein nalazi se s unutarnje strane stanične membrane na fosfatidilserinu i može mijenjati stanično signaliziranje. Fosforilirani CagA veže se na SHS-2 (Src homolognu regiju 2 koja sadrži protein tirozin fosfatazu-2, engl. *Src homology region 2 containing protein tyrosine phosphatase 2*) i utječe na staničnu adheziju i migraciju, preuređenje citoskeleta, staničnu proliferaciju i stimulaciju epitela na lučenje IL-8. Nefosforilirani CagA ima konzervirani motiv CRPIA (engl. *conserved repeat responsible for phosphorylation-independent activity*) za interakciju s aktiviranim receptorom za hepatocitni čimbenik rasta i na taj način trajno aktivira signalni put PI3K/AKT (fosfatidilinozitol 3-kinaza/protein kinaza B). Posljedica toga je proliferacija želučanog epitela u pro-inflamatornom mikrookolišu, nastanak kroničnog gastritisa i moguće karcinoma želuca preko aktivacije NF- $\kappa$ B i  $\beta$ -kateninskog signalnog puta i genskih mutacija (15). Na isti način u želučanu epitelnu stanicu ulazi VacA, ugrađuje se u staničnu membranu i kao anionski kanal propušta bikarbonate u stanicu, a otpušta metabolite potrebne *H. pylori*. VacA može invadirati endosome, endoplazmatski retikul, mitohondrije i izazvati apoptozu epitelne stanice (14,15).

Procjenjuje se da manje od 5% ljudi inficiranih s *H. pylori* dobije karcinom želuca, pri čemu je značajan utjecaj okolišnih čimbenika, životne dobi, genotipa domaćina i genotipa bakterije. *H. pylori* mijenja izražaj gena za popravak DNA i/ili interferira s aktivnostima popravka, što dovodi do genske nestabilnosti, nakupljanja mutacija, aktivacije onkogeni i deaktivacije tumor-supresorskih gena te posljedično rizika od razvoja karcinoma. Patohistološki se kancerogeneza može pratiti od intestinalne metaplazije preko displazije niskog i visokog stupnja do karcinoma.

Onkogeni potencijal *H. pylori* određen je snagom interakcije njegova onkoproteina CagA i SHP fosfataze na unutarnjoj strani membrane epitelne stanice (15). Mjesto za tirozinsku fosforilaciju, Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) ponavljajuća regija na C-terminalnom kraju CagA razlikuje se u zapadnom i istočnom tipu *H. pylori*. EPIYA-C motiv je jedinstven za zapadni

tip *H. pylori* i ima jednu do tri duplikacije. Povećanje EPIYA-C s jednog na dva povećava vezanje SHP2 s CagA za više od sto puta, što predstavlja rizični čimbenik za nastanak karcinoma (15).

### 1.3.2. Dijagnosticiranje i liječenje *H. pylori* infekcije

*H. pylori* je ubikvitarna infekcija uglavnom kod odraslih, ali se može naći u djece za koju su smjernice za dijagnostiku i liječenje posebno prilagođene (16,17). U odraslih se prisutnost *H. pylori* u želučanoj sluznici može dokazati neinvazivnim metodama (ureja izdisajni test, otkrivanje potutijela u serumu, imunokromatografski test u stolici) i invazivnim metodama (brzi test ureaze, biopat želučane sluznice). Najnovija metoda je kultiviranje bakterije i molekularna analiza sekvencionerom nove generacije.

Postoje različiti protokoli za eradikaciju *H. pylori* infekcije (18). To su: 1. trojna terapija (inhibitor protonske pumpe (IPP) + klaritromicin + amoksicilin 10 - 14 dana), 2. sekvencijska terapija (IPP + amoksicilin 7 dana, potom IPP + klaritromicin 7 dana), 3. konkomitantna terapija (IPP + amoksicilin + metronidazol + klaritromicin kroz 14 dana), 4. hibridna terapija kao modifikacija prethodne, a uz manje nuspojave, 5. četverostruka terapija temeljena na bizmutu (IPP + bizmut + metronidazol + tetraciklin 14 dana), 6. trostruka odnosno četverostruka terapija temeljena na fluorokinolonima (IPP + 1 evofloksacin + amoksicilin + bizmut 14 dana) (18). Prema Maastricht V kriterijima, u prvoj liniji preporuča se liječenje konkomitantnom, a u drugoj liniji četverostrukom bizmut terapijom, odnosno terapijom temeljenom na fluorokinolonima (18).

Izbor terapije ovisi o rezistenciji regionalnog soja *H. pylori* na antibiotike. Tonkić i suradnici utvrdili su visoku rezistenciju *H. pylori* na klaritromicin (21%) i nisku rezistenciju na metronidazol (10%) u Splitsko-dalmatinskoj županiji (19). U novije vrijeme teži se personaliziranom pristupu i liječenju protokolima s manjim brojem antibiotika radi sprečavanja razvoja rezistencije. Takav pristup zahtijeva ezofagogastroduodenoskopiju (EGDS) i biopsiju želučane sluznice, kultivaciju bakterije i određivanje osjetljivosti/rezistencije soja na antibiotike (19,20). S obzirom na moguće posljedice *H. pylori* infekcije, u slučaju pozitivnog nalaza uvijek treba provesti eradikacijsku terapiju i kontrolni test mjesec dana po završetku liječenja.

### 1.3.3. Drugi rizični čimbenici

Drugi rizični čimbenici za razvoj karcinoma želuca su infekcija virusom Epstein-Barr, autoimuni gastritis i Menetrierova bolest. EBV infekcija smatra se uzročnikom adenokarcinoma želuca u oko 10 % slučajeva (21). Čimbenici koji doprinose kancerogenezi su: gastritis, virusom izazvana imuna evazija, virusom izazvana hipermetilacija supresorskih gena i promjene u staničnom ciklusu. Hirabayasi i suradnici su u sustavnom pregledu analizirali 220 studija objavljenih od 1990. do 2021. godine s 68 000 adenokarcinoma želuca. Među njima je EBV pozitivni genotip bio zastupljen u 7,5% slučajeva, češće u muškaraca, u difuznom tipu i u proksimalnom dijelu želuca. Autori sugeriraju kako bi se učinkovitim cjepivom protiv EBV-a godišnje u svijetu moglo prevenirati 81 000 adenokarcinoma želuca (22).

Drugi rizični čimbenici za nastanak raka želuca su pušenje, prehrana bogata solju i crvenim mesom, izloženost ionizirajućem zračenju, niski socio-ekonomski status i slaba tjelesna aktivnost. Pretilost i gastroezofagealna refluksna bolest su rizični čimbenici za razvoj karcinoma kardije.

Zametna mutacija nekih gena povezana je s nasljednim tumorima želuca. To su geni *TP53* (Li-Fraumeni sindrom), *STK11* (Peutz-Jeghers sindrom), *APC* (familijalna adenomatozna polipoza), *MSI* (Lynch sindrom) i *CDHI* (nasljedni difuzni karcinom želuca) (10).

## 1.4. PREVENCIJA KARCINOMA ŽELUCA

### 1.4.1. Primarna prevencija

Primarna prevencija raka želuca obuhvaća otkrivanje i liječenje *H. pylori* infekcije, prestanak pušenja, smanjenje unosa soli i smanjenje unosa alkohola. Ostale mjere su smanjenje tjelesne mase, usvajanje zdravih životnih navika i liječenje gastroezofagealne refluksne bolesti. Cilj SZO je do 2025. godine smanjiti unos soli na manje od 5 g dnevno po osobi (12). U razvijenim zapadnim zemljama su incidencija i mortalitet od karcinoma želuca u padu zbog smanjenog unosa soli, povećanog unosa voća i svježeg povrća i primjerenog skladištenja hrane (12).

U nedavno objavljenj metaanalizi uspoređeni su rezultati šest randomiziranih kontroliranih studija koje su istraživale rizik razvoja karcinoma želuca u odraslih ispitanika s *H. pylori* infekcijom. U prvoj skupini su bili ispitanici s provedenom eradikacijskom terapijom,

a u dvije kontrolne skupine ispitanici liječeni placebom, odnosno neliječeni ispitanici. Rizik razvoja raka želuca je za 34 % niži kod ispitanika prve skupine (RR 0.66, 95% CI 0,46-0,95) u odnosu na kontrolne skupine. Iz navedenog proizlazi kako broj osoba koje je potrebno liječiti da bi se prevenirao jedan slučaj karcinoma želuca iznosi 124 (95% CI 78-843) (23).

Testiranje populacije na infekciju *H. pylori* uz provođenje eradikacijske terapije je učinkovita i isplativa metoda, osobito u područjima s visokom prevalencijom i u osoba starijih od 50 godina. Zemlje s visokom prevalencijom raka želuca poput Venezuele, Čilea, Koreje, Kine i Japana uvele su programe probira za rak želuca. U Republici Hrvatskoj ne postoji nacionalni program za otkrivanje i liječenje infekcije *H. pylori*, ali se u kliničkoj praksi nastoji postići eradikacija na razini primarne i sekundarne zdravstvene zaštite (24). Europske smjernice preporučuju liječenje *H. pylori* infekcije u bolesnika s atrofijom i/ili intestinalnom metaplazijom želučane sluznice te onih koji imaju bliske srodnike oboljele od raka želuca (25). U Azijsko-Pacifičkom konsenzusu o karcinomu želuca preporuča se probir i liječenje u regijama u kojima je incidencija infekcije veća od 20/100 000 (26).

#### **1.4.2. Sekundarna prevencija**

Sekundarna prevencija podrazumijeva EGDS s evaluacijom želučane sluznice i eventualnim uzimanjem biopsijskih uzoraka za patohistološku dijagnostiku u cilju otkrivanja želučanih prekanceroza, odnosno atrofičnog gastritisa, metaplazije ili displazije. Prema studiji temeljenoj na Nizozemskom patohistološkom registru, rizični čimbenik za razvoj karcinoma želuca je teška displazija kao inicijalna dijagnoza, s omjerom opasnosti (HR, engl. *hazard ratio*) 40,14 (95% CI: 32,2-50,1) (27).

Konvencionalna endoskopija nije uvijek dovoljna za procjenu atrofije i metaplazije. Endoskopija s poboljšanim slikovnim prikazom kao što je kromoendoskopija/endoskopija visoke rezolucije i povećanja, unaprijedila je preciznost endoskopije u dijagnostici prekanceroza želuca. U konvencionalnoj endoskopiji uzimaju se uzorci iz želučane incizure, antruma i korpusa s male i velike krivine te endoskopski vidljivih lezija (25,28). Smjernice Europskog društva za gastrointestinalnu endoskopiju (*ESGE, European society of gastrointestinal endoscopy*) pod nazivom MAPS (engl. *Management of precancerous conditions and lesions in the stomach*) objavljene su 2012., a revidirane i nadopunjene 2019. godine (25,28). Bolesnici s atrofičnim gastritisom i intestinalnom metaplazijom imaju visoki



rizik za razvoj adenokarcinoma želuca pa je u državama srednjeg i visokog rizika ekonomski opravdano rano otkrivanje i kliničko praćenje tih bolesnika (29).

## **1.5. DIJAGNOSTIKA KARCINOMA ŽELUCA**

### **1.5.1. Klinička slika i laboratorijski nalazi**

Budući da karcinom želuca nastaje na podlozi kronične upale, bolesnici mogu imati simptome u vidu žarenja i boli u žličici, osobito u ranoj fazi bolesti. U bolesnika s dispepsijom potrebno je ispitati postojanje alarmantnih simptoma kao što su mršavljenje, inapetencija, rana sitost, povraćanje, sideropenična anemija, znakovi gastrointestinalnog krvarenja, disfagija, odinofagija, pozitivna osobna ili obiteljska anamneza. Osobe s alarmantnim simptomima ili starije od 55 godina u vrijeme pojave simptoma treba uputiti na EGDS. Kasni znakovi bolesti su palpacija tvorbe u epigastriju, uvećani limfni čvorovi lijevo supraklavikularno (tzv. Virchowljev čvor), akantozna, ili neki od paraneoplastičnih sindroma. Laboratorijska obrada mora sadržavati kompletnu krvnu sliku i biokemijske pretrage.

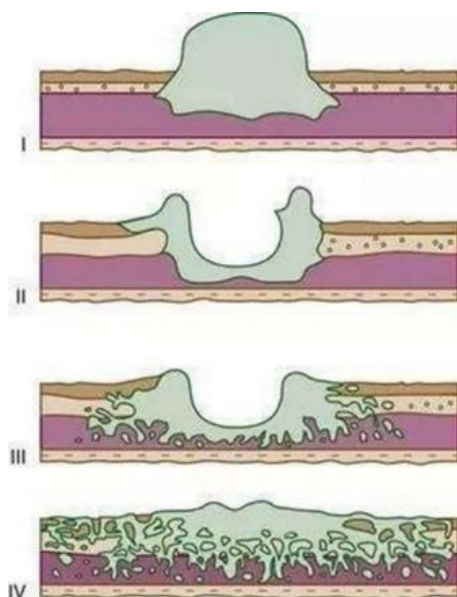
### **1.5.2. Endoskopska i slikovna dijagnostika**

U našoj zemlji su dijagnostičke smjernice za rak želuca objavljene 2018. godine (30). Potrebno je uraditi EGDS-u i biopsiju s uzimanjem 5 - 8 uzoraka tkiva za patohistološku analizu (31). Osjetljivost je 98% ako se uzme više uzoraka lezije (32). Za procjenu proširenosti bolesti rabi se endoskopski ultrazvuk (EUS) koji omogućava procjenu zahvaćenosti slojeva stijenke i perigastričnog masnog tkiva, što je važno pri planiranju endoskopskog liječenja. Također, ova pretraga omogućava evaluaciju okolnih limfnih čvorova i citološku aspiraciju/biopsiju. Kompjuteriziranom tomografijom prsnog koša, trbuha i zdjelice utvrđuje se lokalna i udaljena proširenost bolesti. Fluorodeoksiglukozna pozitron emisijska tomografija (FDG PET-CT) služi za otkrivanje zahvaćenih limfnih čvorova i metastatskih sjela te sumnje na povrat bolesti nakon kirurške resekcije. Laparoskopna dijagnostika je korisna kod sumnje na karcinomatozu potrbušnice (32).

## 1.6. KLASIFIKACIJA KARCINOMA ŽELUCA

### 1.6.1. Makroskopska, patohistološka i molekularna klasifikacija

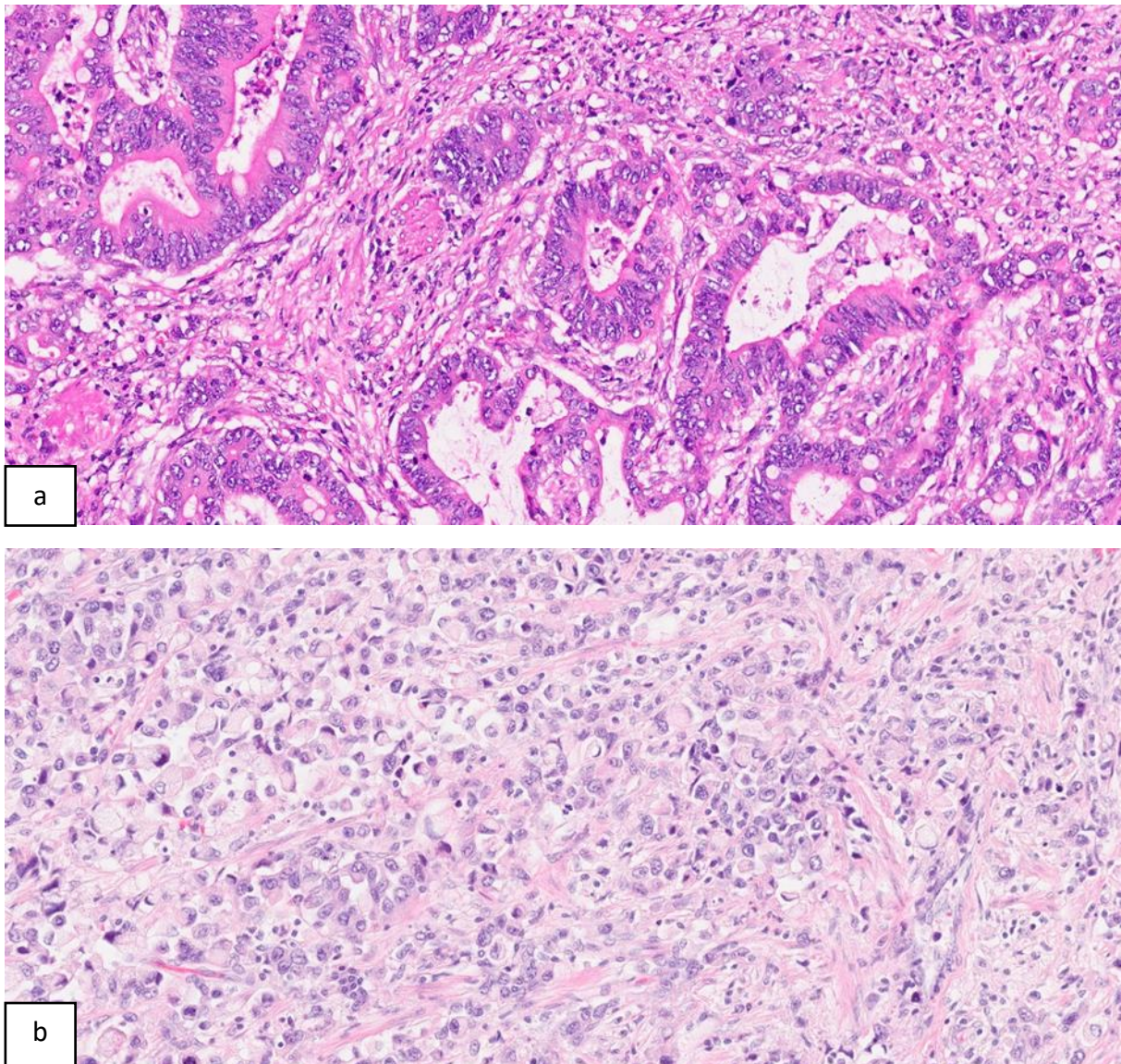
Prema Borrmannovoj klasifikaciji iz 1926. godine koja se i danas koristi, makroskopski se razlikuju četiri tipa adenokarcinoma želuca: polipoidni bez ulceracije (tip I), ulcerirani s izdignutim i oštrim rubovima (tip II), ulcero-infiltrativni (tip III) i difuzno infiltrativni (*lat. linitis plastica*) (tip IV) (Slika 1) (33).



**Slika 1.** Borrmannova klasifikacija adenokarcinoma želuca. *Izvor: Wang L, Wang X, Kou H, He H, Lu M, Zhou L, Yang Y. Comparing single oral contrast-enhanced ultrasonography and double contrast-enhanced ultrasonography in the preoperative Borrmann classification of advanced gastric cancer. Oncotarget. 2017;9:8716-24.*

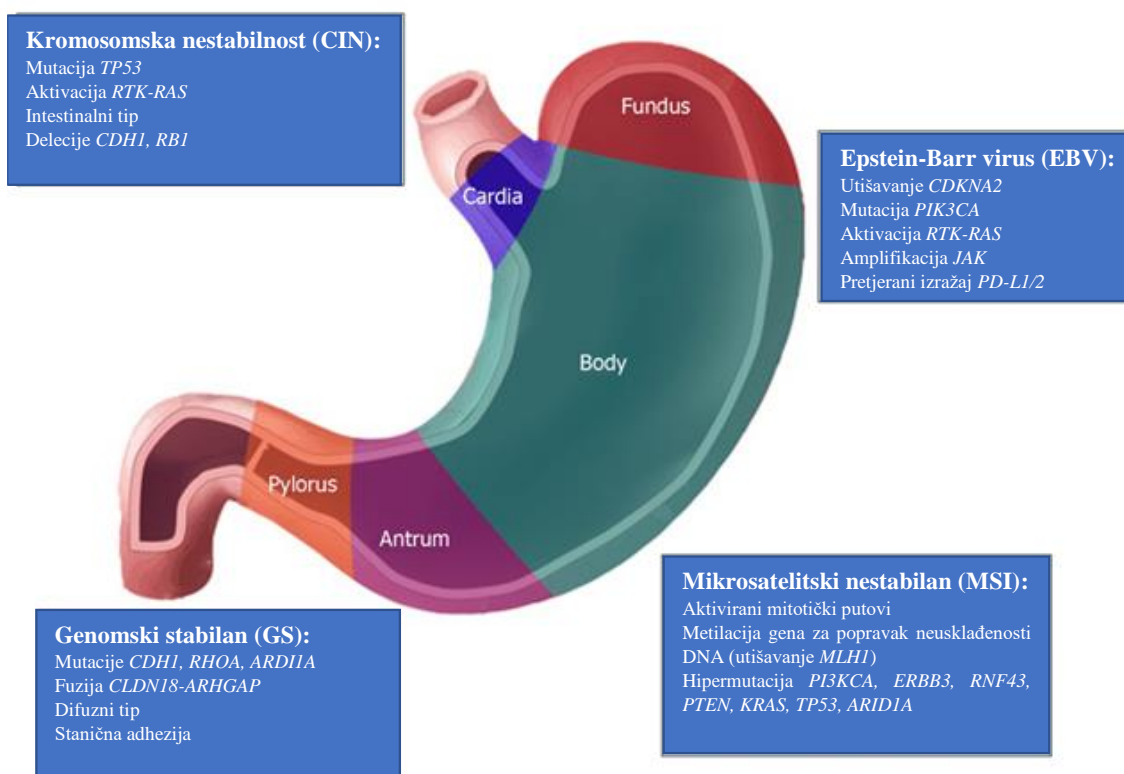
Prema klasifikaciji SZO iz 2010. godine histološki se razlikuju tubularni, papilarni, mucinozni, slabokohezivni i miješani tip adenokarcinoma želuca (10). S druge strane, najstarija i najjednostavnija histološka klasifikacija po Laurenu razlikuje intestinalni, difuzni i miješani tip (Slika 2). Intestinalni tip građen je od nepravilnih žlijezda obloženih atipičnim cilindričnim epitelom i okruženih stromom infiltriranom mononuklearima. Difuzni tip građen je od atipičnih

nediferenciranih epitelnih stanica ili stanica oblika prstena pečatnjaka u oskudnoj dezmplastičnoj stromi. U miješanom tipu nalaze se obje opisane histološke slike.



**Slika 2.** Histološki tipovi adenokarcinoma želuca prema Laurenju: intestinalni tip (a) i difuzni tip (b) (HE, 200x). Izvor: iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split

Prema Genomskom atlasu raka (TCGA, engl. *The Cancer Genome Atlas*) razlikuju se četiri molekularna genotipa karcinoma želuca: povezan s virusom Epstein-Barr (EBV+), visoko mikrosatelitski nestabilan (MSI-H), genomski stabilan (GS) i kromosomski nestabilan (CIN) (Slika 3) (34).

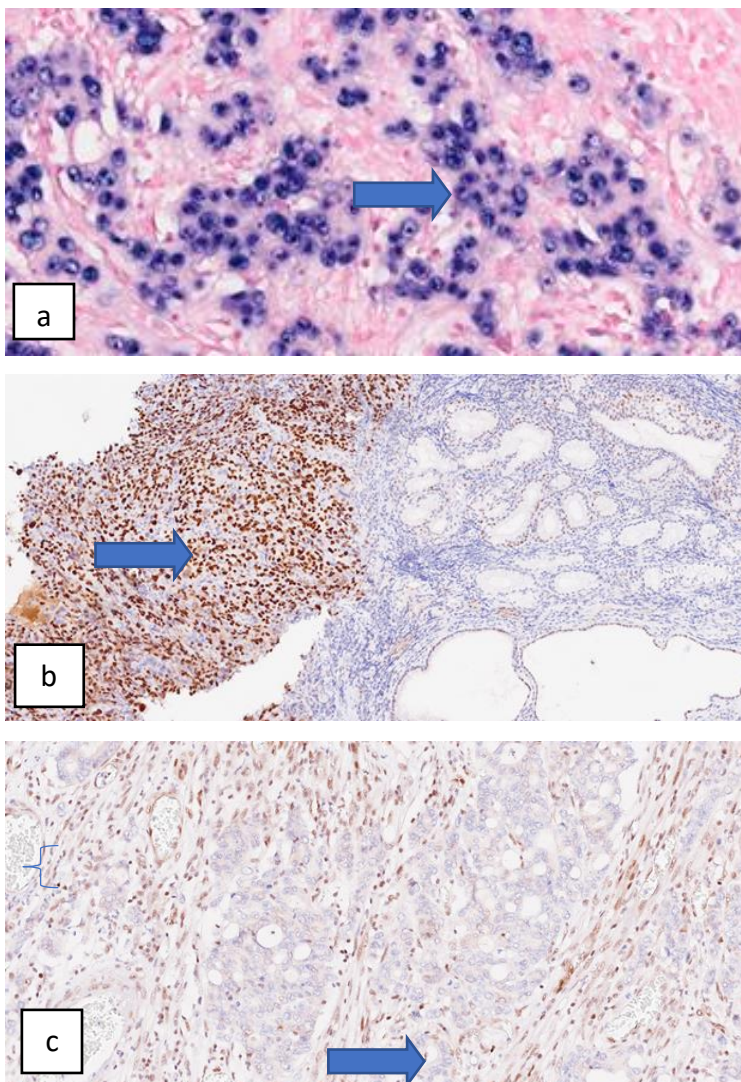


**Slika 3.** Genotipska klasifikacija adenokarcinoma želuca prema TCGA klasifikaciji.  
 Izvor: Bonelli P, Borrelli A, Tuccillo FM, Silvestro L, Palaia R, Buonaguro FM. *Precision medicine in gastric cancer. World J Gastrointest Oncol.* 2019; 11:804-29.

EBV+ karcinom želuca ima mutaciju katalitičke podjedinice alfa fosfatidilinozitol-4,5 bisfosfat 3-kinaze (*PIK3CA*, engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*) i interakcijske domene 1A hogate AT-om (*ARID1A*, engl. *AT-Rich Interaction Domain 1A*), hipermetilaciju genoma i amplifikaciju liganda-1 programirane stanične smrti (*PD-L1*, engl. *programmed death cell ligand 1*) (34). MSI-H karcinom želuca ima mutacije ili hipermetilaciju koja je globalna ili zahvaća promotore gena koji popravljaju DNA, kao MutL homolog 1 (*MLH-1*). GS karcinom želuca je obično difuznog tipa i sadrži mali broj genskih nepravilnosti, jedna od kojih je mutacija *RHOA* (engl. *RAS homolog family member A*) ili fuzija koja uključuje *RHO*-obitelj proteina aktiviranih gvanozin trifosfat hidrolazom. CIN adenokarcinom želuca je obično intestinalnog tipa i ima mnogo mutacija, kao što su amplifikacije gena za receptore tirozin kinaza, primjerice eritroblastičnog onkogen B (*ERBB2*, engl. *erythroblastic oncogene B*), receptora epidermalnog čimbenika rasta (*EGFR*, engl. *epidermal growth factor receptor*), receptora mezenhimalne epitelne tranzicije (*MET*,

engl. *mesenchimal epithelial transition*) te receptora za čimbenik rasta fibroblasta 2 (FGFR2, engl. *fibroblast growth factor receptor 2*) (34).

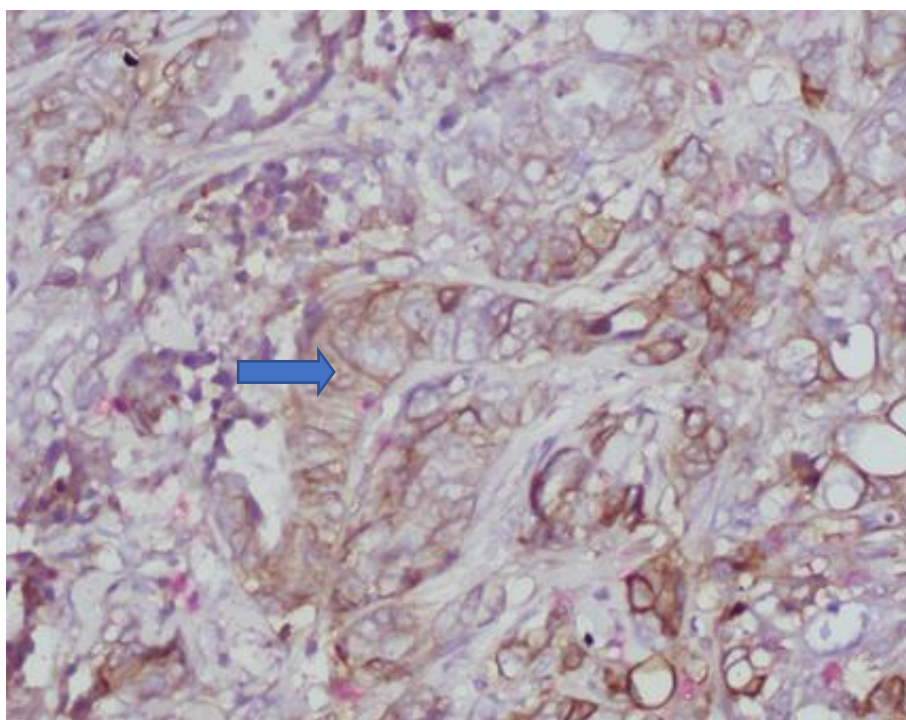
Klasifikacija klinički relevantnih molekularnih tipova dijeli karcinom želuca na mikrosatelitski nestabilne, mikrosatelitski stabilne s epitelno-mezenhimalnim genskim potpisom, mikrosatelitski stabilne s aktivnim proteinom TP53 i mikrosatelitski stabilne s mutiranim proteinom TP53 (35). Imunohistokemija (MLH-1 i drugih MSI proteina), TP53, E-kaderina i in situ hibridizacija *EBER* (EBV-kodiranih malih RNA) omogućava genogenično subtipiziranje adenokarcinoma želuca, slično TCGA klasifikaciji (Slika 4) (36).



**Slika 4.** Imunohistokemijsko molekularno subtipiziranje u adenokarcinomu želuca. a) in situ hibridizacija s *EBER* za dokaz EBV+ genotipa; b) mutacija TP53 karakteristična za GS genotip; c) nedostatak izražaja MSH1 u tumorskim stanicama kod MSI-H genotipa. (b i c IHK/HRP,

povećanje 100x). *Izvor: iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split*

Lokalno uznapredovali, metastatski ili recidivirajući karcinom želuca može se liječiti trastuzumabom ako se imunohistokemijski i in situ hibridizacijom dokaže amplifikacija receptora za humani epidermalni čimbenik rasta-2 (*HER2*, engl. *human epidermal growth factor receptor-2*) (Slika 5). Her-2 amplifikacija se može naći u 10% - 20% slučajeva, a prevalencija je veća u proksimalnom karcinomu želuca i kod intestinalnog tipa (37). U bolesnika s lokalno uznapredovalim i neoperabilnim ili metastatskim tumorom, dMRD (nedostatak popravka neusklađenosti, engl. *mismatch repair deficiency*), odnosno MSI-H status je pogodan za imunoterapiju blokatorima kontrolne točke (38).



**Slika 5.** Pozitivan membranski izražaj HER2 u adenokarcinomu želuca. (Her-2/HRP, 400x)  
*Izvor: iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split*

U novije vrijeme radi se procjena izražaja PD-L1 u biopsiji adenokarcinoma želuca radi eventualne imunoterapije blokatorima kontrolnih točaka (39). Jedan od načina je kombinirani pozitivni skor (engl. *combined positive score, CPS*) koji označava postotak pozitivnih tumorskih i imunskih stanica na ukupni broj tumorskih stanica.  $CPS \geq 1\%$  se smatra pozitivnim izražajem pa je tako prevalencija PD-L1 pozitivnih karcinoma veća od 50 %.

### 1.6.2. TNM klasifikacija

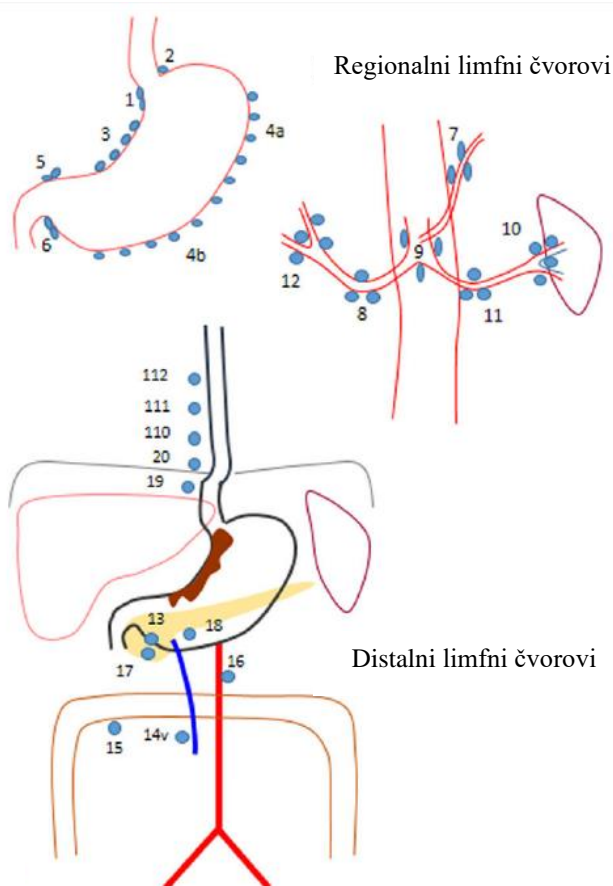
Klinički se proširenost zloćudnog tumora kategorizira prema TNM klasifikaciji (Tablica 1) (31,40). Rani rak želuca zahvaća sluznicu i podsluznicu (T1), a uznapredovali rak dublje slojeve stijenke (T2, T3 i T4).

**Tablica 1.** TNM klasifikacija karcinoma želuca prema 8. izdanju AJCC/IUCC (engl. *American Joint Committee on Cancer; IUCC: International Union for Cancer Control*)

TNM	
<b>T1a</b>	Tumor zahvaća laminu propriju ili muscularis mucosae
<b>T1b</b>	Tumor zahvaća podsluznicu
<b>T2</b>	Tumor invadira mišićni sloj
<b>T3</b>	Tumor prodire subserozno vezivo
<b>T4a</b>	Tumor prodire u serozu (visceralni peritoneum)
<b>T4b</b>	Tumor zahvaća susjedne strukture (slezena, poprečno debelo crijevo, jetra, ošit, gušterača, trbušna stijenka, nadbubrežna žlijezda, bubreg, crijeva i retroperitoneum)
<b>N0</b>	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
<b>N1</b>	metastaze u 1 - 2 regionalna limfna čvora
<b>N2</b>	metastaze u 3 - 6 regionalnih limfnih čvorova
<b>N3</b>	metastaze u $\geq 7$ regionalnih limfnih čvorova
<b>N3a</b>	metastaze u 7 - 15 regionalnih limfnih čvorova
<b>N3b</b>	metastaze u $\geq 16$ regionalnih limfnih čvorova
<b>M0</b>	nema udaljenih metastaza
<b>M1</b>	udaljene metastaze koje zahvaćaju udaljene čvorove, neizravno širenje u druge organe ili peritonealno

T: tumor, N: limfni čvor; M: metastaza

Limfogeni put širenja može se patohistološki naći u 74 - 88% bolesnika s adenokarcinomom želuca i čak u 14% bolesnika u kojih je bolest ograničena na sluznicu (41,42). Tri najčešće regije lokalne propagacije su područje male krivine (regija 3), velike krivine (regija 4) i lijeve gastične arterije (regija 7) (41). Slika 6. prikazuje podjelu limfnih čvorova koji su mjesta lokalne ili udaljene propagacije bolesti, prema smjernicama Japanskog društva za karcinom želuca (engl. *Japanese Gastric Cancer Association, JGCA*) (41,43).



**Slika 6.** Grafički prikaz skupina limfnih čvorova u adenokarcinomu želuca: regionalni perigastrični (regije 1 - 6) i ekstraperigastrični (7 - 12) te udaljeni (regije 13 - 20, 110 - 112). Ako rak prodire u jednjak, regije 19, 20, 110 i 111 smatraju se regionalnima. *Izvor: López Sala P, Leturia Etxeberria M, Inchausti Iguñiz E, Astiazaran Rodríguez A, Aguirre Oteiza MI i sur. Gastric adenocarcinoma: A review of the TNM classification system and ways of spreading. Radiologia. 2023; 65:66-80.*



Adenokarcinom želuca može kontinuirano invadirati perigastrično masno tkivo i susjedne organe, širiti se između slojeva potrbušnice, duž arterija, vena i živaca i po trbušnoj šupljini. Moguća je izravna invazija ekstramuralnih perigastričnih vena. Polovina bolesnika s infiltracijom mišićnice imaju zahvaćenu potrbušnicu. Bilateralno masivno zahvaćanje jajnika (tzv. Krukenberg tumor) nastaje zbog transperitonealnog ili hematogenog širenja raka. U hematogenom širenju jetra je najčešće metastatsko sjelo.

Podjela stadija adenokarcinoma želuca temelji se na 8. izdanju smjernica AJCC/IUCC iz 2017. godine (Tablica 2) (31,40).

**Tablica 2.** Stadiji proširenosti karcinoma želuca prema 8. izdanju AJCC/IUCC

Stadij	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3a	M0
IIIA	T4b	N0	M0
	T4a	N1-2	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3a	M0
IIIB	T4b	N1-2	M0
	T3-4a	N3a	M0
	T1-2	N3b	M0
IIIC	T4b	N3a-3b	M0
	T3-4a	N3b	M0
IV	bilo koji T	bilo koji N	M1

T: tumor, N: limfni čvor, M: metastaza

## **1.7. LIJEČENJE ADENOKARCINOMA ŽELUCA**

U liječenju svakog bolesnika s karcinomom želuca važan je multidisciplinarni tim u kojem surađuju abdominalni kirurg, gastroenterolog, onkolog, patolog, radiolog i nutricionist (44). Europske smjernice razlikuju se od američkih i smjernica istočnoazijskih zemalja (45). Razlog je drugačija incidencija raka želuca u Europi, manje petogodišnje preživljenje (globalno 20%, Koreja i Japan 65-71,5%), slabiji resursi i manje razvijena tehnologija. Istočnoazijske zemlje su zbog visoke incidencije karcinoma želuca razvile dobre programe ranog otkrivanja karcinoma i naprednih tehnika endoskopskog liječenja, zbog čega su njihovi protokoli primarno usmjereni na endoskopsku i kiruršku resekciju, a manje na sistemsko liječenje (46).

### **1.7.1. Liječenje lokalno ograničene bolesti**

Kod bolesnika sa stadijem IA preporuča se endoskopsko liječenje ili kirurška resekcija (31). Endoskopski pristup izvodi se u centrima izvrsnosti, u bolesnika kod kojih je tumor ograničen na sluznicu, dobro diferenciran (G1-2), <2 cm i bez ulceracije. Metode su endoskopska mukozna resekcija (EMR) i endoskopska submukozna disekcija (ESD) (47). EMR je indicirana kod diskretnih lezija želuca s patohistološki verificiranom displazijom. Kod većih lezija i displazije visokog stupnja preporuča se ESD. Taj zahvat duže traje i povezan je s trostruko većim rizikom perforacije u odnosu na EMR, ali je veći postotak resekcije u bloku s čistim rubovima, veća mogućnost kompletne i kurativne resekcije i manji rizik recidiva (47). Kontrolna endoskopija nakon kurativne resekcije preporuča se nakon 3 - 6 mjeseci i potom jednom godišnje.

Ako bolesnik sa stadijem bolesti 1A nije kandidat za endoskopsko liječenje, indicirana je kirurška resekcija s limfadenektomijom perigastričnih limfnih čvorova i limfnih čvorova uz lijevu gastričnu arteriju (regije 1-7, tzv. „D1“ ) ili D1+ limfadenektomija koja dodatno uključuje i regionalne limfne čvorove (regije 8,9,11) s varijacijom ovisno o lokalizaciji tumora (31).

### 1.7.2. Liječenje lokoregionalne bolesti

Bolesnicima s IB-III stadijem bolesti preporuča se neoadjuvantna kemoterapija, radikalna gastrektomija/D2 limfadenektomija i adjuvantna kemoterapija (31). Kirurške metode u operaciji karcinoma želuca s vremenom se mijenjaju. Davne 1881. godine je učinjena prva gastrektomija, 1994. prva laparoscopska gastrektomija, a 2003. prva robotski asistirana gastrektomija. Uz klasičnu laparotomiju, laparoscopska resekcija želuca i robotska kirurgija su metode izbora za bolesnike u I. stadiju prema Japanskim smjernicama za liječenje karcinoma želuca (46). U Istočnoj Aziji u tijeku je nekoliko randomiziranih kliničkih studija s ciljem uvrštenja laparoscopske kirurgije i robotike u liječenje lokalno uznapredovalog karcinoma želuca. Izbor metode primarno ovisi o njejoj dostupnosti i iskustvu kirurškog tima/centra u cilju najbolje moguće skrbi za svakog bolesnika.

Prema smjernicama Europskog onkološkog društva (ESMO, engl. *European association for medical oncology*) zadovoljavajući proksimalni resekcijski rub je  $\geq 3$ cm za tumore ekspanzivnog rasta i intestinalnog tipa, a  $\geq 5$ cm za tumore infiltrativnog rasta (31). Ukoliko navedeni zahtjevi udovoljavaju, može se izvršiti subtotalna gastrektomija. D2 limfadenektomija je kompletno odstranjenje svih regionalnih limfnih čvorova u totalnoj gastrektomiji, a regije 1, 3 - 7, 8, 9, 11 i 12 u subtotalnoj gastrektomiji (48).

Limfadenektomija je izuzetno važna jer je limfatičko širenje primarni način diseminacije karcinoma i najvažniji postoperativni prognostički čimbenik. Prema hrvatskim smjernicama i smjernicama drugih zemalja minimalno treba izolirati 15 - 16 limfnih čvorova (48).

Osim operativnog zahvata, važna je primjena protokola za ubrzani oporavak nakon operacije (engl. *enhanced recovery after surgery, ERAS*). Cilj protokola je smanjenje kirurškog stresa i disfunkcije organa, a kvalitetna primjena smanjuje udio postoperativnih komplikacija, ubrzava oporavak bolesnika i skraćuje hospitalizaciju (49).

Kemoterapija se zasniva na trojnoj terapiji DCF (fluoropirimidin, derivat platine i docetaksel), odnosno tzv. FLOT režimu 5-fluorouracil+leukovorin+oksaliplatina+docetaksel) i primjenjuje 2 - 3 mjeseca prije i poslije operacije. Ako bolesnik ne podnosi trojnu terapiju, alternativno se može dati kombinacija fluoropirimidina i cisplatine ili oksaliplatine (31). Ako nije primao neoadjuvantnu kemoterapiju, indicirana je adjuvantna dvojnja kemoterapija (fluoropirimidin+oksaliplatina ili docetaksel) kroz 6 mjeseci. U MSI-H adenokarcinomu želuca

nije indicirana neoadjuvantna kemoterapija, osim za spuštanje stadija (engl. *downstaging*) prije operativnog zahvata kad se primjenjuje FLOT režim (31).

Klinička studija faze III iz 2006. godine provedena u SAD-u i Europi na 445 bolesnika s karcinomom želuca pokazala je superiornost DCF terapije u odnosu na dvojni terapiju bez docetaksela jer su ispitanici bili duže vrijeme bez progresije bolesti (50). Japanska studija o usporedbi trojne (docetaksel+cisplatina+S-1) u odnosu na dvojni (S-1+cisplatina) na 741 ispitaniku nije pokazala poboljšanje u preživljenju, a imala je značajno veći udio nuspojava (51). Zato je dvojni terapija ostala vodećekia preporuka u japanskim smjernicama, makar je studija bila kritizirana zbog neodgovarajućeg režima doziranja. U bolesnika s operiranim lokalno uznapredovalim karcinomom želuca često se događa lokoregionalni recidiv, ali su ipak udaljene metastaze primarni uzrok neuspjeha liječenja.

Opsežna limfadenektomija je tehnički zahtjevana, a složena limfatična mreža u sluznici i podsluznici često rano zahvaćena mikrometastazama karcinoma želuca. U nekoliko randomiziranih kliničkih studija ispitivana je učinkovitost perioperativne radioterapije radi smanjenja učestalosti lokoregionalnog recidiva, a imajući u vidu da moderna radioterapija ima manje štetan utjecaj na okolne organe osjetljive na ionizirajuće zračenje. Rezultati studija pokazali su vrlo ograničenu korist adjuvantne radioterapije u bolesnika s radikalnom resekcijom i D2 limfadenektomijom i perioperativnom kemoterapijom (52). Postoperativna kemoradioterapija može se razmotriti u bolesnika koji nisu primali neoadjuvantnu kemoterapiju i kojima nije učinjena D2 limfadenektomija te u slučajevima pozitivnog resekcijskog ruba (31).

### **1.7.3. Liječenje uznapredovale ili metastatske bolesti**

Studije su pokazale pozitivan učinak kemoterapije kod bolesnika s uznapredovalim adenokarcinomom želuca (53). U prvoj liniji preporuča se kombinacija derivata platine (cisplatina, oksaliplatina) i fluoropirimidina (npr. 5-fluorouracil ili kapecitabin). Oksaliplatinu bolesnici bolje podnose, osobito stariji od 65 godina. Ako bolesnik slabije podnosi derivate platine, preporuča se kombinacija 5-fluorouracila i irinotekana (31).

Kod HER2-pozitivnog adenokarcinoma želuca kemoterapiji se dodaje trastuzumab, a kod adenokarcinoma s pozitivnim PD-L1 statusom (CPS  $\geq$ 5) nivolumab (31,54). Pembrolizumab je indiciran kod bolesnika s adenokarcinom jednjaka/gastroezofagealnog spoja i pozitivnim PD-L1 statusom (CPS  $\geq$ 10) (31). Kod bolesnika s metastatskom bolešću

gastrektomija se provodi isključivo palijativno. Metastazektomija dolazi u obzir kod bolesnika s oligometastatskom bolesti i dobrim odgovorom na kemoterapiju.

#### **1.7.4. Palijativna skrb**

Palijativna skrb poboljšava kvalitetu života bolesnika i njegove obitelji kroz prevenciju i smanjenje boli i pomoć u prehrani, psihičkim i psihosocijalnim potrebama (55). Najčešći simptomi bolesnika s uznapredovalim adenokarcinomom želuca su mučnina, povraćanje, inapetencija, mršavljenje, bolovi u trbuhu i krvarenje. Krvarenje se liječi endoskopskom intervencijom, radioaktivnim zračenjem, transarterijskom embolizacijom, kemoterapijom i kirurški. Opstrukcija se rješava endoskopski postavljanjem stenta ili kirurškom resekcijom, postavljanjem gastrojejunostome, formiranjem prenosnice s tankim ili debelim crijevom i formiranjem ileostome ili kolostome. Može se primijeniti laparoscopska hipertermička intraperitonealna kemoterapija ili intravenska kemoterapija da se izbjegnu ponavljane paracenteze acitesa.

### **1.8. TUMORSKI IMUNI MIKROOKOLIŠ I IMUNOTERAPIJA**

Tumorski mikrookoliš (TME, engl. *tumor microenvironment*) je neposredno okruženje tumorskih stanica koje tvore izvanstanični matriks, krvne žile, fibroblasti i imunosne stanice - neutrofil, makrofagi, dendritičke stanice, B limfociti i različiti tipovi T limfocita (56,57). Tumorske stanice su u neprestanoj interakciji s mikrookolišem koji podržava njihov rast i preživljavanje, invaziju i metastatsko širenje te je aktivni promotor napredovanja raka. Tumorski mikrookoliš može sadržavati veliku količinu dezmodoplastičnog veziva što otežava prodor lijekova ili biti dobro vaskulariziran i tumorskim stanicama lako stižu hranjive tvari, ali i protutumorski lijekovi. Prisutnost imunosnih stanica u tumorskom mikrookolišu upućuje na eventualnu korist primjene imunoterapije pa na njih treba usmjeriti fokus protutumorskog djelovanja.

Tumorske stanice su transformirane stanice koje su izbjegle mehanizme regulacije rasta, neobuzdano se i autonomno dijele u klon koji predstavlja kliničku neoplazmu (58). Spontano nastale tumorske stanice uopće nisu ili su pak vrlo slabo imunogenične, za razliku od virusom induciranih tumorskih stanica koje izazivaju imunoreakciju. Tumorski antigeni, peptidi nastali

preradom tumorskih proteina kojih nema u normalnim stanicama istog tkiva, predstavljaju cilj antitumorske imunoreakcije. Tumor-specifični antigeni se ne nalaze u normalnim stanicama, a tumoru-pridruženi antigeni mogu se naći u embrionalnim stanicama, u virusnoj infekciji ili u normalnim stanicama u vrlo niskoj koncentraciji (58).

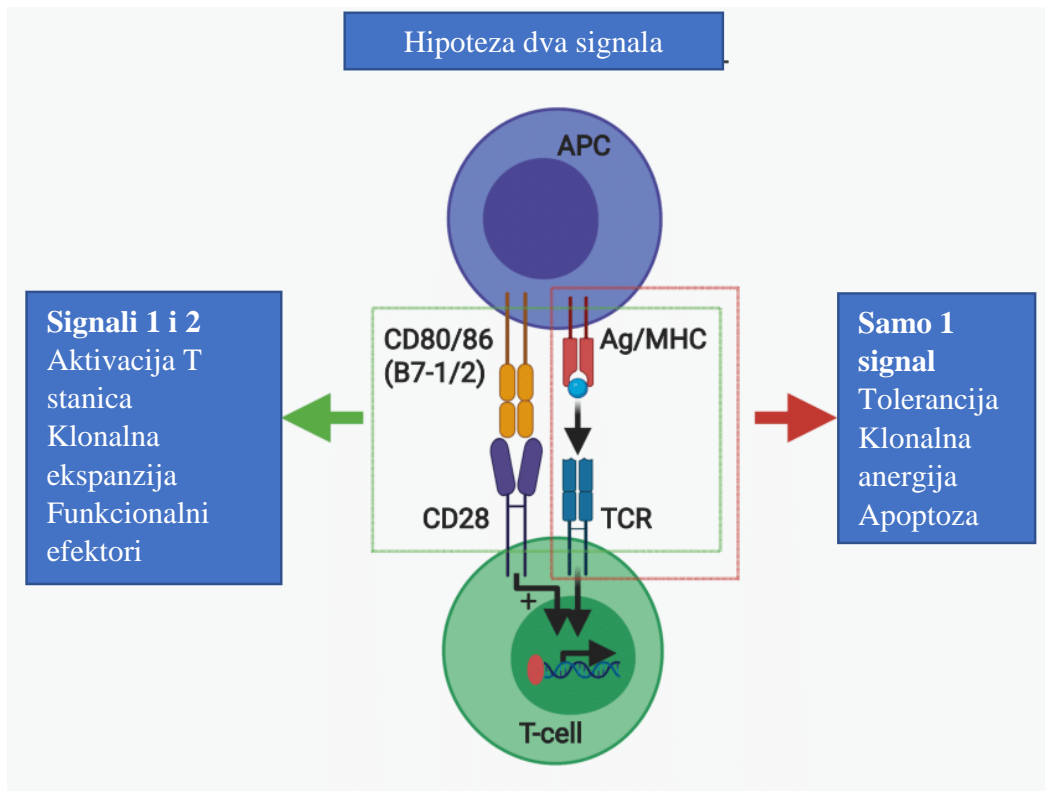
Tumorski antigeni nalaze se na staničnoj membrani, u stanici ili ih tumorske stanice otpuštaju u okoliš. Najvažniji su antigeni na površini tumorskih stanica jer mogu potaknuti imunosno odbacivanje tumora. Dio tumorskih stanica neprestano podliježe apoptozi, a apoptotička tjelešca sadrže tumorske antigene. Makrofagi fagocitiraju apoptotična tjelešca, prerađuju tumorske antigene i predočavaju ih specifičnim T limfocitima.

Infiltracija tumora limfocitima, makrofagima i plazma stanicama odražava postojanje specifične imunoreakcije na tumor. Citotoksični T limfociti prepoznaju tumorske antigene spregnute uz glavni kompleks tkivne snošljivosti I (engl. *major histocompatibility complex* MHC I), a pomoćnički limfociti T spregnute uz MHC II i pri tom otpuštaju citokine koji organiziraju imuni odgovor (58). U tumorima manje značajna humoralna imunost temelji se na vezivanju protutijela specifičnih B limfocita s tumorskom stanicom što je čini podložnom lizi posredovanoj NK stanicama ili makrofagima koji prepoznaju Fc fragment imunoglobulina. NK stanice mogu uništiti tumorske stanice sa slabo izraženim MHC I bez prethodne senzibilizacije, a njihovu aktivnost potiču interferoni i IL-2 (58).

Tumor izmiče imunosnoj obrani zbog više razloga (54). Tumorski antigeni su slabo imunogenični, na tumorskim stanicama su molekule MHC I razreda slabo izražene, mehanizmom imunoselekcije propadaju osjetljive i prevladavaju otporne tumorske stanice, tumorski antigen se modulira tako da reverzibilno nestaje s površine stanice ili ga glikokaliks maskira; s druge, imunosne strane može nedostajati kostimulacijski signal za aktivaciju specifičnog T limfocita. U međudnosu transformirane stanice i imunosnog nadzora inicijalno je premalen broj tumorskih stanica za stimuliranje imunosnog sustava, a kad broj tumorskih stanica postane dovoljan za odgovarajuću imunoreakciju, tumor je već stvoren. Stanje ravnoteže traje sve dok najagresivniji klon vlastitim imunouređenjem (engl. *immunoediting*) ne postigne evaziju (izbjegavanje) specifičnih T limfocita u mikrokolišu.

Za aktivaciju i proliferaciju specifičnih T limfocita potrebna su dva signala (58). Jedan je preko T staničnog receptora (TCR, engl. *T cell receptor*) koji se veže na antigen predočen uz MHC I ili II na antigen prezentirajućoj stanici (APC, engl. *antigen presenting cell*). Drugi kostimulacijski signal je rezultat interakcije transmembranskih proteina B7-1 (CD 80) i B7-

2(CD 86) na antigen prezentirajućoj stanici s CD28 na T limfocitu (58). Ako kostimulacijski signal izostane, umjesto aktivacije slijedi anergija specifičnog T limfocita (Slika 7).



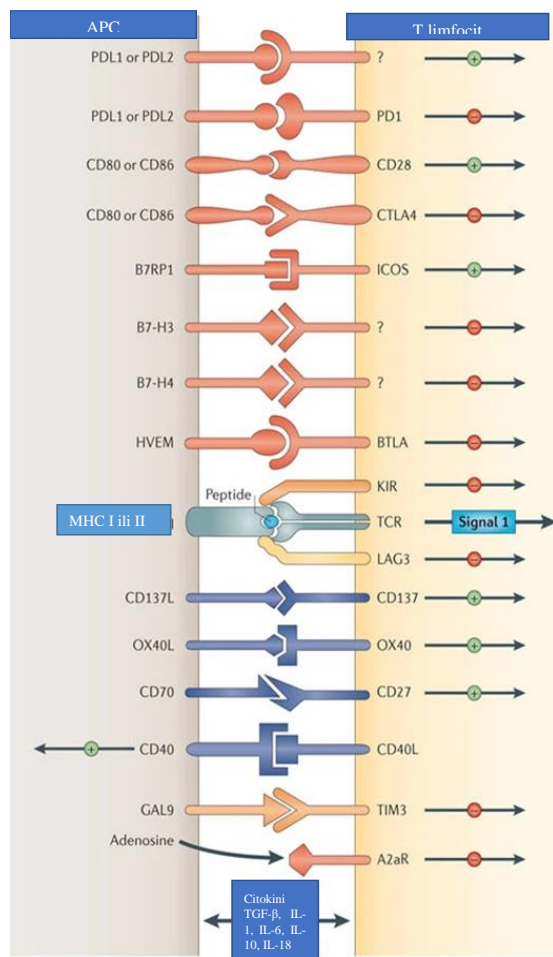
**Slika 7.** Hipoteza dva signala za T staničnu aktivaciju Izvor: *Rallis KS, Hillyar CRT, Sideris M, Davies JK. T-cell-based Immunotherapies for Haematological Cancers, Part A: A SWOT Analysis of Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) and Bispecific T-Cell Engagers (BiTEs). Anticancer Res. 2021;41:1123-41.*

### 1.8.1. Proteini kontrolnih točaka

Većina ko-stimulatornih receptora su na naivnim i mirnim T stanicama, dok su inhibitorni receptori pojačani na aktiviranim T stanicama (59). Nazivaju se proteini kontrolnih točaka (engl. *checkpoint proteins*) i utišavaju imunosni odgovor, kako se tijekom imunoreakcije ne bi autoimunom destrukcijom uništile zdrave stanice. Proteini kontrolnih točaka daju signale kojima se provodi negativna modulacija T stanica što pridonosi samotoleranciji, ali nažalost i

slaboj protutumorskoj aktivaciji T stanica. Djelovanje na proteine kontrolnih točaka je izazov u liječenju autoimunih bolesti gdje je poželjna njihova aktivacija, a s druge strane u borbi protiv tumora kad se nastoji postići njihova inhibicija, odnosno što veća aktivacija tumor-specifičnih citotoksičnih limfocita.

Proteini kontrolnih točaka su: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom T (CTLA-4, engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), protein programirane stanične smrti 1 (PD-1, engl. *protein of programmed cell death-1*), gen za aktivaciju limfocita-3 (LAG-3, engl. *lymphocyte activating gene-3*), T-stanični imunoglobulin i molekula-3 koja sadrži mucinsku domenu, (TIM-3, engl. *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing molecule-3*) i drugi (Slika 8).



APC antigen-prezentirajuća stanica

**Slika 8.** T stanični odgovor nakon kontakta s antigen- prezentirajućom stanicom (APC) ovisi o imunomodulatorima: na naivnim T stanicama i T stanicama u mirovanju većinom su izraženi kostimulacijski receptori, a nakon aktivacije T stanica pojačano su regulirani koinhibicijski



receptori. Izvor: Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, Yatabe Y, Hirsch FR. IASLC atlas of PD-L1. Immunohistochemistry testing in lung cancer. IASLC 2017. Aurora, Colorado, USA.

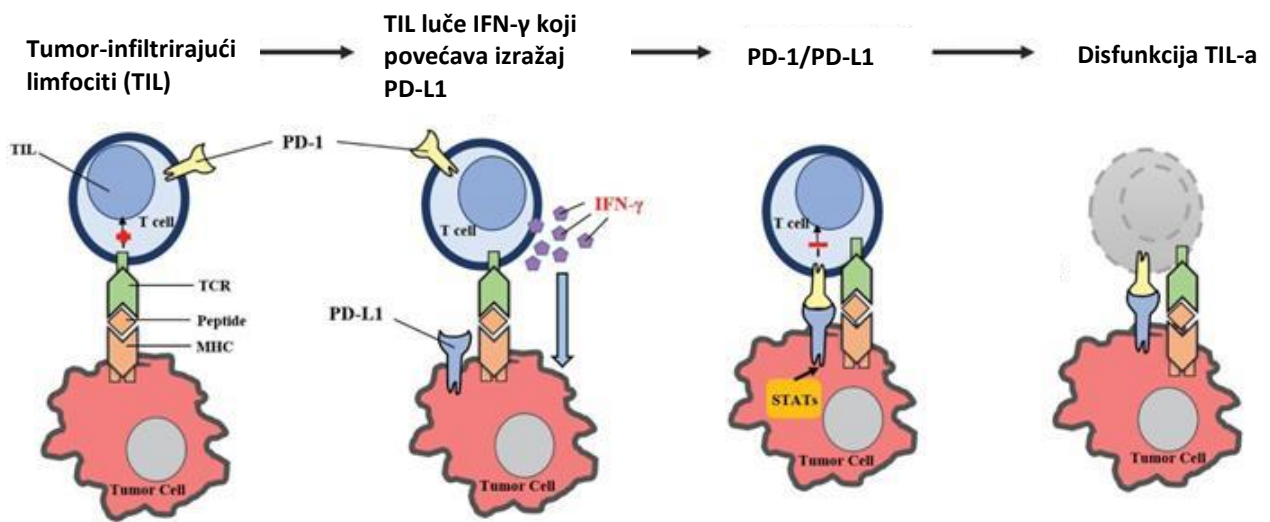
Znanstvenici James P. Allison i Tasuku Honjo su 2018. godine dobili Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu zbog otkrića terapije raka inhibicijom negativne imunoregulacije (60,61). U kliničkoj studiji 2010. godine navedena terapija je pokazala dramatičan uspjeh u bolesnika s metastatskim melanomom, a kasnije i u bolesnika s drugim vrstama raka te je promijenila ishod mnogih smrtonosnih tumora (62). Pretjerana generalizirana aktivacija citotoksičnih T limfocita koju izaziva ova terapija može dovesti do autoimunih oštećenja kože, jetre, živčanog sustava, endokrinih organa i probavnog sustava, što se klinički manifestira kao hepatitis, proljev, hipotireoza, kožni osip, ali i seronegativna mijastenija gravis.

U infekciji, aktivirani klon limfocita T izlaže na površini CTLA-4 (CD 125) koji se visokim afinitetom veže na CD80 i CD86 na APC i tako ograničava daljnju aktivaciju T stanice; ravnoteža između akceleratora i inhibitora ključna je za čvrstu kontrolu imunodne reakcije. Način djelovanja određenih tumora jest da potiču izražaj CTLA-4 i posljedično smanjuju aktivnost T stanica. Kostimulacijska molekula CD 28 i inhibitorska molekula CTLA-4 ostvaruju suprotne učinke, ali se pritom CTLA-4 veže većim afinitetom nego CD 28. U imunoterapiji protutijelo koje se veže na CTLA-4 omogućava aktivaciju i djelovanje citotoksičnih limfocita T.

Ipilimumab je rekombinantno humanizirano monoklonsko protutijelo IgG1 razreda na CTLA-4 i prvi lijek inhibitor proteina kontrolnih točaka, kojeg je 2011. godine FDA odobrila za liječenje metastatskog melanoma, kasnije i nesitnostaničnog karcinoma pluća, mezotelioma, hepatocelularnog karcinoma, kolorektalnog karcinoma i urotelnog karcinoma (63). Tremelimumab je u kliničkim ispitivanjima, a započete su kliničke studije i s drugim protutijelima na CTLA-4.

Drugi protein kontrolnih točaka je PD-1 (CD 279) koji kontrolira aktivne cirkulirajuće T stanice i tako sprječava nastanak autoimunih bolesti, ali i protutumorsko djelovanje imunodnog sustava (64). PD-1 je transmembranski protein na površini T limfocita, B limfocita, makrofaga, dendritičkih stanica i NK stanica pa ima širi spektar imunosupresije od CTLA-4. PD-1 se aktivira vezivanjem za ligand PD-L1 (PD-L1 i PD-L2) na površini APC stanica što dovodi do supresije aktivnih T-stanica i potiče njihovu apoptozu, a smanjuje apoptozu regulatornih T stanica (Treg, engl. *T regulatory lymphocytes*).

Tumorske stanice su svojim imunouređenjem razvile mehanizam za izbjegavanje imunskog djelovanja jer izražajem PD-L1 suprimiraju aktivirane T stanice i imunološki odgovor te postižu adaptivnu otpornost. Prema Zaidiju, stimulaciju izražaja PD-L1 na tumorskim stanicama potiču citokini, primjerice IFN- $\gamma$  kojeg proizvode NK stanice, T stanice i epitel sluznice (65). Secernirani IFN- $\gamma$  stimulira signalni put JAK-STAT (engl. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) u makrofagima, B limfocitima, T limfocitima i mukoznim epitelnim stanicama te promovira upalu, antibakterijsku aktivnost i inhibira virusnu replikaciju. U tumoru u kontaktu tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL) sa stanicama raka dolazi do sekrecije IFN- $\gamma$  koji potiče izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama, a PD-L1 se veže na PD-1 na aktiviranim limfocitima i inaktivira ih (Slika 9) (66).



**Slika 9.** Adaptivna otpornost tumorskih stanica. U tumorskom mikrookolišu T limfociti i NK stanice luče IFN- $\gamma$  koji potiče izražaj PD-L1 na tumorskim stanicama. Vezanjem PD-L1 na PD-1 T-efektorskih stanica, ove postaju disfunkcionalne. Izvor: Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer*. 2021;12:2735-2746.

Izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama djeluje kao petlja negativne povratne sprege koja inhibira protutumorski imunitet (66). Tako rak izmiče imunološkom odgovoru unatoč okruženju specifičnim T limfocitima.

Prisustvo PD-L1 na površini tumorskih stanica određuje se imunohistokemijski i njegov izražaj najčešće ovisi o tumorskom mikrookolišu, a rijetko je posljedica amplifikacije gena za PD-L1. U imunoterapiji blokadom kontrolnih točaka primjenjuju se monoklonska protutijela na CTLA-4, PD-1 i PD-L1 što omogućava ponovnu aktivaciju efektornih T limfocita protiv

tumorskih stanica. Nivolumab (anti PD-1) je odobren 2014. za liječenje bolesnika s metastatskim melanomom, a slijedeće godine za bolesnike s prethodno liječenim uznapredovalim/metastatskim nesitnostaničnim karcinomom pluća (67).

Neki primjeri PD-1 i PD-L1 inhibitora kontrolne točke prikazani su u Tablici 3. U posljednje vrijeme razvijena je kombinirana terapija koja koristi anti-PD1 zajedno s anti-CTLA4 i pokazala se učinkovitom u smanjenju veličine tumora kod bolesnika koji ne reagiraju na pojedinačnu blokadu. U kombiniranoj imunoterapiji anti-CTLA4 dovodi do pojačane imunološke reakcije antigen-specifičnih T stanica, a anti-PD-1 reaktivira sposobnost CD8+ T stanica da liziraju stanice raka (64). FDA je 2015. godine odobrila kombiniranu terapiju anti-CTLA4 (ipilimumab) i anti-PD1 (nivolumab) kao prvu liniju liječenja za bolesnike s metastatskim nesitnostaničnim karcinomom pluća pluća u kojem  $\geq 1$  % tumorskih stanica imunohistokemijski izražava PD-L1 (68).

**Tablica 3. Odobreni inhibitori kontrolne točke u liječenju karcinoma**

Monoklonsko protutijelo	Zaštićeno ime lijeka (god. odobrenja)	Cilj djelovanja
Ipilimumab	Yervoy (2011)	CTLA-4
Nivolumab	Opdivo (2014)	PD-1
Pembrolizumab	Keytruda (2014)	PD-1
Cemiplimab	Libtayo (2018)	PD-1
Atezolizumab	Tecentriq (2016)	PD-L1
Avelumab	Bavencio (2017)	PD-L1
Durvalumab	Imfinzi (2017)	PD-L1

### 1.8.2. Kontradiktorna uloga IFN- $\gamma$ u imunitetu

Interferoni su pleotropni citokini koji igraju središnju ulogu u otpornosti sisavaca na patogene (61). Virusom zaražene stanice izlučuju interferone tipa I (IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ ). Interferon

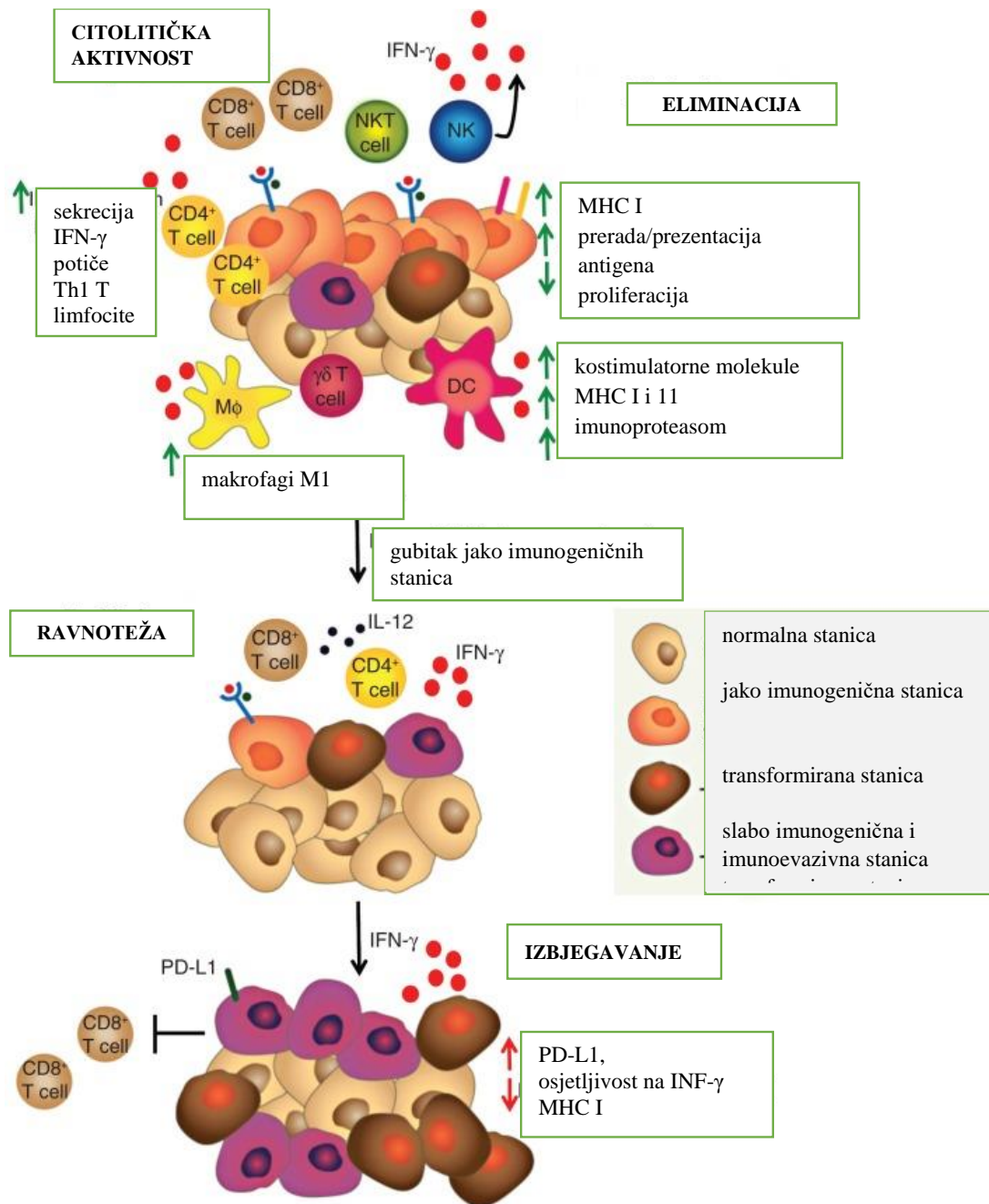
tipa II ili gama-interferon (IFN- $\gamma$ ) izlučuju NK stanice, a T limfociti parakrino u sklopu imunog odgovora. Prema nekim izvorima, IFN- $\gamma$  luči epitel sluznica. IFN- $\gamma$  se luči nakon stimulacije receptora za IFN- $\gamma$ , ili u odgovoru na rane citokine IL12 i IL18 i IFN tipa I te stimulacijom preko T staničnog i NK staničnog receptora. IFN- $\gamma$  regulira nekoliko aspekata prirodnog i stečenog imunološkog odgovora: stimulaciju baktericidne aktivnosti fagocita, indukciju proliferacije preteča citotoksičnih limfocita T, stimulaciju prezentacije antigena preko MHC I. i II. razreda, orkestraciju interakcije leukocita i endotela i učinke na staničnu proliferaciju i apoptozu. Stvaranje IFN- $\gamma$  u prirodnom imunitetu predstavlja kritičnu stepenicu u imunološkoj obrani od intracelularnih bakterija, virusa i gljivica (70). U fiziološkim uvjetima IFN- $\gamma$  potiče izražaj PD-L1 na makrofagima i drugim stanicama kako bi se kontrolirala aktivnost T limfocita i spriječilo razaranje tkiva.

Osim toga, IFN- $\gamma$  je ključni citokin kojeg proizvode aktivirane T stanice i NK stanice u tumorskom mikrokolišu u kojem IFN- $\gamma$  ima kontradiktornu ulogu. Naime, s jedne strane potiče aktivnost CD4 i CD8 T limfocita, NK stanica, dendritičkih stanica i makrofaga i prezentaciju antigena uz MHC I te inhibira Treg stanice. Na taj način je uključen je u antiproliferativo, antiangiogeno i proapoptotičko djelovanje protiv neoplastičnih stanica (71). S druge strane, protumorsko djelovanje očituje se tako što IFN- $\gamma$  potiče izražaj PD-L1 na tumorskim stanicama, koji je ligand za inhibicijsku molekulu PD-1 na T limfocitu, što dovodi do imunosnog izbjegavanja.

Protumorsko djelovanje IFN- $\gamma$  u tumorskom okolišu odvija se u sklopu tzv. *immunoediting*-a (72). Koncept opisuje tri faze odnosa transformiranih stanica i imunog sustava: eliminacija, ravnoteža i bijeg. U fazi eliminacije stanice urođene i adaptivne imunosti reagiraju na jako imunogenične transformirane stanice, a potiče ih IFN- $\gamma$  koji ima protumorski učinak. U fazi ravnoteže preostale, slabo imunogenične transformirane stanice nastavljaju svoje umnažanje u okruženju T limfocita koji luče citokine IL12 i IFN- $\gamma$ . U fazi bjega transformirane stanice koriste IFN- $\gamma$  izlučen iz T limfocita za signalni put JAK/STAT kojim će na svojoj membrani izraziti PD-L1, ligand za inhibicijsku molekulu PD-1 na T limfocitu (Slika 10) (72). Na transformiranim stanicama smanjuje se izražaj molekula MHC I i istovremeno raste utjecaj IFN- $\gamma$  na limfocite. Posredovanjem IFN- $\gamma$  povećan je izražaj enzimaIDO (indoleamine-2,3-dioxygenase) koji smanjuje efektivni imuni odgovor.

Protutumorski i protumorski učinci IFN- $\gamma$  su vremenski odvojeni (72). U definiranju skupina bolesnika koja će dobro odgovoriti na blokadu PD-1, odnosno PD-L1, očito nije važan samo izražaj PD-L1 na tumorskim stanicama jer daje tek ograničeni uvid u biologiju tumora.

Novije tehnologije mogu korištenjem genomske analize mRNA procijeniti i druge komponente tumorskog mikrookoliša, uključujući citokin IFN- $\gamma$  (73).



**Slika 10.** Uloga IFN- u svim stadijima imunouređenja tumora. *Izvor: Alspach E, Lussier DM, Schreiber RD. Interferon- $\gamma$  and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2019; 11: a 028480*

### 1.8.3. Tumor-infiltrirajući makrofagi i Treg stanice

Dva su podtipa makrofaga, klasično aktivirani proupalni M1 makrofagi i alternativno aktivirani protuupalni M2 makrofagi koji sudjeluju u ožiljkavanju. U hipoksičnom miljeu tumorskog mikrookoliša solidnih tumora M1 se mijenjaju u M2 i postaju regulatori proliferacije tumorskih stanica, angiogeneze i remodeliranja tkiva (74). U većini solidnih tumora je zastupljen M2 fenotip koji podržava rast primarnog tumora, inducira angiogenezu, limfangiogenezu, remodeliranje strome, formiranje metastaza i supresiju imuniteta. M2 makrofagi izlučuju čimbenike koji izravno utječu na proliferaciju stanica karcinoma, uključujući epidermalni čimbenik rasta (EGF), članove obitelji FGF i TGF- $\beta$ , citokine koji privlače druge makrofage i potiskuju funkciju CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita. Postoje eksperimentalni dokazi kako tumor-infiltrirajući makrofagi mogu kombinirati svojstva M1 i M2 makrofaga pa je reprogramiranje fenotipa M2 u fenotip M1 mogući terapijski pristup liječenju karcinoma (75).

Treg stanice su T stanice koje izražavaju biljege CD4, FOXP3 i CD25, a potječu iz iste loze kao naivne CD4<sup>+</sup> T stanice. One održavaju toleranciju na vlastite antigene i sprječavaju autoimune bolesti tako što smanjuju indukciju i proliferaciju efektorskih T stanica (76).

### 1.8.4. Tumorski imuni mikrookoliš u adenokarcinomu želuca

Da bi inhibitori imunoloških točaka bili aktivni, tumori moraju biti u unaprijed aktiviranom stanju; takozvani „vrući tumori“ (77). Prisutnost tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL) je nužna za odgovarajući imunološki odgovor (78). Na temelju PD-L1 statusa zloćudnih stanica i prisutnosti tumor-infiltrirajućih limfocita, razlikuju se pojedini uzorci tumorskog mikrookoliša. Nazvani su: 1.) stečena imunorezistencija (PD-L1<sup>+</sup> s TIL), 2.) imunološko ignoriranje (PD-L1<sup>-</sup> bez TIL), 3.) unutarnja indukcija izazvana amplifikacijom gena *PD-L1* (PD-L1<sup>+</sup> bez TIL), te 4.) drugi supresori koji promiču imunu toleranciju (PD-L1<sup>-</sup> s TIL) (79). Kao druge supresorske molekule istražuju se LAG-3 i TIM-3 koje su koinhibicijski receptori na T limfocitima (80,81). Izražaj PD-L1 na zloćudnim stanicama je značajno povezan s brojnošću CD8<sup>+</sup> T stanica u TIL-u i vjerojatno potaknut citokinima iz TIL-a (82). Dosad je u raku želuca istraživani sastav i utjecaj uzorka imunog tumorskog mikrookoliša na kliničke parametre i ishod (83,84). Novina ovog istraživanja je analiza utjecaja IFN- $\gamma$  izraženog u

tumorskim stanicama na prisutnost CTLA-4<sup>+</sup> i CTLA-4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T suprimirajućih stanica u primarnom tumoru i metastatskom/drenažnom limfnom čvoru.

### 1.8.5. Imunoterapija karcinoma želuca

Razvoj imunoterapije pridonio je učinkovitosti liječenja uznapredovalog karcinoma želuca pri čemu su provedene brojne kliničke studije s nivolumabom, pembrolizumabom i trastuzumabom.

Nivolumab je monoklonsko anti-PD-1 protutijelo koje je u studiji ATTRACTION-2 pokazalo poboljšanje u ukupnom preživljenju kod bolesnika s uznapredovalim karcinomom želuca prethodno liječenih kemoterapijom. U studijama ATTRACTION 4 i CheckMate-649 nivolumab je pokazao učinkovitost u prvoj liniji liječenja uznapredovalog neoperabilnog karcinoma želuca u kombinaciji s kemoterapijom (85-87). Studija ATTRACTION 2 provedena je u 49 centara u Aziji i uključila ukupno 493 bolesnika. Dokazala je značajno duže prosječno preživljenje u skupini bolesnika liječenih nivolumabom u odnosu na placebo (5,26 vs 4,14 mjeseci; HR 0,63, 95% CI 0,51-0,78;  $p < 0,0001$ ). U 10% bolesnika liječenih nivolumabom javile su se nuspojave 3. stupnja (86). Dodatna analiza ATTRACTION-2 studije pokazala je kako bi izražaj PD-L1 u tumoru, serumske vrijednosti natrija i omjer neutrofila/limfocita mogli poslužiti kao prediktivni biljezi u procjeni učinka nivolumaba kod bolesnika s prethodno liječenim karcinomom želuca (88).

Provedena je studija učinkovitosti nivolumaba u prvoj liniji liječenja bolesnika s HER-2 negativnim, uznapredovalim, neoperabilnim ili recidivirajućim karcinomom želuca, odnosno GE spoja, u kombinaciji s kemoterapijom temeljenom na oksaliplatinu (ATTRACTION-4) (85). Multicentrična, placebom kontrolirana studija faze 2-3 provedena je u 130 centara u Aziji i uključila 724 ispitanika. Također je dokazano poboljšanje preživljenja bez progresije bolesti (engl. *progression free survival, PFS*): 10,45 mjeseci prema 8,34 mjeseci (HR 0,68; 98.51% CI 0,51-0,90;  $p = 0,007$ ) u skupini bolesnika liječenih nivolumabom i kemoterapijom u odnosu na kontrolnu skupinu (placebo + kemoterapija), ali nije dokazana učinkovitost glede općeg preživljenja (OS, engl. *overall survival* (85)).

Kako su obje navedene studije bile na azijskoj populaciji, provedena je od 2017. do 2019. godine velika globalna studija (CheckMate 649) sličnog protokola kao ATTRACTION 4 (87). Uključeno je 1581 bolesnika s HER-2 negativnim, neliječenim uznapredovalim i neoperabilnim karcinomom želuca, GE spoja ili jednjaka. Studija je dokazala značajan učinak kombinacije liječenja nivolumabom + kemoterapijom u odnosu na liječenje samo kemoterapijom na mjere ishoda, OS (HR 0,71 [9,4% CI 0,59-0,6];  $p < 0,0001$ ) i PFS (HR 0,68 [98 % CI 0,6-0,81];  $p < 0,0001$ ) (87).

Pembrolizumab, drugo monoklonsko anti-PD-1 protutijelo pokazalo je aktivnost u tumorima s visokom mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI-H) ili velikim tumorskim mutacijskim opterećenjem.

Studija faze 2 KEYNOTE-059 ispitala je učinak pembrolizumaba u 3. liniji liječenja karcinoma želuca ili GE spoja na 259 bolesnika iz 16 zemalja pri čemu je objektivna stopa odgovora iznosila 11,6%. Veći udio odgovora na terapiju (15,5% prema 6,4%) i duže trajanje odgovora (16,3 prema 6,9 mjeseci) zabilježeno je kod ispitanika s PD-L1 pozitivnim u odnosu na bolesnike s PD-L1 negativnim statusom adenokarcinoma želuca (89). 18% ispitanika razvilo je nuspojave gradusa 3 - 5 i zabilježena su dva smrtna ishoda povezana s liječenjem (89). Slične studije učinkovitosti pembrolizumaba provedene su u prvoj (KEYNOTE-062) i drugoj liniji liječenja (KEYNOTE-061) u odnosu na kemoterapiju u ispitanika s PD-L1 pozitivnim karcinomom želuca i GE spoja (90,91). U KEYNOTE-061 studiji pembrolizumab je pokazao trend prema poboljšanom OS u odnosu na paklitaksel u ispitanika s  $CPS \geq 1\%$  (HR, 0.81), uz razvoj manjeg broja nuspojava (91). KEYNOTE-062 studija pokazala je kako pembrolizumab nije inferioran kemoterapiji, uz razvoj manjeg broja nuspojava, ali kombinacija s kemoterapijom nije superiorna samoj kemoterapiji s obzirom na OS i PFS (90). Naknadna analiza navedenih studija pokazala je kako bi MSI-H status mogao biti prediktivni biljeg za terapiju pembrolizumabom među bolesnicima s uznapredovalim karcinomom želuca ili GE spoja, neovisno o liniji terapije u kojoj se primjenjuje (92).

U posljednje vrijeme provode se klinička istraživanja i smjernice proširuju s kombiniranom imunoterapijom pa je tako studija KEYNOTE-811 pokazala značajan učinak pembrolizumaba u kombinaciji s trastuzumabom (monoklonsko protutijelo protiv HER-2) i kemoterapijom u liječenju HER2-pozitivnog neresektabilnog ili metastatskog adenokarcinoma želuca ili GE spoja. Studija je dokazala kako kombinirano liječenje dramatično smanjuje veličinu tumora, inducira kompletni terapijski odgovor i značajno poboljšava odgovor na liječenje (93).



Na temelju ovih rezultata, nivolumab i pembrolizumab su u raznim smjernicama uključeni u liječenje oboljelih od uznapredovalog karcinoma želuca. Prema ESMO smjernicama, nivolumab je indiciran u liječenju uznapredovalog i metastatskog karcinoma želuca s PD-L1 CPS  $\geq 5\%$ , a pembrolizumab u drugoj liniji kod karcinoma želuca koji su dMMR/MSI-H (31). S obzirom da je većina studija inhibitora kontrolnih točaka provedena na azijskoj populaciji, očekuju se rezultati europskih studija radi daljnjih odobrenja Europske agencije za lijekove (EMA). Ipak, nivolumab i pembrolizumab se sve više koriste „van etikete“ što potvrđuje studija među onkolozima u Kini prema kojoj je 80% indikacija za PD-1/PD-L1 bilo postavljeno na taj način (94).

Metaanaliza učinka anti-PD-1/PD-L1 terapije u liječenju karcinoma želuca pokazala je objektivnu stopu odgovora od 12% i postotak kontrole bolesti od 34,7%. Anti PD-1 liječenje poboljšava 12-mjesečno i 18-mjesečno preživljenje i trajanje odgovora na terapiju. Imunoterapija je uspješnija u bolesnika s uznapredovalim karcinomom želuca čiji je tumor MSI-H, EBV+, ili ima visoki udio mutacija (95).

Međutim, većina bolesnika nije imala koristi od liječenja inhibitorima kontrolne točke, što naglašava nužnost boljeg odabira bolesnika i primjene kombinirane imunoterapije. Za postizanje maksimalnog terapijskog odgovora potrebno je predvidjeti učinak inhibitora kontrolnih točaka ovisno o PD-1, PD-L1, MSI statusu i prisutnim mutacijama. Važna je imunogenotipska karakterizacija adenokarcinoma želuca, poznavanje TME-a i regulatornih funkcija imunoloških stanica. Potrebno je definirati odgovarajuće prediktivne biljege koji bi mogli predvidjeti odgovor na imunoterapiju i razvijati kombiniranu imunoterapiju radi bolje učinkovitosti (96).

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

**Glavni cilj** je u tumorskom mikrookolišu adenokarcinoma želuca odrediti PD-L1 status tumorskih stanica i usporediti s brojem CD8<sup>+</sup> T limfocita, gustoćom infiltracije makrofaga i brojem CTLA-4 T-stanica.

**Sporedni ciljevi su:**

1. ispitati povezanost PD-L1 statusa adenokarcinoma želuca s kliničkim pokazateljima (životna dob, spol, klinički stadij) i patološkim pokazateljima (makroskopski tip i histološki podtip, uzorak infiltracije u tumorskom imunom mikrookolišu)
2. analizirati izražaj IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama i prisutnost CTLA-4<sup>+</sup> i CTLA-4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> stanica u tumorskom imunom mikrookolišu primarnog tumora i drenažnog/metastatskog limfnog čvora
3. u tumorskim stanicama imunohistokemijski ispitati izražaj p53 i MLH-1, a in situ hibridizacijom prisutnost EBV i usporediti s PD-L1 statusom
4. sve praćene pokazatelje analizirati prema općem preživljenju.

**Hipoteze**

PD-L1 status operabilnog adenokarcinoma želuca je različit u histološkim podtipovima i ovisan o tumorskom imunom mikrookolišu, odnosno o udjelu citotoksičnih T limfocita i gustoći infiltracije makrofaga.

Prisutnost CTLA-4 i CTLA-4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> suprimirajućih T limfocita u primarnom tumoru i drenažnom/metastatskom limfnom čvoru je povezana s izražajem IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama.

EBV, TP53 i MLH-1, čiji je pozitivni izražaj karakterističan za pojedine molekularne podtipove adenokarcinoma želuca, povezani su s različitim tumorskim imunim mikrookolišem.

### **3.METODE I ISPITANICI**

### **3.1. USTROJ ISTRAŽIVANJA**

Istraživanje je retrospektivno, presječno i longitudinalno. Izvor podataka je primarni, prikupljanjem vlastitih podataka. Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za patologiju, citologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split. Podatci o datumu smrti prikupljeni su iz bolničkog mrtvozorstva i Matice umrlih Splitsko-dalmatinske županije. Za provedbu istraživanja ishodili smo suglasnost Etičkog povjerenstva naše ustanove (2181-147-01/06/M.S.-20-2). Istraživanje je provedeno u skladu s odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije i Helsinške deklaracije.

### **3.2. ISPITANICI**

U studiji je 97 ispitanika koji su zbog adenokarcinoma želuca bili podvrgnuti gastrektomiji/limfadenektomiji na Klinici za kirurgiju KBC-a Split od 01.01.2014. do 31.12.2018. godine. Histološka stakalca i parafinski blokovi prikupljeni su iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju. Klinički podatci o spolu, dobi, datumu dijagnoze, patološkom stadiju, histološkom tipu po Laurenu (intestinalni, difuzni, miješani), Borrmannovu makroskopskom tipu (polipoidni, gljivasti, ulcerativni, ravni/infiltrativni) i kliničkom stadiju bolesti (IA-IV) prikupljeni su iz računalne povijesti bolesti. Molekularna klasifikacija prema Genomskom atlasu raka nije prikupljena jer molekularni testovi nisu bili rutinski izvođeni. U studiju su uključeni ispitanici koji su imali sve potrebne kliničke podatke i parafinske blokove operiranog tumorskog tkiva i drenažnog/metastatskog limfnog čvora. Iz studije su isključeni ispitanici s karcinomom na GE spoju ili sa sinkronim karcinomom te ispitanici s nepotpunim kliničkim podacima, kao i oni koji su primali preoperativnu kemo-/radioterapiju. Posljednji dan kliničkog praćenja bio je 31. prosinca 2018. godine. Medijan praćenja bio je 31,8 mjeseci. Opće preživljenje izračunato je od datuma dijagnoze do datuma smrti od bilo kojeg uzroka ili na posljednji dan praćenja kada je ishod cenzoriran kao živ ili mrtav.

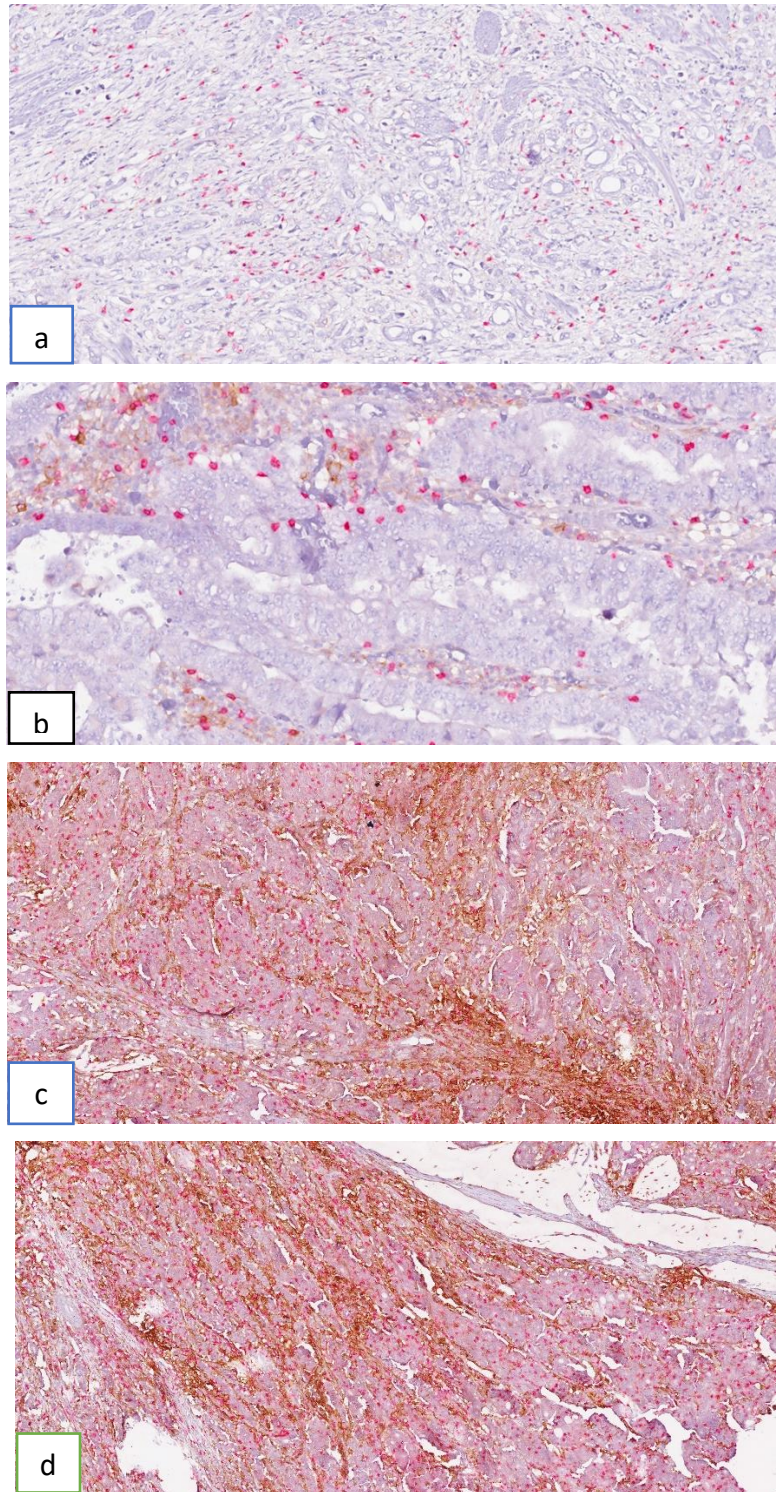
### 3.3. METODE

U istraživanju su rabljene imunohistokemijska i imunofluorescentna metoda.

#### 3.3.1. Imunohistokemija

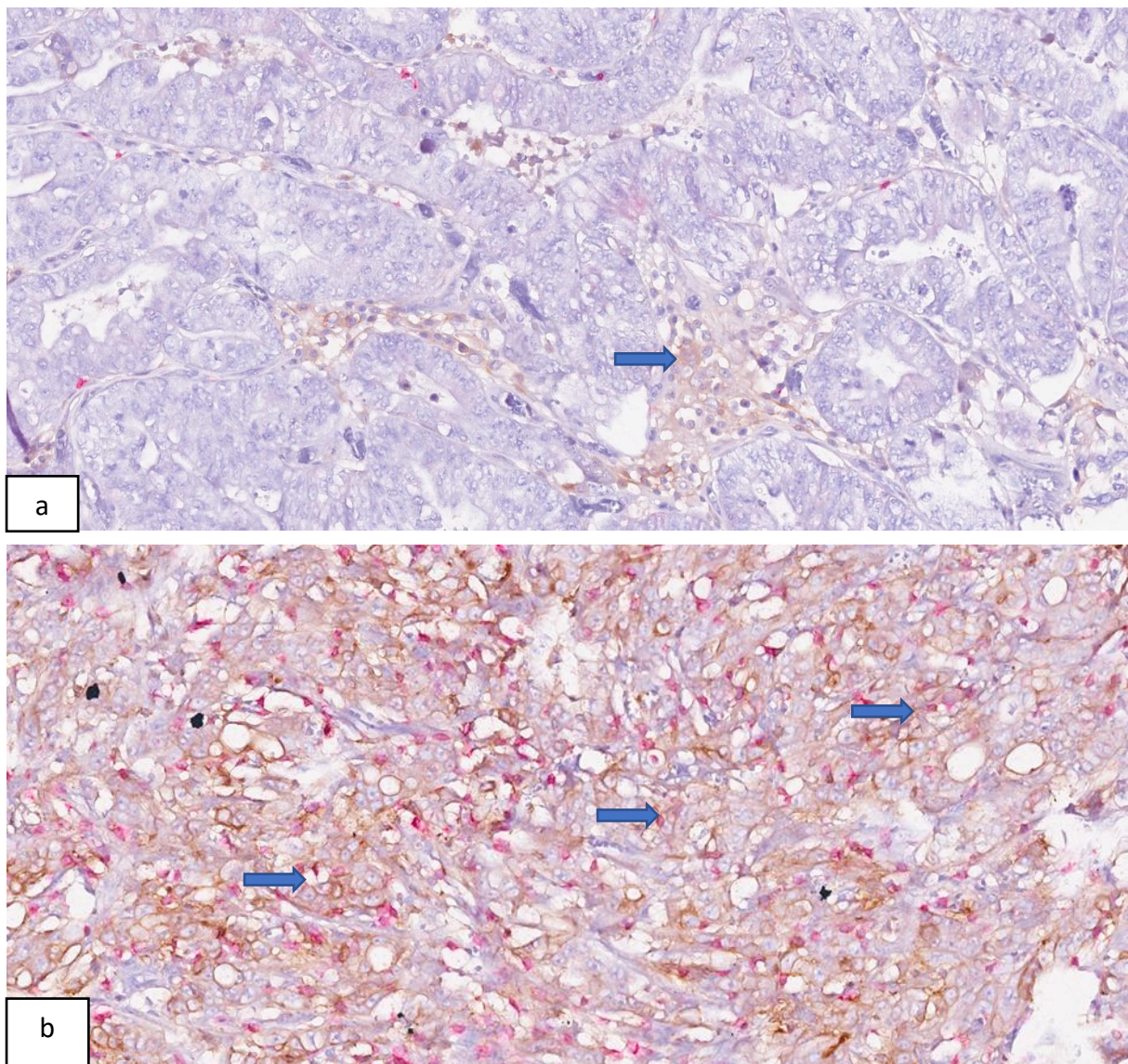
Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva i drenažnog/metastatskog perigastričnog limfnog čvora izrezani su histološki preparati debljine 5 mikrometara, deparafinirani, rehidrirani i strojno obojeni na aparatu UltraBenchmark (Ventana Medical Systems, Inc. Oro Valley, AZ, SAD).

Za dvostruko imunohistokemijsko bojenje rabljeni su monoklonsko mišje protutijelo PD-L1 (SP263, Ventana) i kuniće monoklonsko protutijelo CD8 (SP57, Ventana) te odgovarajuća sekundarna protutijela (DAB/ICH i Fast red/ICH Ventana, Basel, Švicarska). Protutijela su bila razrijeđena za upotrebu (engl. *ready for use*). Pozitivni izražaj bio je PD-L1 smeđe membransko obojenje, a pozitivni izražaj CD8 crveno citoplazmatsko obojenje. Kao vanjska kontrola za PD-L1 i PD-L1 obojeni su preparati posteljice, odnosno nepčane tonzile. Negativna kontrola bili su preparati kojima je u procesu bojenja izostavljeno primarno protutijelo. Preparate su neovisno analizirali dva patologa na svjetlosnom mikroskopu Olympus 41 BX (Olympus, Tokyo, Japan). PD-L1-pozitivne tumorske stanice i PD-L1-pozitivni makrofagi razlikuju se morfološki. Gustoća infiltracije makrofaga vrednovana je kao 0 (nema infiltracije), 1 (oskudna), 2 (periferna) i 3 (gusta infiltracija izmiješana s tumorskim stanicama) (Slika 11).



**Slika 11.** Infiltracija makrofaga u tumorskom imunom mikrokolišu a) odsutna, b) oskudna c) periferna, d) gusta. (PD-L1 pozitivni makrofagi smeđe obojeni, CD8<sup>+</sup> T limfociti crveno obojeni). (dvostruko bojenje PD-L1/D8, 100x)

Prisutnost PD-L1 pozitivnih tumorskih stanica analizirana je prema Wu i suradnicima na četiri slučajno odabrana polja velikog povećanja (VPVP, 400 x) i udio izražen kao negativan (0), slab (1 - 10 %), umjeren (11 - 49 %) ili jak ( $\geq 50$  %) (97). PD-L1 status karcinoma želuca bio je pozitivan kad je  $\geq 1$  % tumorskih stanica izražavalo PD-L1 (Slika 12). Izbrojen je apsolutni broj CD8+ T-stanica na 4 VPVP i izračunata srednja vrijednost za svakog ispitanika.



**Slika 12.** PD-L1 status adenokarcinoma želuca: a) negativan (smeđe obojeni makrofagi, strelica) i b) pozitivan (jako membranski obojene tumorske stanice, strelica). Crveno su obojeni CD8+ T limfociti. (dvostruko bojenje PD-L1/CD8, 200x).



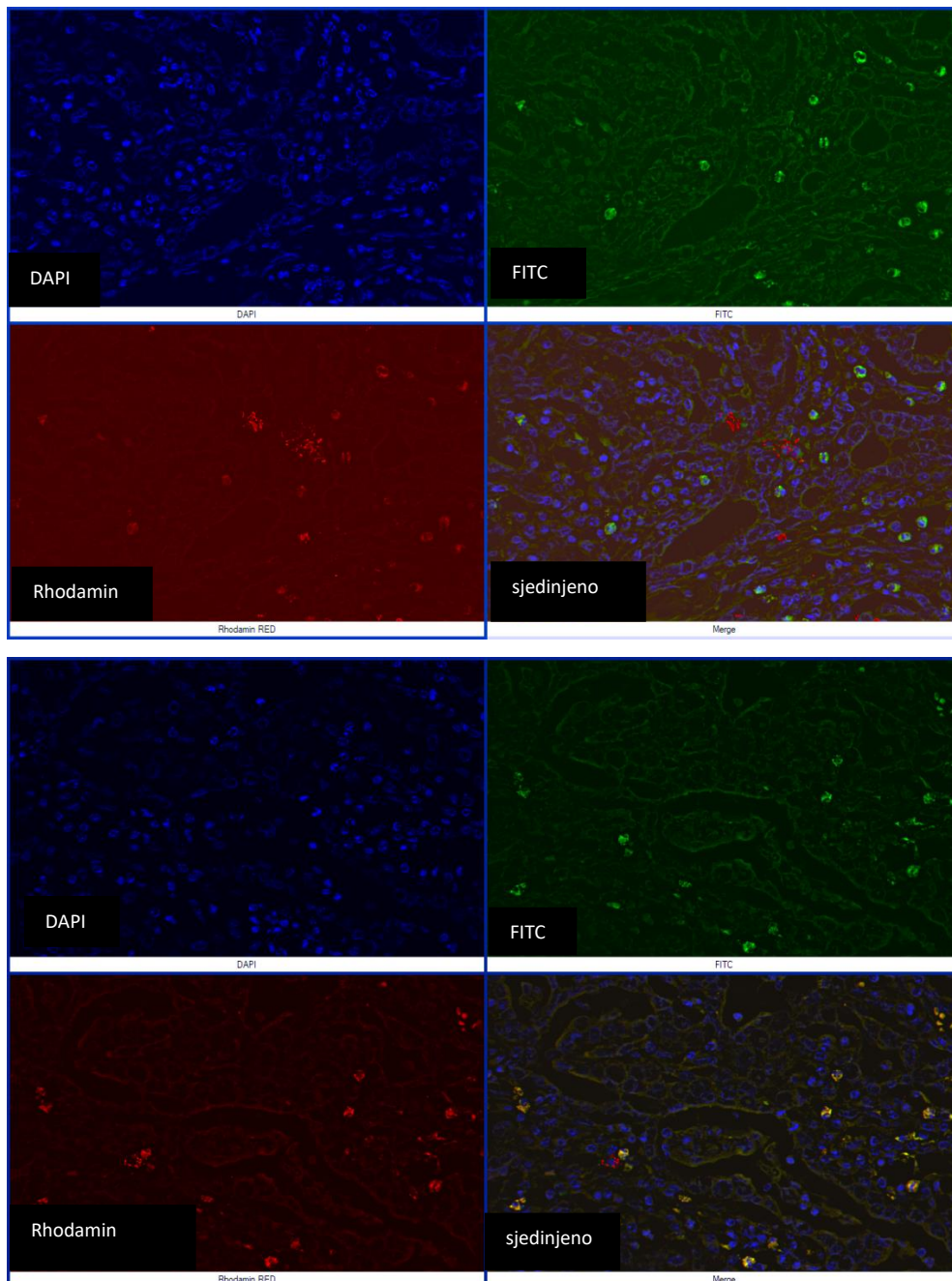
Za određivanje biljega karakterističnih za određene molekularne podtipove urađeni su imunohistokemijski tkivni mikronizovi vađenjem cilindra tumorskog tkiva iz originalnog parafinskog bloka specijalnom napravom i uklapanjem po zadanoj shemi u zajednički parafinski blok. Iz tih blokova izrezani su preparati debljine 5 mikrometara, dehidrirani i obojeni monoklonskim mišjim protutijelima TP53, odnosno MLH-1 (oba Ventana, Roshe) standardnim postupkom na stroju Ventana UltraBenchmark. Protutijela su bila tvornički spremna za upotrebu. Pozitivna kontrola za TP53 je serozni karcinom jajnika, a za MLH-1 endotelne stanice. Prisutnost EBV dokazana je in situ hibridizacijom EBER na stroju Ventana Ultrabenchmark standardnom metodom. Vanjska pozitivna kontrola za *EBER* in situ hibridizaciju je EBV+ Hodgkinov limfom.

### **3.3.2. Imunofluorescencija**

Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva i drenažnog/metastatskog perigastričnog limfnog čvora izrezani su histološki preparati debljine 5 mikrometara, deparafinirani i rehidrirani. Apliciran je pufer za blokiranje proteina (ab64226, Abcam, Cambridge, UK) u trajanju 30 minuta radi sprječavanja nespecifičnog obojenja. Indirektna dvostruka imunofluorescencija urađena je ručno s monoklonskim kunićjim protutijelom CTLA-4 (233772 Abcam, Cambridge, UK) u razrjeđenju 1:100 i monoklonskim mišjim protutijelom IFN- $\gamma$  (218426, Abcam, Cambridge, UK) u razrjeđenju 1:100 te odgovarajućim sekundarnim protutijelima: magarećim protu-kunićjim protutijelom obilježenim s Alexa flour i magarećim protu-mišjim protutijelom obilježenim s Rhodamine Red, prema standardnom postupku. Jezgre su obojane 40,6-diamidino-2-pfenilindolom (DAPI) (Immuno-Mount, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Unutarnja pozitivna kontrola za primarna protutijela bila je limfni čvor. Za kontrolu sekundarnog protutijela izuzeto je primarno protutijelo iz postupka bojenja; rezultat je potpuno neobojeni preprat jer sekundarno protutijelo nije križno reagiralo s tkivom. Preparati su analizirani na imunofluorescentnom mikroskopu, Olympus X41 na povećanju 400 $\times$  i snimljeni digitalnom kamerom (ORCA-spark, Hamamatsu, Japan).

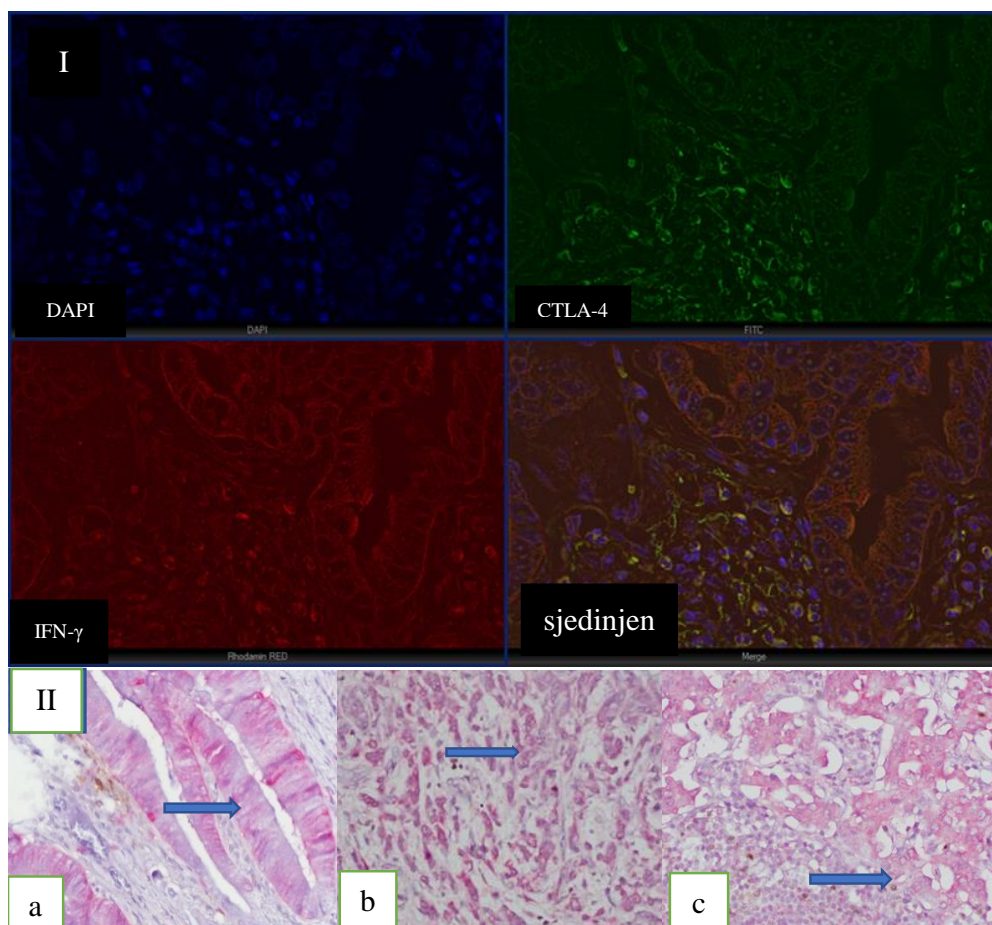
Snimljeno je 15 reprezentativnih fotografija, po pet iz tumorskog infiltrata (TI), invazivne margine (IM) i limfnog čvora (LČ). Mikrofotografije su sjedinjene u CellSens Dimension softverskom programu (Olympus, Tokyo, Japan) i analizirane ručno na ekranu

računala. IFN- $\gamma$  je prikazan kao crveni signal, CTLA-4 kao zeleni, a žuti signal interpretiran je kao koekspresija u jednom T-limfocitu (Slika 13).



**Slika 13.** Tumorski imuni mikrookoliš adenokarcinoma želuca: CTLA-4 limfociti (zeleno), CTLA-4<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> limfociti (žuto) i IFN- $\gamma$  pozitivne stanice. (CTLA4/IFN- $\gamma$  400x)

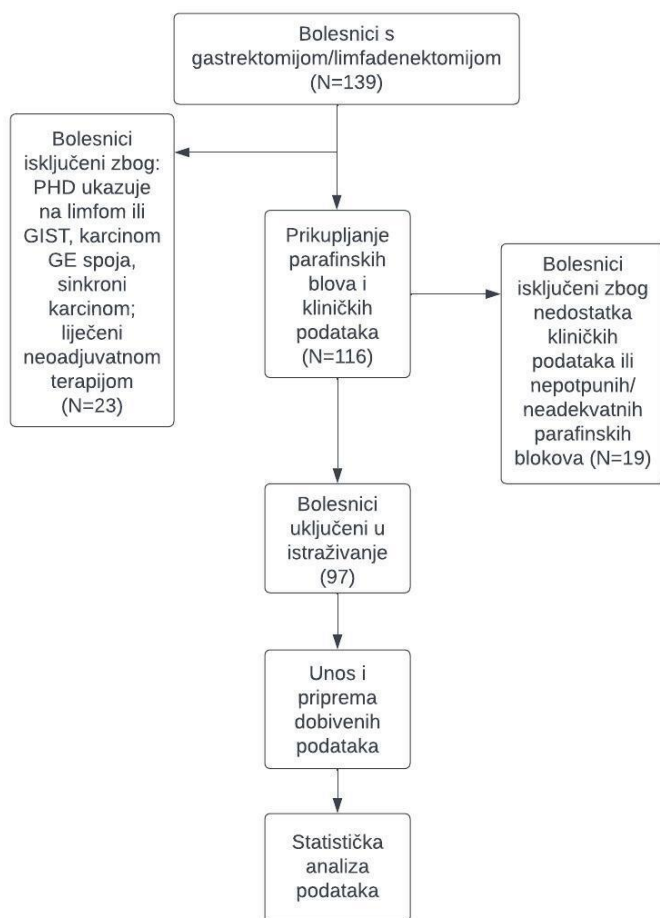
Pozitivno citoplazmatsko obojenje epitela sluznice i karcinomskih stanica dokazano je imunofluorescentnom i imunohistokemijskm metodom (Slika 14).



**Slika 14.** Prikaz tumorskih stanica koje izražavaju IFN- $\gamma$ . (I) Imunofluorescentnom metodom prikazane su tumorske stanice pozitivne na IFN- $\gamma$  (strelica) u mikrookolišu bogatom CTLA4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T limfocitima. (II) Imunohistokemijskom metodom prikazan je izražaj IFN- $\gamma$  u intestinalnom i difuznom podtipu adenokarcinoma želuca (a i b) i nodalnoj metastazi (c). (dvostruka imunofluorescentna metoda CTLA-4/IFN- $\gamma$  400x; IHK/AP 400x)

U literaturi se spominje slabi imunohistokemijski izražaj u epitelu želučane sluznice i karcinomu želuca, ali je prema Humanom proteinskom atlasu vrlo niska konzistencija između bojanja protutijelom i *INF- $\gamma$  RNA* (96).

### 3.4. DIJAGRAM TIJEKA



### 3.5. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Prikupljeni podatci za ovu studiju uneseni su u Excel program a statistički analizirani u SPSS programu (engl. The Statistical Package for the Social Science), verzija 19 za Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Kvalitativni podatci prikazani su kao apsolutni i relativni brojevi. Statistička analiza tablica kontigencije napravljena je  $\chi^2$  testom za kvalitativne varijable. U daljnjoj analizi je korištena univarijatna binarna logistička regresija kao i multivarijatna stepwise „Forward“ logistička regresija za pojavnost pozitivnog PD-L1. Rezultati „Forward“ i „Backward“ stepwis analize su bili identični pa smo prikazali samo rezultate „Forward“ stepwise analize. S obzirom na to da su raspodjele svih numeričkih varijabli statistički značajno odstupale od teorijski očekivane normalne raspodjele, kao mjere središnje tendencije i raspršenja prikazani su medijani i interkvartilni raspon. Za usporedbu kvantitativnih varijabli između dvije skupine korišten je Mann-Whitney U test. Spearmanov koeficijent

korelacije korišten je za utvrđivanje korelacije dviju kvantitativnih varijabli. ROC analizom odredili smo cut-off vrijednost CD8+ T limfocita za pojavnost pozitivnog PD-L1 statusa adenokarcinoma želuca te procijenili njegovu osjetljivost i specifičnost. Za druge kvantitativne varijable ROC analiza nije dala statistički odgovarajuće rezultate jer je  $p > 0,05$ .

Za analizu preživljenja korištena je Kaplan-Meierova krivulja, log-rank test i Cox-ova regresijska analiza. Duljinu preživljenja prikazali smo kao srednju vrijednost sa standardnom grješkom i pripadajućim 95% CI. Prikazan je i median gdje je to bilo moguće. Svi intervali pouzdanosti dani su na 95%-tnoj razini, a razina statističke značajnosti određena je na  $p < 0,05$ . Nezavisne varijable su bile klasifikacija Lauren, makrofag, CD8+ te stadij bolesti.

## **4.REZULTATI**

#### 4.1. DEMOGRAFSKI I KLINIČKO-PATOLOŠKI POKAZATELJI

U studiju je uključeno 97 ispitanika. Raspodjela demografskih i kliničko-patoloških varijabli prikazana je u Tablici 4. U uzorku je 66 (68%) muškaraca i 31 (32%) žena. Prosječna dob je 72 godine (Q1–Q3: 65–80; min–max: 46–87), bez značajne razlike između spolova ( $Z = 0,170$ ;  $p = 0,865$ ).

**Tablica 4. Demografske i kliničko-patološke varijable**

Varijabla		Ukupno (%)
Spol	muški	66 (68)
	ženski	31 (32)
Lauren	intestinalni	61 (63)
	difuzni	34 (35)
	miješani	2 (2)
Borrmann	polipoidni	16 (16,5)
	fungoidni	40 (41,2)
	ulcerativni	17 (17,5)
	infiltracijski	24 (24,7)
SZO	papilarni	0 (0)
	tubularni	57 (58,8)
	mucinozni	4 (4,1)
	miješani	1 (1)
	slabo kohezivni	33 (34,1)
	nediferencirani	2 (2,1)
Stadij bolesti	IA	10 (10,3)
	IB	4 (4,1)
	IIA	14 (14,4)
	IIB	17 (17,5)
	IIIA	24 (24,7)
	IIIB	25 (25,8)
	IVB	3 (3,1)
IFN- $\gamma$ u tumoru	negativan	60 (61,9)
	slab	17 (17,5)
	umjeren	9 (9,3)
	jak	11 (11,3)

IFN- $\gamma$ u metastazi	negativan	63 (64,9)
	slab	14 (14,4)
	umjeren	10 (10,3)
	jak	10 (10,3)
CTLA-4 (TI)	medijan (Q1-Q3;min-max)	0 (0-3;0-35)
CTLA4/IFN $\gamma$ (TI)		1 (1-3;0-55)
CTLA-4 (IM)		0 (0-1;0-26)
CTLA4/IFN $\gamma$ (IM)		0 (0-2;0-74)
CTLA-4 (LČ)		0 (0-1;0-11)
PD-L1	negativan	66 (68)
	slab	18 (18,6)
	umjeren	10 (10,3)
CD8+ T stanice	medijan (Q1-Q3;min-max)	22 (11-38;3-186)
CD68+ makrofagi	1 (nema)	48 (49,5)
	2 (oskudni)	23 (23,7)
	3 (umjereni)	13 (13,4)
	4 (gusti)	13 (13,4)
EBV	negativan	95 (98)
	pozitivan	2 (2)
MLH	negativan (mutiran)	17 (17,5)
	divlji	80 (82,5)
TP53	pozitivan (mutiran)	39 (40)
	divlji	58 (60)

CTLA-4: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom; MLH-1:MutL protein homolog 1; PD-L1: programirani ligand stanične smrti 1; SZO: Svjetska zdravstvena organizacija; TP53: tumor protein 53; EBV: Ebstein - Barr virus; IFN  $\gamma$ -interferon gama; TI: tumorski infiltrat; IM: invazivna margina; LČ: limfni čvor



## 4.2. POVEZANOST IZMEĐU PD-L1 STATUSA TUMORA, T LIMFOCITA I MAKROFAGA U ADENOKARCINOMU ŽELUCA

Ukupno 31/91 (31,9%) ispitanika imali su PD-L1-pozitivan status tumora. Na Tablici 5 prikazana je povezanost PD-L1 statusa s praćenim varijablama.

**Tablica 5. Povezanost PD-L1 statusa adenokarcinoma želuca sa praćenim varijablama**

	PD-L1 u tumorskim stanicama		p	OR (95% CI)	p log test
	Negativan (n=66)	Pozitivan (n=31)			
CTLA-4 (TI)	0: 0-4; 0-35	0: 0-2; 0-20	0,159†		
CTLA4			0,188*		
	negativan	36(54)	22(71)		
	pozitivan	30(46)	9(29)		
CTLA-4 (IM)	0:0-1;0-26	0: 0-0; 0-7	0,197†		
CTLA-4					
	negativan	45(68)	25(81)	0,301*	
	pozitivan	21(32)	6(19)		
CTLA-4 (LČ)	0:0-1;0-11	0:0-0; 0-4	0,292†		
CTLA-4					
	negativan	40(61)	15(48)	0,361*	
	pozitivan	26(39)	16(52)		
CD8+	15:9-27;3-118	39: 27-56; 3-186	<0,001†	(9,8;3,6-26)	0,001
	≥28,5	51(77)	8(26)		
	<28,5	15(23)	23(74)		
IFN-γ u tumoru			0,181*		
	negativan	40(60,6)	20(64,5)		
	slab	9(13,6)	8(25,8)		
	umjeren	7(10,6)	2(6,5)		
	jak	10(15,2)	1(3,2)		
INF-γ u metastazi			0,122*		
	negativan	60(60,6)	23(74,2)		
	slab	8(12,1)	6(19,4)		
	umjeren	9(13,6)	1(3,2)		
	jak	9(13,6)	1(3,2)		
Makrofagi			<0,001*	(13,5;4,2-43)	
	0	44(67)	4(13)		

	1,2,3	22(33)	27(87)	
MLH-1				0,236*
	mutiran	9 (14)	8(26)	
	divlji	57 (86)	23 (74)	
TP53				0,178*
	divlji	43 (65)	15 (48)	
	mutiran	23 (35)	16 (52)	

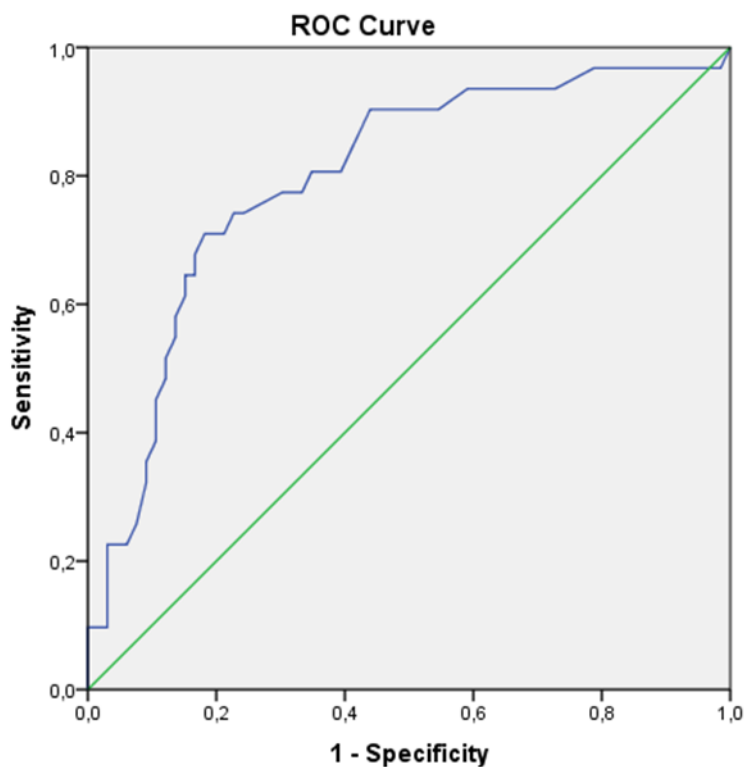
Kratice:CTLA-4: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom; MLH-1:MutL protein homolog 1; PD-L1: programirani ligand stanične smrti 1; TP53: tumor protein 53; IFN  $\gamma$ -interferon gama; TI: tumorski infiltrat; IM: invazivna margina; LČ: limfni čvor; \* $\chi^2$  test, † Mann-Whitney U test

Pozitivni PD-L1 status je povezan s većom infiltracijom makrofaga ( $\chi^2 = 32,8$ ;  $p < 0,001$ ). Umjerena i gusta infiltracija makrofaga je 7,2 i 4,8 puta češća u PD-L1-pozitivnih tumora nego u PD-L1-negativnih tumora. Slaba infiltracija makrofaga je pet puta češća kod PD-L1 negativnih tumora. Za svako povećanje gustoće infiltracije makrofaga, vjerojatnost PD-L1-pozitivnog (1, 2, 3) u usporedbi s PD-L1-negativnim nalazom povećala se 3,6 puta (OR = 3.6; 95%CI = 2,1–6,1);  $p < 0,001$ ). Prevalencija odsutne infiltracije makrofaga (0) u PD-L1-negativnim tumorima bila je pet puta veća u odnosu na prevalenciju prisutne infiltracije makrofaga (1, 2 i 3). Udio infiltracije makrofaga (1, 2, 3) u PD-L1-pozitivnom tumora bio je 2,6 puta veći od udjela makrofaga (1, 2, 3) u PD-L1 negativnim tumorima ( $\chi^2 = 22,3$ ,  $p < 0,001$ ). Vjerojatnost infiltracije makrofaga (1, 2, 3) u usporedbi s odsutnom infiltracijom makrofaga (0) bila je 13,5 puta veća u PD-L1 pozitivnim tumorima u usporedbi s PD-L1 negativnima (OR = 13,5; 95%CI: 4,2–43;  $p < 0,001$ ).

CTLA4+ T limfociti nisu povezani s izražajem PD-L1 u tumorskom infiltratu (TI), infiltrativnoj margini (IM) ( $\chi^2 = 1,7$ ;  $p = 0,188$  i  $\chi^2 = 1,1$ ;  $p = 0,301$ ) i limfnom čvoru ( $\chi^2 = 0,833$ ;  $p = 0,361$ ).

PD-L1 status je povezan s brojnošću CD8+ T stanica ( $\chi^2 = 21,3$ ;  $p < 0,001$ ) (Tablica 5). Statistički značajna povezanost potvrđena je Spearmanovim koeficijentom korelacije,  $r = 0,493$   $p < 0,001$ .

Urađena je ROC analiza da bi se pronašla granična vrijednost CD8+ za razgraničenje pozitivnih i negativnih PD-L1 statusa i ona iznosi 28,5 uz osjetljivost 74,2%, a specifičnost 74% (AuROC):0.797; SE:0,050; 95%CI: 0,699-0,895; p<0,001) (Slika 15).



**Slika 15.** Granična brojčana vrijednost CD8+ T limfocita za razlikovanje pozitivnog i negativnog PD-L1 statusa adenokarcinoma želuca.

Formirane su skupine s  $\geq 28,5$  CD8+ T stanica i  $< 28,5$  CD8+ T stanica i uspoređene s praćenim varijablama (Tablica 6). Udio slučajeva s  $< 28,5$  CD8+ T stanica bio je tri puta veći u PD-L1-negativnim nego u PD-L1 pozitivnim tumorima. Udio slučajeva s  $\geq 28,5$  CD 8+ T stanica bio je tri puta veći u karcinomima želuca s pozitivnim PD-L1 statusom nego u negativnima ( $\chi^2 = 21,3$ ;  $p < 0,001$ ). Vjerojatnost pozitivnog PD-L1 statusa u usporedbi s PD-L1 negativnim statusom u tumora s  $\geq 28,5$  CD8+ T stanica bila je 9,8 puta veća nego u tumora s  $< 28,5$  CD8+ T stanica. Nije nađena povezanost s prisustvom CTLA-4<sup>+</sup> T limfocita u tumorskom infiltratu ( $\chi^2=0,569$ ;  $p=0,451$ ), invazivnoj margini ( $\chi^2=0,001$ ;  $p=0,971$ ) i limfnom čvoru ( $\chi^2= 0,053$ ;  $p=0,819$ ). Također, nije nađena povezanost s IFN $\gamma$ /CTLA-4 T limfocitima u tumorskom infiltratu ( $\chi^2=5,4$ ;  $p=0,142$ ), invazivnoj margini ( $\chi^2=3,4$ ;  $p=0,338$ ) i limfnom čvoru ( $\chi^2=4,0$ ;  $p=0,263$ ).

**Tablica 6. Povezanost praćenih varijabli s obzirom na graničnu vrijednost CD8+ T limfocita u adenokarcinomu želuca**

Varijabla	CD8+T stanice (%)		p	OR (95%CI)	P log test
	<28,5	≥28,5			
PD-L1	51 (86)	15 (39)	<0,001	9,8 (3,3-26)	<0,001
	8 (14)	23 (61)			
CTLA-4 TI	33 (56)	25 (66)	0,451		
	26 (44)	13 (34)			
CTLA-4 IM	42 (71)	28 (74)	0,971		
	17 (29)	10 (26)			
CTLA-4 LČ	34 (58)	21 (55)	0,819		
	25 (42)	17 (45)			
CTLA-4/IFN-γ TI	-/-	25(42,4) 14(36,8)	0,142		
	+/-	11(18,6) 10(26,3)			
	-/+	8(13,6) 10(26,3)			
	+/+	15(25,4) 4(10,5)			
CTLA-4/IFN-γ IM	-/-	25(42,4) 20(52,6)	0,338		
	+/-	11(18,6) 4(10,5)			
	-/+	18(30,5) 8(21,1)			
	+/+	5(8,5) 6(15,8)			
CTLA-4/IFN-γ Č	-/-	24(40,7) 14(36,8)	0,263		
	+/-	10(16,9) 12(31,6)			
	-/+	10(16,9) 7(18,4)			
	+/+	15(25,4) 5(13,2)			

Kratice: CTLA-4: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom; PD-L1: programirani ligand stanične smrti 1; IFN γ-interferon gama; TI: tumorski infiltrat; IM: invazivna margina; LČ: limfni čvor

CTLA4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T limfociti u limfnom čvoru bili su povezani s PD-L1 u tumoru na razini značajnosti od 93% ( $\chi^2 = 7,1$ ; p= 0,069) (Tablica 7). Razdioba ispitanika po limfocitima CTLA4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> u tumorskim infiltratu u odnosu prema PD-L1 se nije statistički značajno razlikovala ( $\chi^2=1,7$ ;p=0,638). Razdioba ispitanika po limfocitima CTLA4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> u periferiji tumora u odnosu prema PD-L1 se nije statistički značajno razlikovala ( $\chi^2=1,8$ ; p=0,612) (Tablica 7).

**Tablica 7. Povezanost izražaja PD-L1 u tumoru s CTLA-4/IFN $\gamma$  limfocitima u mikrookolišu**

Zona	PD-L1		p
	Negativan	Pozitivan	
TI	CTLA-4/IFN $\gamma$		0,638
	-/-	24(36,4)	15(48,4)
	+/-	16(24,2)	5(16,1)
	-/+	12(18,2)	6(19,4)
	+/+	14(21,2)	5(16,1)
IM	CTLA-4/IFN $\gamma$		0,612
	-/-	28(42,4)	17(54,8)
	+/-	12(18,2)	3(9,7)
	-/+	18(27,3)	8(25,8)
	+/+	8(12,1)	3(9,7)
LČ	CTLA-4/IFN $\gamma$		0,069
	-/-	28(42,4)	10(32,3)
	+/-	10(15,2)	12(38,7)
	-/+	12(18,2)	5(16,1)
	+/+	16(24,2)	4(12,9)

Kratice: CTLA-4: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom; PD-L1: programirani ligand stanične smrti 1; IFN  $\gamma$ -interferon gama; TI: tumorski infiltrat; IM: invazivna margina; LČ: limfni čvor

#### 4.3. POVEZANOST IZMEĐU PD-L1 STATUSA TUMORA I PRAĆENIH VARIJABLI

PD-L1 status tumora je povezan s histološkim podtipom ( $\chi^2 = 3,97$ ; p=0,046) (Tablica 8). Proporcija difuznog podtipa je 2,2 puta veća u skupini PD-L1-negativnih tumora nego u skupini PD-L1-pozitivnih tumora. Vjerojatnost pronalaska difuznog podtipa je 3,1 puta češća

u tumora s PD-L1 negativnm statusom nego u tumora s PD-L1-pozitivnim statusom (OR = 3,1; 95% (CI): 1,18,5; p = 0,030). Nije nađena povezanost između PD-L1 i stadija bolesti. Omjer između stadija IA i IB bio je 1,7 puta veći u PD-L1 negativnim tumorima nego u PD-L1 pozitivnim tumorima; stadij u IIA i IIB su PD-L1 pozitivni tumori bili dva puta češći nego PD-L1 negativni tumori.

Ostale analizirane varijable, dob ispitanika, spol i klasifikacija po Borrmannu nisu bile povezane s PD-L1 statusom.

**Tablica 8.** Povezanost PD-L1 statusa tumora s kliničkim i patološkim varijablama

Varijabla	PD-L1 u tumorskim stanicama		p	OR(95CI)	p log test
	Negativan (n=66)	Pozitivan (n=31)			
Dob (godine)	73:64-79;46-85	(76: 67-82; 51-87)	0,181†		
Spol					
muški	47 (71)	19 (61)	0,457*		
ženski	19 (29)	12 (39)			
Lauren					
intestinalni	38 (58)	25 (81)	0,046*	(3,1; 1,1-8,5)	0,030
difuzni	28 (42)	6 (19)			
Borrmann			0,239*		
polipoidni	9 (13,6)	7 (22,6)			
gljivasti	25 (37,9)	15 (48,4)			
ulcerativni	12 (18,2)	5 (16,1)			
infiltrativni	20 (30,3)	4 (12,9)			
Stadij bolesti			0,057*		
IA, IB	11 (17)	3 (10)			
IIA, IIB	16 (24)	15 (48)			
IIIA, IIIB, IVB	39 (59)	13 (42)			

\* $\chi^2$  test, † Mann-Whitney U test

Urađena je multivarijantna logistička regresija za PD-L1 status s obzirom na histološki tip, infiltraciju makrofaga, CD8+ T stanice i TNM stadij (Tablica 9).

**Tablica 9. Rezultati multivarijantne logističke regresije (Method: „Enter“) za pozitivni PD-L1 status adenokarcinoma želuca**

Varijabla	OR(95%CI)	P
Histološki tip	0,429(0,12-1,5)	0,182
	Intestinalni*	
	Difuzni	
Makrofagi	9,8(2,7-35)	<0,001
	0*	
	1,2,3	
CD8+	7(2,3-21)	<0,001
	≤28,5*	
	>28,5	
Stadij	0,86(038,-2)	0,731
	IA, IB*	
	IIA, IIB	
	IIIA, IIIB, IVB	

\*referentni nivo

Potvrđena je povezanost između makrofaga i CD8+T stanica s PD-L1 statusom ( $p < 0,001$ , oba). Makrofagi su bili 9,8 puta zastupljeniji u PD-L1-pozitivnim nego u PD-L1-negativnim tumorima ( $p < 0,001$ ).

Iz gore napravljenih tablica razvidno je da stadij bolesti te histološki tip karcinoma nisu statistički značajno povezani s PD-L1 na razini značajnosti od 95% već na razini od 94%. Kako se radi o klinički bitnim elementima uključeni su u multivarijantnu analizu.

#### 4.4. POVEZANOST IZRAŽAJA IFN- $\gamma$ U TUMORU S KLINIČKO-PATOLOŠKIM VARIJABLAMA

Pozitivan izražaj IFN- $\gamma$  nađen je u tumorskim stanicama u 37 slučajeva. Tumori koji su izražavali IFN- $\gamma$  bili su povezani s prisutnošću CTLA4+ limfocita u limfnom čvoru ( $Z = 2,2$ ;  $p = 0,027$ ) (Tablica 10).

**Tablica 10. Povezanost IFN- $\gamma$  s CTLA-4, MLH-1 i TP 53 u limfnom čvoru**

	IFN- $\gamma$ u tumoru		P	OR(95%CI)	p log test
	Negativan (N=60)	Pozitivan (N=37)			
CTLA-4 u limfnom čvoru	0(0-1;0-10)	1(0-2;0-11)	0,027		
CTLA-4			0,059	2,4(1,1-5,6)	0,037
	<b>0</b>	39 (65)			
	<b>≥1</b>	21 (35)			
MLH-1			0,312		
Negativan (mutirani)	9(15)	8 (22)			
divlji	51(85)	29 (78)			
TP53			0,958		
	Divlji	36 (60)			
	Pozitivan (mutiran)	24 (40)			

Kratice:CTLA-4: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom; MLH-1:MutL protein homolog 1; TP53: tumor protein 53; IFN  $\gamma$ -interferon gama

Apsolutni broj CTLA4+ stanica u limfnom čvoru bio je 1,6 puta veći u IFN- $\gamma$  pozitivnim tumorima nego u IFN- $\gamma$  negativnim tumorima. S druge strane, IFN- $\gamma$  negativni tumori imali su 1,5 puta češće negativan nalaz CTLA4+ stanica u limfnom čvoru ( $\chi^2 = 3,6$ ;  $p = 0,059$ ). Omjer izgleda za prisutnost CTLA-4 je 2,4 puta veći u IFN- $\gamma$  pozitivnih tumora nego u IFN- $\gamma$  negativnih tumora (OR: 2,4; 95% CI: 1,1–5,6;  $p = 0,037$ ).



Svih 60 ispitanika s negativnim izražajem IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama imali su negativni izražaj CTLA-4<sup>+</sup>/INF- $\gamma$ <sup>+</sup> limfocita u tumorskom infiltrate i tumorskoj margini (Tablica 11). 37 IFN- $\gamma$ -pozitivnih tumora imali su CTLA-4<sup>+</sup>/INF- $\gamma$ <sup>+</sup> limfocite u tumorskim infiltrate, na invazivnoj margini i u limfnom čvoru ( $p < 0,001$  za sve).

**Tablica 11.** Povezanost izražaja IFN- $\gamma$  u tumoru s CTLA-4/ IFN $\gamma$  limfocitima u tumorskom mikrookolišu

Zona	IFN- $\gamma$ u tumoru		p	
	Negativan	Pozitivan		
TI	CTLA-4/IFN $\gamma$		<0,001	
	-/-	39 (65)		0
	+/-	21 (35)		0
	-/+	0		18 (49)
	+/+	0		19 (51)
IM	CTLA-4/IFN- $\gamma$		<0,001	
	-/-	45 (75)		0
	+/-	15 (25)		0
	-/+	0		26 (70)
	+/+	0		11 (30)
LČ	CTLA-4/IFN- $\gamma$		<0,001	
	-/-	37 (61,7)		1 (2,7)
	+/-	19 (31,7)		3 (8,1)
	-/+	2 (3,3)		15 (40,5)
	+/+	2 (3,3)		18 (28,6)

Kratice:CTLA-4: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom; IFN  $\gamma$ -interferon gama; TI: tumorski infiltrat; IM: invazivna margina; LČ: limfni čvor

#### 4.5. Povezanost gustoće makrofaga s IFN $\gamma$ /CTLA-4 u tumorskom mikrookolišu

Gustoća infiltracije makrofaga u odnosu na prisutnost CTLA-4/IFN $\gamma$  limfocita nije se razlikovala u tumorskom infiltratu ( $\chi^2=1,95$ ;  $p<0,583$ ) i na invazivnoj margini ( $\chi^2=0,857$ ;  $p<0,836$ ), a u limfnom čvoru bila je na razini značajnosti od 91% ( $\chi^2=6,5$ ;  $p<0,090$ ) (Tablica 12).

**Tablica 12. Povezanost makrofaga u tumoru s IFN- $\gamma$ /CTLA-4 limfocitima u mikrookolišu**

Zona		Makrofagi		p
		0, 1,2,3		
TI	CTLA-4/IFN- $\gamma$			0,583
	-/-	16 (33)	23 (46,9)	
	+/-	12 (25)	9 (18,4)	
	-/+	10 (20,8)	8 (16,3)	
	+/+	10 (20,8)	9 (18,4)	
IM	CTLA-4/IFN- $\gamma$			0,836
	-/-	22 (45,8)	23 (46,9)	
	+/-	6 (12,5)	9 (18,4)	
	-/+	14 (29,2)	12 (24,5)	
	+/+	6 (12,5)	5 (10,2)	
LČ	CTLA-4/IFN- $\gamma$			0,090
	-/-	20 (41,7)	18 (36,7)	
	+/-	6 (12,5)	16 (32,7)	
	-/+	9 (18,8)	8 (16,3)	
	+/+	13 (27,1)	7 (14,3)	

Kratice:CTLA-4: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom; IFN  $\gamma$ -interferon gama; TI: tumorski infiltrat; IM: invazivna margina; LČ: limfni čvor; Makrofagi: 0 odsutni, 1 slaba infiltracija, 2 periferna infiltracija, 3 jaka infiltracija

#### 4.6. Povezanost izražaja EBV, MLH-1 i TP53 s PD-L1 statusom tumora

Od ukupno 97 ispitanika samo dvoje (2%) su imali EBV+ adenokarcinom želuca pa EBV status nije uključen u daljnju statističku analizu. Negativan izražaj MLH-1 (mutirani MLH-1) nađen je u 17 (17,5 %) slučajeva, a difuzni jaki izražaj TP53 (mutirani TP53) u 39 (60 %) slučajeva (Tablica 4).

Nije dokazana statistički značajna povezanost PD-L1 statusa tumora s izražajem MLH-1 ( $\chi^2=1,4$ ;  $p=0,236$ ) ni TP53 ( $\chi^2=0,1,8$ ;  $p=0,178$ ). Nije dokazana povezanost izražaja IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama s izražajem MLH-1 ( $\chi^2=0,312$ ;  $p=0,577$ ) i TP53 ( $\chi^2=0,003$ ;  $p=0,958$ ) (Tablice 5 i 10).

Nije utvrđena međusobna povezanost izražaja MLH-1 i TP53 u adenokarcinomu želuca ( $\chi^2=0,131$ ;  $p=0,717$ ) (Tablica 13).

**Tablica 13. Povezanost izražaja MLH-1 i TP53 u adenokarcinomu želuca**

	MLH-1		p
TP53	Negativan (mutiran)	Divlji	0,717
Divlji	9 (53)	49 (61)	
Pozitivan (mutiran)	8 (47)	31 (39)	

Kratice: MLH-1:MutL protein homolog 1; TP53: tumor protein 53

#### 4.7. ANALIZA OPĆEG PREŽIVLJENJA

Do kraja praćenja umro je 71 (73%) ispitanik. Srednja dob umrlih bila je 76,6 godina (Q1–Q3: 66–85; min–max: 46–87). Prosječno preživljenje bilo je 32 mjeseca (SE: 3,2; 95% CI: 25,5-38), a medijan 17,5 mjeseci (SE: 3,9; 95% CI: 9,8–25). U Tablici 14 prikazano je opće preživljenje prema svim varijablama.

**Tablica 14. Prikaz prosječnog općeg preživljenja (SE) i medijana općeg preživljenja prema ispitivanim varijablama**

Varijabla	Preživljenje (SE) (95%CI)	Medijan preživljenja (SE) (95%CI)	LR;p
CTLA-4 (TI)			0,569;0,451
0	29(4)(22-37)	17,5(2,4;13-22)	
≥1	35(5,5;24-46)	14,5(9;1-31)	
CTLA-4 (IM)			0,001;0,976
0	31,6(3,7)(24-39)	17,5(4(9,7-25)	
≥1	32(6,5)(19,5-45)	11,3(6,8)(1-25)	
CTLA-4 (LČ)			2,2;0,137
0	26(3,7(19-33))	14,5(3,8)(7,1-22)	
≥1	37(5)(27-47)	22(6)(9,6-34)	
Spol			0,818;0,366
muški	29(3,7)(22-37)	16(4)(7,6-25)	
ženski	35(6)(24-47)	17,5(7,5)(3-32)	
Lauren			0,166;0,684
difuzni/miješani	33(4)(25-41)	16(3)(10-22)	
intestinalni	27(4)(19-36)	19(7)(6-32)	
Borrmann			2,3;0,503
polipoidni	21(5,6)(10-32)	11(2)(7-15)	
fungoidni	35(5)(25-45)	22(6)(9-35)	
ulcerativni	23(5)(13-34)	15(7)(1,6-29)	
infiltracijski	36(7)(22-49)	19(8)(3-35)	
Stadij			10,9;0,004
IA, IB	55,8(7)(42-69)		
IIA, IIB	28,3(6)(17-39)	15,7(9)(1-33)	
IIIA ,IIIB, IVB	25,6(4)(18-33)	13(2)(9-18)	

CD8+				0,967;0,326
	≤28,5	29(4)(21-37)	14,5(3)(8-20)	
	>28,5	36(5)(25,5-46)	24(11)(2-46)	
INF-γ u tumoru				3,8;0,286
	negativan	32,4(4)(24-40)	18(4)(10-26)	
	slab	24(6)(12-36)	13,5(6)(2-25)	
	umjeren	17(5)(6,6-28)	14,5(11)(0-36)	
	jak	47(12)(24-70)		
INF-γ metastaza				2,5;0,476
	negativan	32,5(4)(25-40)	22(4)(14-29)	
	slab	24(7)(9,6-38)	11(5)(1,5-20)	
	umjeren	19,9(7)(6-33)	7(7)(0-21)	
	jak	43(12)(19-67)	11	
Makrofagi				0,667;0,881
	odsutni	32(4,6)(23-41)	18,6(5)(8-29)	
	oskudni	33(6)(20-45)	16(3,6)(8,7-23)	
	umjereni	26(8)(11-41)	16(10)(0-36)	
	gusti	25(6)(13-38)	11(14)(0-38)	
Makrofagi				0,109;0,741
	odsutni	32(4,6)(23-41)	18,6(5)(8-29)	
	prisutni	31(4)(22-39)	16(3)(9-22)	
PD-L1				0,599;0,439
	0	29(4)(22-37)	14,5(4)(7-22)	
	≥1	36(6)(25-47)	30(9)(12-48)	
MLH-1				1,12; 0,289
	negativan (mutirani)	65(10)(45-85)	66(16)35-97	
	divlji	57(3)52-62	55(3) 49-61)	
TP53				0,688;0,407
	pozitivan (mutirani)	57,4(3)51-64	55(3)49-61	
	divlji	59,4(5)50-68	61(3)55-66	

Kratice:CTLA-4: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom; MLH-1:MutL protein homolog 1; PD-L1: programirani ligand stanične smrti 1; TP53: tumor protein 53; IFN γ-interferon gama; TI: tumorski infiltrat; IM: invazivna margina; LČ: limfni čvor; LR:Log rank test

Prosječno preživljenje bilo je 27,5 mjeseci dulje u stadijima IA i IB nego u IIA i IIB i 30 mjeseci duže nego u IIIA, IIIB i IVB. Stoga su vjerojatnosti 3-godišnjeg preživljenja za stadije IA i IB,

IIA, IIB i IIIA te III B i IVB 71,4% (SE = 12%), 32,3% (SE = 8,4%) odnosno 23% (SE = 6%). Nije utvrđena statistički značajna razlika u preživljenju s obzirom na izražaj MLH-1 (log rank:1,12;p=0,289) i TP53 (log rank:0,688;p=0,407)

Spearmanov koeficijent korelacije (ro) preživljenja umrlih ispitanika (n=71) s IFN- $\gamma$  tumoru nije statistički značajan i iznosi -0,162 (p = 0,176). U umrlih ispitanika nađen je značajno češće pozitivni izražaj IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama u nodalnoj metastazi, ro = -0,314 (p = 0,008).

Urađena je univarijantna analiza pokazatelja općeg preživljenja i rezultati prikazani u Tablici 15.

**Tablica 15. Univarijantna analiza pokazatelja općeg preživljenja ispitanika s operiranim adenokarcinomom želuca**

Varijabla	Zona	HR;95%CI	p
CTLA-4 (pozitivan prema negativan)	TI	0,83;051-1,5	0,452
CTLA-4 (pozitivan prema negativan)	IM	1,0; 0,6-1,7	0,976
CTLA-4 (pozitivan prema negativan)	LČ	0,698; 0,43-1,1	0,139
Spol (ženski prema muškom)		0,788; 0,46-1,3	0,367
Lauren (intestinalni prema difuznom)		1,1; 0,68-1,8	0,684
Borrmann		0,905; 0,72-1,1	0,399
	polipoidni		
	gljivasti		
	ulcerirani		
	infiltrativni		
Stadij		1,6; 1,2-2,3	0,005
	IA, IB		
	IIA, IIB		
	IIIA ,IIB, IVB		
CD8+ (visoki prema niskom)		0,785; 0,48-1,3	0,327
IFN- $\gamma$ u tumoru (pozitivni prema negativnom)		1,1; 0,67-1,7	0,770
IFN- $\gamma$ u metastazi (pozitivni prema negativnom)		1,1; 0,7-1,8	0,650
Makrofagi (pozitivni prema negativnom)		1,1; 0,6-1,7	0,741
PD-L1 (pozitivni prema negativnom)		0,905;0,7-1,2	0,440

Kratice:CTLA-4: antigen 4 povezan s citotoksičnim limfocitom; PD-L1: programirani ligand stanične smrti 1; IFN  $\gamma$ -interferon gama; TI: tumorski infiltrat; IM: invazivna margina; LČ: limfni čvor; HR: engl. *hazard ratio* omjer rizika

Rizik smrtnog ishoda raste za 1,6 puta pri svakom povišenju skupine stadija bolesti (IA, IB; IIA, IIB; IIIA, IIIB, IVB) u odnosu na prethodnu. Ako u analizu uključimo sve stadije IA-IVB, Coxovom regresijskom analizom dobiva se da rizik smrtnog ishoda raste za 1,4 puta pri svakom povećanju stadija bolesti u odnosu na prethodni stadij (HR 1,4; 95% CI 1,2–1,6;  $p < 0,001$ ).

Analizirano je opće preživljenje ispitanika s obzirom na izražaj IFN- $\gamma$  u tumoru i nodalnoj metastazi i nije nađena statistički značajna povezanost (Tablica 16).

**Tablica 16. Opće preživljenje s obzirom na izražaj IFN- $\gamma$  u tumoru i nodalnoj metastazi**

Varijabla	Preživljenje (SE) (95%CI)	Medijan preživljenja (SE) (95%CI)	LR;p
IFN- $\gamma$ u metastazi			2,5;0,476
negativan	32,5(4)(25-40)	22(4)(14-29)	
slab	24(7)(9,6-38)	11(5)(1,5-20)	
umjeren	19,9(7)(6-33)	7(7)(0-21)	
jak	43(12)(19-67)	11	
IFN- $\gamma$ u metastazi			0,707;0,401
negativan	32,5(4)(25-40)	22(4)(14-29)	
slab	24(7)(9,6-38)	11(5)(1,5-20)	
negativan i slab	31(3)(24-38)	18,6(4)(10-27)	
IFN- $\gamma$ u metastazi			1,7;0,422
negativan i slab	31(3)(24-38)	18,6(4)(10-27)	
umjeren	19,9(7)(6-33)	7(7)(0-21)	
jak	43(12)(19-67)	11	
IFN- $\gamma$ u metastazi			0,611;0,345
negativan/slab	31(3)(24-38)	18,6(4)(10-27)	
umjeren	19,9(7)(6-33)	7(7)(0-21)	
IFN- $\gamma$ u metastazi			1,11;0,291
negativan/slab/umjeren			
jak			

Kratice: IFN  $\gamma$ -interferon gama; LR:Log rank test

## **5. RASPRAVA**



Danas je razumijevanje uloge tumorskog imunog mikrookoliša u fokusu istraživanja jer se onkološko liječenje mnogih uznapredovalih karcinoma, pa tako i karcinoma želuca, sve više okreće individualiziranom pristupu i imunoterapiji. Proteini kontrolne točke na tumorskim stanicama, T stanicama i makrofagima svojim inhibitornim signaliziranjem dovode do negativne modulacije citotoksičnih T stanica, slabije protutumorske obrane i imunosne evazije tumora. U bolesnika s istim tipom karcinoma izražaj PD-L1 nije isti jer ga u svakom organizmu inducira vlastiti TME ili, mnogo rjeđe, somatska mutacija tumorskih stanica – amplifikacija *PD-L1* na kromosomu 9p24. U progresiji ranog raka želuca preko lamine muskularis u posluznicu izražaj PD-L1 jači je na invazivnoj fronti nego u centru tumora (97). Osim toga, izražaj PD-L1 je heterogen u primarnom tumoru i metastatskim limfnim čvorovima bolesnika s rakom želuca, zbog čega su nekonzistentni rezultati studija koje su ispitivale prognostičku vrijednost PD-L1 (98). Za terapijski odgovor nije bitan samo izražaj PD-L1, nego i sastav TME u kojim su prisutni citotoksični CD8+ T limfociti, makrofagi i solubilni citokini, primjerice IFN- $\gamma$ .

Pozitivni izražaj PD-L1 je prediktivni čimbenik za terapiju blokatorima kontrolne točke. U radu smo u jedinstvenoj kohorti 97 ispitanika s operiranim karcinomom želuca analizirali PD-L1 status tumora i usporedili ga s važnim sastavnicama njegova imunog mikrookoliša: CD8+ T limfocitima, makrofagima, CTLA-4+ T limfocitima i CTLA4+/IFN $\gamma$ + limfocitima.

Utvdili smo da je PD-L1 status povezan s histološkim tipom i češće izražen u intestinalnom tipu ( $p=0.046$ ). Difuzni tip je bio 3,1 puta češći u PD-L1 negativnih nego u PD-L1 pozitivnih tumora (OR = 3,1; 95% CI: 1-18,5;  $p = 0,030$ ). Mashukov i suradnici su u uzorku od 50 ispitanika s adenokarcinomom želuca utvdili PD-L1 pozitivni status tumora u 9 slučajeva, od kojih je 8 bilo intestinalnog podtipa. Autori nisu našli povezanost izražaja PD-L1 s dobi, spolom i stadijem bolesti (99). Thompson i suradnici su na operativnom uzorku 34 karcinoma želuca i GE spoja utvdili izražaj PD-L1 u četiri (12%) slučaja od kojih su tri bila intestinalnog tipa (100). Histološki tipovi karcinoma želuca razlikuju se u etiopatogenezi što može utjecati na sastav TME. Karcinom želuca intestinalnog tipa je češće povezan s izražajem PD-L1 nego difuzni tip i mucinozni karcinom, u kojima zbog slabe imunogenosti tumorskih stanica nema dovoljnog regrutiranja citotoksičnih T stanica (99,100).

Mashukov i suradnici su podijelili karcinom želuca u tri različita uzorka prema broju CD8+ T limfocita i načinu infiltracije: rijetki limfociti (engl. „desert“), limfociti rubno smješteni (engl. *brisk*) i gusta limfocitna infiltracija (engl. *inflammatory*). Prvi uzorak,

karakteriziran vrlo malim brojem CD8+ T limfocita, uglavnom se nalazi u difuznom karcinomu želuca. Drugi uzorak očituje se nakupljanjem CD8+ T limfocita rubno u peritumorskoj stromi i nalazi se u mucinoznom karcinomu. Treći uzorak je karakteriziran gustom infiltracijom limfocita koji prožimaju tumorsko tkivo, a predominantno se nalazi u intestinalnom tipu karcinoma želuca, zato nazivanog „imunološki vrući tumor“ (99,100).

Utvdili smo značajnu povezanost PD-L1 statusa i CD8+ T stanica ( $p < 0.001$ ), uz Spearmanov koeficijent korelacije od 0,493 ( $p < 0,001$ ). ROC analizom odredili smo *cut-off* vrijednost CD8+ T limfocita za razgraničenje pozitivnih i negativnih PD-L1 koji iznosi 28,5. Vjerojatnost pozitivnog PD-L1 statusa u slučajevima s  $\geq 28,5$  CD8+ T stanica je 9,8 puta veća nego u slučajevima s  $< 28,5$  CD8+ T stanica. Mashukov i suradnici su pronašli povezanost između statusa PD-L1 statusa i CD8+ T stanica i odredili vrijednost od 84 limfocita na 1 mm<sup>2</sup> za odvajanje CD8+ niske i visoke gustoće u TIM-u adenokarcinoma želuca (99). Wang i suradnici odredili su medijan od 24 CD8+ T stanica po mikroskopskom polju velikog povećanja za klasifikaciju visoke, odnosno niske citotoksične stanične infiltracije (101).

Li i suradnici podijelili su adenokarcinom želuca u dvije skupine ovisno o limfocitnom infiltratu i utvdili povezanost masivne limfocitne infiltracije s PD-L1 pozitivnim statusom tumora (83). Slično su Mashukov i suradnici pronašli povezanost guste infiltracije limfocita (nalik upali) s većim izražajem PD-L1 (99). Thompson i suradnici su dokazali da je porast broja CD8+ T stanica u tumoru povezan s izražajem PD-L1 u tumoru i u stromi (100). Koh i suradnici su prema kombinaciji izražaja PD-L1 i CD8+ T stanica kategorizirali četiri vrste TME-a (79).

Pozitivan izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama povezan je s većom infiltracijom makrofaga ( $p < 0,001$ ); za svako povećanje gustoće infiltracije makrofaga vjerojatnost PD-L1 pozitivnog statusa povećava se 3,6 puta ( $p < 0.001$ ). Upravo su makrofagi jedna od najbitnijih komponenti TME koji potiču proliferaciju tumorskih stanica, angiogenezu i limfogenezu, zbog čega imaju značajnu ulogu u formiranju metastaza karcinoma želuca. Ju i suradnici su dokazali povezanost između infiltracije makrofaga i izražaja PD-L1 u karcinomu želuca. Autori su utvdili da makrofagi otpuštaju proupalne citokine TNF- $\alpha$  i IL-6 koji induciraju izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama (102).

Multivarijantnom analizom potvrđena je povezanost između makrofaga i CD8+T stanica s PD-L1 ( $p < 0,001$ , oba), što odgovara rezultatima drugih autora (99, 102).

Nismo pronašli povezanost PD-L1 statusa s CTLA-4+ limfocitima. CTLA4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T limfociti u limfnom čvoru povezani su s PD-L1 statusom tumora na razini značajnosti od 93% (p= 0,069). U dostupnoj literaturi nismo našli sličnih analiza.

Izražaj IFN- $\gamma$  u epitelu želučane sluznice i tumorskim stanicama, utvrđen imunofluorescentnom i imunohistokemijskom metodom, bio je neočekivan nalaz u ovoj studiji. Izražaj IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama nađen je kod 37 ispitanika. IFN- $\gamma$  je solubilno pleotropni citokin kojeg proizvode T stanice i NK stanice prisutne u TME-u i nije uobičajena njegova detekcija u epitelnim i tumorskim stanicama. Slabi imunohistokemijski izražaj je prisutan u mukoznom epitelu usne šupljine, pluća i želuca, ali je prema Proteinskom atlasu slabo praćen izražajem *IFN- $\gamma$  mRNA* (96). Uloga IFN- $\gamma$  u promociji karcinoma želuca je kontroverzna, uz napomenu kako je proinflamatorno pojačan u želučanoj sluznici nakon kronične *H. pylori* infekcije, a s druge strane ima imunosupresivnu aktivnost. IFN- $\gamma$  ima protumorsku i antitumorsku ulogu koje su vremenski odvojene: u početku djeluje antiproliferativno, antiangiogeno i proapoptotički na neoplastične stanice, a kasnije izaziva povećani izražaj PD-L1 i drugih inhibicijskih molekula poput CTLA-4, što u konačnici dovodi do tumorskog izbjegavanja imunološke reakcije. U literaturi smo pronašli nekoliko članaka o izražaju IFN- $\gamma$  u epitelnim stanicama. Xu i suradnici otkrili su povišenu regulaciju IFN- $\gamma$  u reseciranom tkivu karcinoma želuca (103). U kulturi stanica želučanog karcinoma IFN- $\gamma$  stimulira signalni put nuklearnog čimbenika NF- $\kappa$ B i pojačava proliferaciju, migraciju i invaziju, zbog čega bi inhibicija IFN- $\gamma$  mogla biti neophodna u liječenju karcinoma želuca. Mimura i suradnici su otkrili kako *in vitro* IFN- $\gamma$  stimulira izražaj PD-L1 putem signalnog puta janus kinaze (JAK/STAT) i aktivatora transkripcijskog puta i tako suprimira citotoksičnost CD8<sup>+</sup> T limfocita protiv tumorskih stanica (104). Eksperimentalne studije pokazale su kako IFN- $\gamma$  u želučanoj sluznici može inducirati metaplaziju ili smrt epitelnih stanica (105).

U našem uzorku je izražaj IFN- $\gamma$  bio povezan s prisutnošću CTLA4<sup>+</sup> limfocita u limfnom čvoru (Z = 2.2; p = 0.027) jer je omjer izgleda za prisustvo CTLA-4 bio 2,4 puta veći kod IFN- $\gamma$  pozitivnih tumora nego kod IFN- $\gamma$  negativnih tumora (p = 0,037). Utvrdili smo povezanost IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama s CTLA4<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T limfocitima u tumorskom infiltratu, invazivnoj margini tumora i pripadajućem limfnom čvoru (p < 0.001 za sve). U literaturi nismo našli sličnih rezultata za usporedbu.

Nismo pronašli povezanost izražaja IFN- $\gamma$  u tumoru s PD-L1 statusom tumora. Imai i suradnici su otkrili kako IFN- $\gamma$  stimulira izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama *in vitro* i povećan je u serumu bolesnika s karcinomom želuca u IV stadiju bolesti (106). Mao i suradnici

su u metaanalizi 22 studije pokazali kako serumska razina IFN- $\gamma$  prije liječenja, za razliku od IL-6 i IL-8, nije prediktor lošijeg OS-a u ispitanika s karcinomom želuca liječenih inhibitorima imunoloških kontrolnih točaka (106). Sancez-Zaucha i suradnici su predložili IL-6, IL-10 i IFN- $\gamma$  kao potencijalne dijagnostičke biljege u karcinomu želuca zbog njihove značajno više razine u cirkulaciji bolesnika s karcinomom želuca u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (107). Zajedno s IL-10 IFN- $\gamma$  bi mogao biti od koristi u dijagnosticiranju ranog stadija karcinoma želuca.

U studiji smo analizirali prisutnost EBV te status MLH-1 i TP53 kao nekih od čimbenika koji prema TCGA karakteriziraju molekularne genotipove adenokarcinoma želuca (34).

EBV je prvi poznati onkogeni virus, izoliran u stanicama Burkittova limfoma, a kasnije u drugim tumorima, uključujući adenokarcinom želuca (108). S EBV-om povezani karcinomi želuca imaju različite kliničke i patološke karakteristike, ali povoljniju prognozu, primarno zbog dobrog odgovora na imunoterapiju. Park i suradnici su opisali adenokarcinom želuca u kojem su bile EBV pozitivne i EBV negativne zone tumorskih stanica. S obzirom da su sve tumorske stanice imale iste genske mutacije, autori smatraju da su EBV negativne zone posljedica gubitka EBV genoma tijekom progresije tumora (109). Serumski titar EBV DNA smanji se nakon gastrektomije i kemoterapije i naraste tijekom progresije bolesti. Ribeiro i suradnici nisu našli značajnu povezanost EBV-a s mutacijom *TP53* u adenokarcinomu želuca i smatraju da su drugi mehanizmi, poput epigenetske modulacije, odgovorni za deregulaciju *TP53* (110).

Karakteristika EBV+ adenokarcinoma želuca je masivna infiltracija limfocitima koji oslobađaju INF- $\gamma$ , a ovaj potiče izražaj PD-L1 na tumorskim stanicama i makrofagima. Pojačan izražaj PD-L1 dovodi do aresta G0/G1 faze, odnosno inhibicije proliferacije T limfocita (111). Sasaki i suradnici dokazali su kako se arest G0/G1 faze može spriječiti primjenom anti-PD-L1 protutijela (111). Budući da adenokarcinomi želuca s EBV+ genotipom ili negativnim MLH-1 genotipom pokazuju odgovor na imunoterapiju, dokaz EBV u tumorskim stanicama ili negativan izražaj MLH-1 mogu biti prediktivni biljezi za primjenu imunoterapije u liječenju metastatske bolesti (92,112). U našoj kohorti samo su dva ispitanika imala EBV+ karcinom želuca u proksimalnoj regiji želuca, s pozitivnim izražajem PD-L1 i bogati limfocitima u mikrokolišu, ali zbog malog broja nisu dalje statistički analizirani.

MSI-H fenotip karcinoma želuca povezan je s hipermetilacijom promotora gena *MLH-1* zbog čega je negativan izražaj njegova proteina MLH-1. Epigenetska disregulacija dovodi do zloćudne transformacije epitela želučane sluznice (113). U studijama Pereira i suradnici i Sun i suradnici dokazana je statistički značajna povezanost MSI-H s izražajem PD-L1 (114,115). U našoj kohorti negativni izražaj MLH-1 utvrđen je u 17,5% ispitanika i nije bio povezan s PD-L1 statusom tumora. Prema literaturi bolesnici s MSI-H genotipom imaju bolju prognozu u odnosu na bolesnike s MSI-L ili MSS tumorom (113-115). U našoj studiji imunohistokemijski izražaj MLH-1, jednog od MSI proteina, nije imao statistički značajan utjecaj na opće preživljenje. Također, nije nađena povezanost s izražajem TP53 u tumorskim stanicama.

TP53 je tumorsupresorski protein odgovoran za indukciju apoptoze, a njegovo je deaktiviranje u karcinogenezi vrlo često. Imunohistokemijski se izražaj mutiranog TP53 nalazi u tumorskim stanicama 13 - 54% bolesnika s karcinomom želuca (116). U našoj studiji mutirani TP53 nađen je u nešto većem udjelu, u 39 (40%) ispitanika. Yildirim i suradnici proveli su metaanalizu na ukupno 21 studije, odnosno 4330 ispitanika (116). Prema tom radu povećani izražaj TP53 značajno je povezan s lošijom prognozom, odnosno kraćim ukupnim preživljenjem, ali nije s preživljenjem bez povrata bolesti. Rezultati u našoj kohorti nisu pokazali značajni utjecaj izražaja TP53 u tumorskim stanicama na opće preživljenje ispitanika. Različite studije pokazale su kontradiktorne rezultate s obzirom na prognostički značaj TP53 (117,118).

U studijama različitih karcinoma ispitana je povezanost izražaja TP53 s PD-L1 statusom (119, 120). Liu i suradnici dokazali su povezanost TP 53 s izražajem PD-L1 ( $p=0.015$ ) kod ispitanika s karcinomom želuca (121). U našoj kohorti nismo našli povezanost između TP53 i PD-L1 statusa.

Do završetka praćenja umrlo je 73% ispitanika. Rizik od smrti povećavao se za 1,4 puta sa svakim povećanjem stadija bolesti u usporedbi s prethodnim ( $p < 0.001$ ). Nismo utvrdili utjecaj PD-L1 statusa i infiltracije CD8+ T limfocitima na ishod bolesti. U studiji iz 2016. Lai i suradnici dokazali su povezanost PD-L1 statusa s agresivnošću tumora i nepovoljnim ishodom (83). U skupini umrlih kraće preživljenje imali su ispitanici koji su imali pozitivni izražaj IFN- $\gamma$  u nodalnoj metastazi ( $p=0.008$ ). Za taj rezultat nismo našli odgovarajućih referenci.

Koh i suradnici utvrdili su da PD-L1 status nema utjecaja na opće preživljenje, ali u kontekstu s CD8+ T limfocitima, ispitanici s PD-L1-/CD8+ uzorkom imaju najduže opće preživljenje i ispitanici s PD-L1+/-/CD8+ uzorkom najkraće (79). Oki i suradnici pokazali su

da je u operiranih bolesnika pozitivan PD-L1 status u adenokarcinomu želuca povezan s lošijom prognozom (122). Prema Liu i suradnicima te Koh i suradnicima pozitivan PD-L1 status i visoki udio CD8+ stanica označava bolesnike s najvećim rizikom i najlošijim preživljenjem te bi njihovo liječenje trebalo usmjeriti prema imunoterapiji (83,79). Wu je dokazao povezanost PD-L1 s veličinom tumora, tumorskom invazijom, zahvaćenosti limfnih čvorova i kraćim preživljenjem (84). Thompson i suradnici dokazali su kako su PD-L1 pozitivne tumorske/stromalne stanice i visoki udio CD8+ stanica ( $>500/\text{mm}^2$ ) povezani s nižim PFS i OS u svim stadijima karcinoma želuca (100). Namvar i suradnici dokazali su na 70 ispitanika s nemetastatskim karcinomom želuca intestinalnog tipa povezanost izražaja PD-L1 s lošijim preživljenjem, iako su se lokacija tumora, stadij bolesti i ekstracelularni mucin bili najznačajniji prognostički čimbenici (123).

Prema studiji provedenoj u SAD-u više od četvrtine bolesnika s uznapredovalim ili metastatskim karcinomom želuca ne prima nikakvu sistemsku terapiju. Od preostalih liječenih bolesnika 50% dopiše do druge, a samo 20% do treće linije terapije, što jasno ukazuje kako su potrebni novi, uspješniji i podnošljiviji lijekovi (94,124). Stopa odgovora na imunoterapiju inhibitorima na kontrolne točke PD-L1, PD-1 i CTLA-4 iznosi oko 20 - 40% (105). Prema tome, identificiranje biljega za bolji odabir bolesnika koji reagiraju na imunoterapiju je od presudne važnosti. Potencijalna obećavajuća terapija jest cjepivo protiv PD-L1 koje blokira interakciju PD-1/PD-L1 (125).

U zaključku, u ovom radu dokazali smo povezanost izražaja PD-L1 u tumorskim stanicama s makrofagima i CD8+ T limfocitima u tumorskom imunom mikrookolišu te povezanost izražaja IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama s CTLA-4 T limfocitima i CTLA-4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T limfocitima. Nismo našli povezanost PD-L1 statusa s MLH-1 i TP53 kao biljezima molekularne genotipske klasifikacije adenokarcinoma želuca. Nedostatak rada je manjak dokaza izvedenih sofisticiranim metodama kao što su protočna citometrija za analizu CTLA4 i CTLA4/IFN- $\gamma$  T limfocita i molekularna genetika sekvencionerom nove generacije za klasifikaciju molekularnog genotipa, što bi u budućem radu trebalo učiniti. Znanstvena novina rada je što pruža mikroskopski uvid u imuni mikrookoliš adenokarcinoma želuca u jedinstvenoj kohorti operiranih bolesnika iz jedne ustanove. Istraživanja međustaničnih i molekularnih interakcija u tumorskom imunom mikrookolišu zasigurno vode u nove modalitete personaliziranog liječenja raka temeljene na njegovim biološkim karakteristikama.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Pozitivni PD-L1 status je statistički značajno povezan s intestinalnim tipom karcinoma želuca.
2. Izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama je statistički značajno povezan s brojem CD8+T stanica i gustoćom infiltracije makrofaga u tumorskom mikrookolišu.
3. 28,5 CD8+ T limfocita je granična vrijednost u predviđanju PD-L1 pozitivnih adenokarcinoma želuca (AuROC 0,797, osjetljivost 74,2%, specifičnost 77,3%).
4. Izražaj IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama povezan je s prisutnošću CTLA-4 stanica u limfnom čvoru i CTLA4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T stanica u tumorskom mikrookolišu i drenažnom limfnom čvoru.
5. Izražaj TP53 i MLH-1 nisu povezani s PD-L1 statusom adenokarcinoma želuca.
6. Status PD-L 1 nije povezan s općim preživljenjem.
7. Od svih analiziranih varijabli samo stadij bolesti utječe na opće preživljenje.



## **7. SAŽETAK**

Liječenje karcinoma želuca uključuje gastrektomiju i kemoradioterapiju. Tumorski imuni mikrokoliš (TIM) ima implikaciju za moguću imunoterapiju. Analizirali smo PD-L1 status karcinoma želuca i usporedili s brojem CD8+ T-limfocita, gustoćom infiltracije makrofaga i brojem CTLA-4 T-stanica te ostalim kliničko-patološkim pokazateljima.

Studija je obuhvatila 97 ispitanika podvrgnutih gastrektomiji/limfadenektomiji zbog adenokarcinoma želuca od 2014. do 2018. u KBC Split. Klinički podatci prikupljeni su iz bolničke pismohrane, a parafinski blokovi tumorskog tkiva i drenažnog limfnog čvora iz arhive Zavoda za patologiju. Urađeno je dvostruko imunohistokemijsko bojenje s PD-L1 i CD8, dvostruko imunofluorescentno bojenje s CTLA-4 i IFN- $\gamma$  i imunohistokemijsko bojenje s TP53 i MLH-1 na histološkim preparatima i in situ hibridizacija EBER na tkivnim mikronizovima. Statistička značajna razlika bila je  $p < 0,05$ .

Pozitivni PD-L1 status povezan je s intestinalnim tipom ( $p = 0,046$ ), gustoćom makrofaga i CD8 + T stanica u tumorskom mikrookolišu (oba  $p < 0,00$ ). Medijan broja CD8+ T stanica bio je veći u PD-L1-pozitivnih nego u negativnih tumora. Granica od 28,5 CD8 + T stanica u 1 VPVP predviđa PD-L1-pozitivne tumore (AuROC 0,797, osjetljivost 74,2%, specifičnost 77,3%). Pozitivni izražaj IFN- $\gamma$  u tumorskim stanicama je nađen u 37 karcinoma želuca i povezan je s CTLA4+ T limfocitima u limfnom čvoru ( $p = 0,027$ ) te CTLA4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T limfocitima u tumoru i limfnom čvoru (svi  $p < 0,001$ ). Medijan općeg preživljenja (OS) bio je 17 mjeseci. U skupini umrlih izražaj IFN- $\gamma$  u nodalnoj metastazi je povezan s kraćim OS ( $p = 0,008$ ).

Izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama povezan je s CD8 + T stanicama i makrofagima u TIM-u, a izražaj IFN- $\gamma$  sa supresivnim CTLA4<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T stanicama u TIM-u i drenažnom limfnom čvoru.

## **8. SUMMARY**

## **RELATIONSHIP OF TUMOR IMMUNE MICROENVIRONMENT WITH PD-L1 STATUS OF OPERABLE GASTRIC CARCINOMA**

Treatment of gastric cancer (GC) includes gastrectomy and chemoradiotherapy. The tumor immune microenvironment (TIM) has implications for potential immunotherapy. We analyzed the PD-L1 status of GC and compared it with the number of CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes, the density of macrophage infiltration and the number of CTLA-4 T-cells and other clinical-pathological parameters.

The research included 97 patients who underwent gastrectomy/lymphadenectomy due to GC from 2014 to 2018 at University Hospital Split. Clinical data were collected from hospital records. Paraffin blocks of tumor tissue and draining lymph nodes were collected from the archives of the Department of Pathology. Immunohistochemistry (IHC) with TP53 and MLH-1 antibodies, double IHC with CD8 and PD-L1 antibodies, double immunofluorescence with CTLA-4 IFN- $\gamma$  antibodies and in situ hybridization with EBER probe were performed. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

Positive PD-L1 status was associated with intestinal type ( $p = 0.046$ ), density of macrophages and CD8 + T cells ( $p < 0.001$ , both). The median number of CD8<sup>+</sup> T cells was higher in PD-L1-positive than in negative tumors. A cutoff of 28.5 CD8 + T cells in one high-magnification field predicted PD-L1-positive tumors (AuROC 0.797, sensitivity 74.2%, specificity 77.3%). IFN- $\gamma$  expression in tumor cells was found in 37 GCs and was positively associated with CTLA4<sup>+</sup> T lymphocytes in the lymph node ( $p = 0.027$ ), as well as CTLA4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T lymphocytes in the tumor and lymph node (all  $p < 0.001$ ). Median overall survival (OS) was 17 months. In those who died, IFN- $\gamma$  expression in nodal metastases was associated with shorter OS ( $p = 0.008$ ).

PD-L1 expression in tumor cells is associated with CD8 + T cells and macrophages in the TME, and IFN- $\gamma$  in tumor cells with CTLA4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells in the tumor and draining lymph node.

## **9. POPIS LITERATURE**

1. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. 2020. Dostupno na: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death> [13.6.2023.]
2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/today> [13.6.2023.]
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3):209-249.
4. Thrift AP, El-Serag HB. Burden of Gastric Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020; 18:534-542.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak republike Hrvatske 2020. 2022: bilten 45
6. Li J, Kuang XH, Zhang Y, Hu DM, Liu K. Global burden of gastric cancer in adolescents and young adults: estimates from GLOBOCAN 2020. *Public Health.* 2022; 210:58-64.
7. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of stomach cancer. *World J Gastroenterol.* 2022; 28:1187-1203.
8. Morgan E, Arnold M, Camargo MC, Gini A, Kunzmann AT, Matsuda T i sur. The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020-40: A population-based modelling study. *EclinMed.* 2022; 47:101404.
9. Tanaka K, Kiyohara Y, Kubo M, Matsumoto T, Tanizaki Y, Okubo K, i sur. Secular trends in the incidence, mortality, and survival rate of gastric cancer in a general Japanese population: the Hisayama study. *Cancer Causes Control* 2005; 16: 573-578.
10. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive System Tumours. 5. izdanje 2019; str. 60-104.
11. Colquhoun A, Arnold M, Ferlay J, Goodman KJ, Forman D, Soerjomataram I. Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. *Gut.* 2015; 64:1881-8.
12. Ford AC, Forman D, Hunt RH, Yuan Y, Moayyedi P. Helicobacter pylori eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2014; 348: g3174.
13. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2012;100:1-441.
14. Salvatori S, Marafini I, Laudisi F, Monteleone G, Stolfi C. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Pathogenetic Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2023; 24:2895.

15. Nagase L, Hayasi T, Senda T, Hatakeyama M. Dramatic increase in SHP2 binding activity of *Helicobacter pylori* Western CagA by EPIYA-C duplication: its implications in gastric cancer. *Scientific Reports* 2015; 15749.
16. Katičić M, Duvnjak M, Filipec Kanižaj T, Krznarić Ž, Marušić M, Mihaljević S. Hrvatski postupnik za dijagnostiku i terapiju infekcije *Helicobacterom pylori*. *Liječ Vjesn* 2014;136:1-8.
17. Mišak Z, Hojsak I, Despot R, Jadrešin O, Kolaček S, Konjik V i sur. Smjernice za dijagnozu i liječenje infekcije *Helicobacterom pylori* u djece i adolescenata. *Liječ Vjesn* 2022; 144:197-206.
18. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT i sur. European *Helicobacter* and Microbiota Study Group and Consensus panel. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017; 66:6-30.
19. Tonkić A, Tonkić M, Brnić D. Increasing prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains in Split, Croatia. *J Chemother*. 2009; 2:598-9.
20. Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, Graham DY, El-Omar EM, Miura S i sur. Consensus Conference. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*. 2015; 64:1353-67.
21. Camargo MC, Murphy G, Koriyama C, Pfeiffer RM, Kim WH, Herrera-Goepfert R i sur. Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *Br J Cancer*. 2011;105:38-43.
22. Hirabayashi M, Georges D, Clifford GM, de Martel C. Estimating the Global Burden of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2023; 21:922-930.e21.
23. Ford AC, Forman D, Hunt R, Yuan Y, Moayyedi P. *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;CD005583.
24. Jukic I, Vukovic J, Rusic D, Bozic J, Bukic J, Leskur D i sur. Adherence to Maastricht V/Florence consensus report for the management of *Helicobacter pylori* infection among primary care physicians and medical students in Croatia: A cross-sectional study. *Helicobacter*. 2021; 26: e12775.
25. Dinis-Ribeiro M, Areia M, de Vries AC, Marcos-Pinto R, Monteiro-Soares M, O'Connor A i sur. MAPS Participants; European Society of Gastrointestinal Endoscopy; European *Helicobacter* Study Group; European Society of Pathology; Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva. Management of precancerous conditions and lesions in the stomach

- (MAPS): guideline from the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter Study Group (EHSg), European Society of Pathology (ESP), and the Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED). *Virchows Arch.* 2012; 460:19-46.
26. Fock KM, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, Talley NJ i sur. Second Asia-Pacific Conference. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for Helicobacter pylori infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24: 1587-1600.
27. de Vries AC, van Grieken NC, Looman CW, Casparie MK, de Vries E, Meijer GA i sur. Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands. *Gastroenterology.* 2008; 134:945-52.
28. Pimentel-Nunes P, Libânio D, Marcos-Pinto R, Areia M, Leja M, Esposito G, i sur. Management of epithelial precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS II): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), European Society of Pathology (ESP), and Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED) guideline update 2019. *Endoscopy.* 2019(4):365-388.
29. Hamashima C, Shibuya D, Yamazaki H, Inoue K, Fukao A, Saito H, i sur. The Japanese guidelines for gastric cancer screening. *Jpn J Clin Oncol.* 2008;38:259-67
30. Šeparović R, Vazdar Lj, Tečić Vuger A, Pavlović M, Gnjidić M, Prejac J i sur. Smjernice za provođenje dijagnostičkih pretraga prije početka liječenja onkološkog bolesnika - kliničke preporuke hrvatskog društva za internističku onkologiju HLZ. *Liječ Vjesn* 2018; 140:77-19.
31. Lordick F, Carneiro F, Cascinu S, Fleitas T, Haustermans K, Piessen G, i sur. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2022 ;33:1005-1020.
32. Taberno J, Cervantes A, van Halteren H. ESMO:gastrointestinal tract tumours, essentials for clinicians. 3.izdanje. Lugano, Švicarska. ESMO Press, 2018.
33. Wang L, Wang X, Kou H, He H, Lu M, Zhou L, Yang Y. Comparing single oral contrast-enhanced ultrasonography and double contrast-enhanced ultrasonography in the preoperative Borrmann classification of advanced gastric cancer. *Oncotarget.* 2017;9:8716-8724.
34. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513: 202-209.
35. Bonelli P, Borrelli A, Tuccillo FM, Silvestro L, Palaia R, Buonaguro FM. Precision medicine in gastric cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2019;11:804-829.
36. Gonzalez RS, Messing S, Tu X, McMahon LA, Whitney-Miller CL. Immunohistochemistry as a surrogate for molecular subtyping of gastric adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2016



- Oct;56:16-33. 36. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, i sur. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med.* 2015 ;21:449-56.
37. Haffner I, Schierle K, Raimúndez E, Geier B, Maier D, Hasenauer J i sur. HER2 Expression, Test Deviations, and Their Impact on Survival in Metastatic Gastric Cancer: Results from the prospective multicenter VARIANZ Study. *J Clin Oncol.* 2021; 39:1468-1478.
38. Cho J, Lee J, Bang H, Kim ST, Park SH, An JY, i sur. Programmed cell death-ligand 1 expression predicts survival in patients with gastric carcinoma with microsatellite instability. *Oncotarget* 2017; 8:13320-8
39. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, i sur. Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143:330-337.
40. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland BK, Washington MK i sur.: *AJCC Cancer Staging Manual.* 8th ed. New York: Springer International Publishing; 2017.
41. López Sala P, Leturia Etxeberria M, Inchausti Iguíñiz E, Astiazaran Rodríguez A, Aguirre Oteiza MI i sur. Gastric adenocarcinoma: A review of the TNM classification system and ways of spreading. *Radiologia (Engl Ed).* 2023; 65:66-80.
42. Young J, Pahwa A, Patel M, Jude CM, Nguyen M, Deshmukh M i sur. Ligaments and lymphatic pathways in gastric adenocarcinoma. *Radiographics.* 2019; 39:668-89.
43. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer.* 2011;14:101-12.
44. Bišof V, Juretić A, Omrčen T, Pleština S, Boban M, Krznarić i sur. Kliničke preporuke za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka želuca. *Liječ Vjesn* 2018; 140:285-292.
45. Eom SS, Choi W, Eom BW, Park SH, Kim SJ, Kim YI, i sur. A Comprehensive and Comparative Review of Global Gastric Cancer Treatment Guidelines. *J Gastric Cancer.* 2022; 22:3-23.
46. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2018 5. izdanje. *Gastric Cancer.* 2021; 24:1-21.
47. Niknam N, Obanor S, Lee LA. Endoscopic methods for the detection and treatment of gastric cancer. *Curr Opin Gastroenterol.* 2022; 38:436-442.

48. Marano L, Carbone L, Poto GE, Restaino V, Piccioni SA, Verre L i sur. Extended Lymphadenectomy for Gastric Cancer in the Neoadjuvant Era: Current Status, Clinical Implications and Contentious Issues. *Curr Oncol.* 2023; 30:875-896.
49. Romario UF, Ascari F, De Pascale S. GIRCG. Implementation of the ERAS program in gastric surgery: a nationwide survey in Italy. *Updates Surg.* 2023; 75:141-148.
50. Van Cutsem E; Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C i sur. A phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: A report of the V325 study group. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24:4991-4997.
51. Yamada Y, Boku N, Mizusawa J, Iwasa S, Kadowaki S, Nakayama N i sur. Docetaxel plus cisplatin and S-1 versus cisplatin and S-1 in patients with advanced gastric cancer (JCOG1013): an open-label, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2019; 4:501-510.
52. Yu JJ. Role of Adjuvant Radiotherapy in Gastric Cancer. *J Gastric Cancer.* 2023; 23:194-206.
53. Al-Batran SE, Hartmann JT, Probst S, Schmalenberg H, Hollerbach S, Hofheinz R i sur. Phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil, leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *J Clin Oncol.* 2008; 26:1435-1442.
54. Janjigian YY, Kawazoe A, Yañez P, Li N, Lonardi S, Kolesnik O i sur. The KEYNOTE-811 trial of dual PD-1 and HER2 blockade in HER2-positive gastric cancer. *Nature.* 2021; 600:727-730.
55. Sepúlveda C, Marlin A, Yoshida T et al. Palliative Care the World Health Organization's global perspective. *J Pain Symptom Manage* 2002; 24:91-6.
56. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol.* 2020;30: R921-R925.
57. Kumar V, Abas AK, Aster J. *Robbins Basic Pathology.* 10. izdanje Elsevier. str. 223-228.
58. Rallis KS, Hillyar CRT, Sideris M, Davies JK. T-cell-based Immunotherapies for Haematological Cancers, Part A: A SWOT Analysis of Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) and Bispecific T-Cell Engagers (BiTEs). *Anticancer Res.* 2021;41:1123-41.
59. Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, Yatabe Y, Hirsch FR. IASLC atlas of PD-L1. Immunohistochemistry testing in lung cancer. IASLC 2017. Aurora, Colorado, USA.

60. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992; 11:3887–3895.
61. Leach DR., Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.*1996;271:1734-1736.
62. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG., Butler M, Seiden MV i suradnici. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA.*2003; 100:4712-4717.
63. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood.* 2018;131:58-67.
64. Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol.*2005; 17: 133-144.
65. Zaidi MR. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research.*2019; 39:30-38.
66. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer.* 2021;12:2735-2746.
67. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science.* 2015;348:56-61
68. Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38:255
69. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:749-95
70. Kita M. Role of IFN-gamma in nonviral infection. *Nihon Rinsho* 2006; 64:1269-74.
71. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol.* 2018; 9:847.
72. Alspach E, Lussier DM, Schreiber RD. Interferon  $\gamma$  and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019; 11: a 028480.
73. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, I sur. IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest.* 2017;127:2930-2940.
74. He Z, Zhang S. Tumor-Associated Macrophages and Their Functional Transformation in the Hypoxic Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2021; 12:741305.

75. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology* 2019, 8, 1596004.
76. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441:235-8.
77. Prendergast GC, Mondal A, Dey S, Laury-Kleintop LD, Muller AJ. Inflammatory reprogramming with IDO1 inhibitors: turning immunologically unresponsive 'cold' tumors 'hot'. *Trends Cancer*.2018; 4:38–58.
78. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. Harmonization of the evaluation of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an international TILs-working group 2014. *Ann Oncol*. 2015; 26:259–71.
79. Koh J, Ock CY, Kim JW, Nam SK, Kwak Y, Yun S, et al. Clinicopathologic implications of immune classification by PD L1 expression and CD8 positive tumor infiltrating lymphocytes in stage II and III gastric cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8:26356-26367.
80. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2010; 235:172–89.
81. He Y, Rivard CJ, Rozeboom L, Yu H, Ellison K, Kowalewski A., et al. Lymphocyte-activation gene-3, an important immune checkpoint in cancer. *Cancer Sci*. 2016; 107:1193–7.
82. Teng MW, Ngiew SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015;75:2139-45.
83. Li Z, Lai Y, Sun L, Zhang X, Liu R, Feng G, et al. PD-L1 expression is associated with massive lymphocyte infiltration and histology in gastric cancer. *Hum Pathol*. 2016; 55: 182–189.
84. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem*. 2006; 108:19–24.
85. Kang YK, Chen LT, Ryu MH, Oh DY, Oh SC, Chung HC, et al. Nivolumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in patients with HER2-negative, untreated, unresectable advanced or recurrent gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ATTRACTION-4): a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2022 ;23:234-247.

86. Kang Y-K, Boku N, Satoh T, Ryu M-H, Chao Y, Kato K, I sur. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;390:2461–71.
87. Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, Garrido M, Salman P, Shen L, I sur. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2021;398:27-40.
88. Kim JH, Ryu MH, Park YS, Ma J, Lee SY, Kim D, I sur. Predictive biomarkers for the efficacy of nivolumab as  $\geq 3^{\text{rd}}$ -line therapy in patients with advanced gastric cancer: a subset analysis of ATTRACTION-2 phase III trial. *BMC Cancer*. 2022; 22:378.
89. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, I sur. Safety and efficacy of Pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction Cancer: phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. *JAMA Oncol*. 2018;4:e180013.
90. Shitara K, Van Cutsem E, Bang YJ, Fuchs C, Wyrwicz L, Lee KW, I sur. Efficacy and Safety of Pembrolizumab or Pembrolizumab Plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone for Patients With First-line, Advanced Gastric Cancer: The KEYNOTE-062 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6:1571-1580.
91. Fuchs CS, Özgüroğlu M, Bang YJ, Di Bartolomeo M, Mandala M, Ryu MH, I sur. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated PD-L1-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer: 2-year update of the randomized phase 3 KEYNOTE-061 trial. *Gastric Cancer*. 2022;25:197-206.
92. Chao J, Fuchs CS, Shitara K, Tabernero J, Muro K, Van Cutsem E, I sur. Assessment of Pembrolizumab Therapy for the Treatment of Microsatellite Instability-High Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer Among Patients in the KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 Clinical Trials. *JAMA Oncol*. 2021;7:895-902.
93. Janjigian YY, Kawazoe A, Yañez P, Li N, Lonardi S, Kolesnik O, I sur. The KEYNOTE-811 trial of dual PD-1 and HER2 blockade in HER2-positive gastric cancer. *Nature*. 2021 ;600:727-730.
94. Schlintl V, Huemer F, Rinnerthaler G, Melchardt T, Winder T, Reimann P, I sur. Checkpoint inhibitors in metastatic gastric and GEJ cancer: a multi-institutional retrospective analysis of real-world data in a Western cohort. *BMC Cancer*. 2022;22:51.

95. Kono K, Nakajima S, Mimura K. Current status of immune checkpoint inhibitors for gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2020;23:565-578.
96. The human protein atlas. Dostupno na: <https://www.proteinatlas.org/> [13.06.2023.]
97. Ubukata Y, Ogata K, Sohda M, Yokobori T, Shimoda Y, Handa T I suradnici. Role of PD-L1 Expression during the Progression of Submucosal Gastric Cancer. *Oncology*. 2021;99(1):15-22.
98. Gao Y, Li S, Xu D, Chen S, Cai Y, Jiang W I suradnici. Prognostic value of programmed death-1, programmed death-ligand 1, programmed death-ligand 2 expression, and CD8(+) T cell density in primary tumors and metastatic lymph nodes from patients with stage T1-4N+M0 gastric adenocarcinoma. *Chin J Cancer*. 2017 Jul 29;36(1):61.
99. Mashukov A, Shapochka D, Seleznov O, Kobyljak N, Falalyeyeva T, Kirkilevsky. Histological differentiation impacts the tumor immune microenvironment in gastric carcinoma: Relation to the immune cycle. *World J. Gastroenterol*. 2021; 27: 5259-71.
100. Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, Cornish T, Cuka N, Abdelfatah E i sur. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut*. 2017; 66:794-801.
101. Wang W, Wang K, Chen Z, Chen L, Guo W, Liao P i sur. Immunoclassification characterized by CD8 and PD-L1 expression is associated with the clinical outcome of gastric cancer patients. *Oncotarget* 2018; 9:12164-73.
102. Ju X, Zhang H, Zhou Z, Chen M, Wang Q. Tumor-associated macrophages induce PD-L1 expression in gastric cancer cells through IL-6 and TNF- $\alpha$  signaling. *Exp Cell Res*. 2020; 396:112315.
103. Xu YH, Li ZL, Qiu SF. IFN- $\gamma$  Induces Gastric Cancer Cell Proliferation and Metastasis Through Upregulation of Integrin  $\beta$ 3-Mediated NF- $\kappa$ B Signaling. *Transl Oncol*. 2018;11:182-192.
104. Mimura K, Teh JL, Okayama H, Shiraishi K, Kua LF, Koh V I sur. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Sci*. 2018, 109:43–53.
105. Osaki LH, Bockerstett KA, Wong CF, Ford EL, Madison BB, DiPaolo RJ, I sur. Interferon- $\gamma$  directly induces gastric epithelial cell death and is required for progression to metaplasia. *J Pathol*. 2019;247:513-523.
106. Imai Y, Chiba T, Kondo T, Kanzaki H, Kanayama K, Ao J, I sur. Interferon- $\gamma$  induced PD-L1 expression and soluble PD-L1 production in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2020 ;20:2161-68.

107. Sánchez-Zauco N, Torres J, Gómez A, Camorlinga-Ponce M, Muñoz-Pérez L, Herrera-Goepfert R, I sur. Circulating blood levels of IL-6, IFN- $\gamma$ , and IL-10 as potential diagnostic biomarkers in gastric cancer: a controlled study. *BMC Cancer*. 2017;17:384.
108. Yang J, Liu Z, Zeng B, Hu G, Gan R. Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype. *Cancer Lett*. 2020;495:191-199.
109. Park KB, Seo AN, Kim M. Gastric cancer with distinct Epstein-Barr virus-positive and -negative tumor components and their whole exome sequencing result: a case Report. *Diagn Pathol*. 2023;18(1):81.
110. Ribeiro J, Malta M, Galaghar A, et al. P53 deregulation in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. *Cancer Lett*. 2017;404:37-43.
111. Sasaki S, Nishikawa J, Sakai K, I sur. EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions. *Gastric Cancer*. 2019;22(3):486-496.
112. Saito M, Kono K. Landscape of EBV-positive gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2021;24(5):983-989.
113. Chia NY, Tan P. Molecular classification of gastric cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(5):763-769.
114. Pereira MA, Dias AR, Ramos MFKP, et al. Gastric cancer with microsatellite instability displays increased thymidylate synthase expression. *J Surg Oncol*. 2022;126(1):116-124.
115. Sun Y, Yu W, Guan W, et al. Integrated assessment of PD-L1 expression and molecular classification facilitates therapy selection and prognosis prediction in gastric cancer. *Cancer Manag Res*. 2019;11:6397-6410.
116. Yildirim M, Kaya V, Demirpence O, Gunduz S, Bozcuk H. Prognostic significance of p53 in gastric cancer: a meta- analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(1):327-332.
117. Lazar D, Taban S, Sporea I, I sur. The immunohistochemical expression of the p53-protein in gastric carcinomas. Correlation with clinicopathological factors and survival of patients. *Rom J Morphol Embryol*. 2010; **51**, 249-57.
118. Ye YW, Zhang X, Zhou Y, I sur. The correlations between the expression of FGFR4 protein and clinicopathological parameters as well as prognosis of gastric cancer patients. *J Surg Oncol*. 2012; **106**, 872-9.
119. Albitar M, Sudarsanam S, Ma W, I sur. Correlation of MET gene amplification and TP53 mutation with PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2018;9(17):13682–13693.
120. Wieser V, Gaugg I, Fleischer M, I sur. BRCA1/2 and TP53 mutation status associates with PD-1 and PD-L1 expression in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2018;9(25):17501–17511.

121. Liu J, Li H, Sun L, Yuan Y, Xing C. Profiles of PD-1, PD-L1, PD-L2 in Gastric Cancer and Their Relation with Mutation, Immune Infiltration, and Survival. *Biomed Res Int.* 2020; 2020:2496582
122. Oki E, Okano S, Saeki H, Umemoto Y, Teraishi K, Nakaji Y, I sur. Protein Expression of Programmed Death 1 Ligand 1 and HER2 in Gastric Carcinoma. *Oncology.* 2017;93:387-94.
123. Namvar N, Montazer M, Ahmadvand S, Sadeghian B, Ghaderi A. Expression of PD-1 in Tumor Cells is Associated with Shorter Survival in Non-metastatic Intestinal-type Gastric Adenocarcinoma. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2022;21:600-15.
124. Le DT, Ott PA, Korytowsky B, Le H, Le TK, Zhang Y, I sur. Real-world treatment patterns and clinical outcomes across lines of therapy in patients with advanced/metastatic gastric or gastroesophageal junction Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2020;19:32–38.e3.
125. Guo L, Overholser J, Darby H, Ede NJ, Kaumaya PTP. A newly discovered PD-L1 B-cell epitope peptide vaccine (PDL1-Vaxx) exhibits potent immune responses and effective anti-tumor immunity in multiple syngeneic mice models and (synergizes) in combination with a dual HER-2 B-cell vaccine (B-Vaxx). *Oncoimmunology.* 2022;11:2127691.



## **10.ŽIVOTOPIS**

## **OPĆI PODATCI:**

Ime i prezime: Tomislav Ivanović

Datum rođenja: 9.3.1989.

Email: tomo.mefst@gmail.com

## **OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE:**

1996. - 2003. pohađao osnovnu školu Don Lovre Katića, Solin

2003. - 2007. pohađao Zdravstvenu školu, smjer Farmaceutski tehničar, Split

2007. - 2013. pohađao Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer Doktor medicine

2013. izradio diplomski rad „Obaviještenost o simptomima i rizičnim čimbenicima ishemijskog moždanoga udara u bolesnika s preboljelim moždanim udarom i u osoba s povišenim rizikom za obolijevanje od moždanog udara“ pod mentorstvom prim. prof. dr. sc. Ivo Lušić dr. med.

13. 7. 2013. diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu

7. 5. 2014. položio stručni ispit za doktora medicine

2016. - polaznik poslijediplomskog doktorskog studija Biologija novotvorina

## **RADNO ISKUSTVO:**

6/2014.-3/2015. liječnik u HMP Splitsko-dalmatinske županije

3/2015. - specijalizant abdominalne kirurgije na Klinici za kirurgiju KBC Split

6/2020. - specijalist abdominalne kirurgije

## **STRANI JEZICI**

Engleski jezik: C1 stupanj

Njemački jezik : A1 stupanj

## **PUBLIKACIJE:**

Ivanović T, Božić D, Benzon B, Čapkun V, Vukojević K, Glavina Durdov M. Histological Type, Cytotoxic T Cells and Macrophages in the Tumor Microenvironment Affect the PD-L1 Status of Gastric Cancer. *Biomedicines*. 2023;11(3):709.

Bozic D, Grgurevic I, Mamic B, Capkun V, Bilandzic-Ivisic J, Ivanovic T, Bozic I, Zaja I, Podrug K, Puljiz Z, Perko Z, Mikolasevic I. Detection of Sarcopenia in Patients with Liver Cirrhosis Using the Bioelectrical Impedance Analysis. *Nutrients*. 2023;15(15):3335.