

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Paparella Karaman

ZNAČAJ TERCIJARNIH LIMFOIDNIH STRUKTURA U
KARCINOMU ŽELUCA

Doktorska disertacija

Split, 2026. godine

Ova doktorska disertacija izrađena je na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju te pri Katedri za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Mentor: prof. dr. sc. Katarina Vukojević

1. UVOD	1
1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA ŽELUCA	2
1.2. ETIOPATOGENEZA KARCINOMA ŽELUCA.....	3
1.3. PREVENCIJA I PROBIR KARCINOMA ŽELUCA.....	6
1.4. ANATOMIJA ŽELUCA I LIMFNA DRENAŽA.....	7
1.5. SIMPTOMI I DIJAGNOSTIKA KARCINOMA ŽELUCA.....	8
1.6. PATOLOŠKA DIJAGNOZA	9
1.6.1. Anatomska, makroskopska, histološka i molekularna podjela adenokarcinoma želuca	9
1.6.2. Određivanje stadija bolesti.....	12
1.7. LIJEČENJE ADENOKARCINOMA ŽELUCA	15
1.7.1. Suvremena ciljana terapija i imunoterapija.....	15
1.8. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI BILJEZI	17
1.9. TUMORSKI MIKROOKOLIŠ KARCINOMA ŽELUCA	18
1.9.1. Regulatorni T limfociti	23
2. HIPOTEZE I CILJEVI.....	27
3. METODE I ISPITANICI	29
3.1. USTROJ ISTRAŽIVANJA	30
3.2. ISPITANICI	30
3.3. METODE	30
3.3.1. Procjena veličine i zrelosti tercijarnih limfoidnih struktura	31
3.3.2. Imunohistokemijska analiza.....	32
3.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. KLINIČKO-PATOLOŠKE ZNAČAJKE ISPITANIKA I POVEZANOST S PRISUTNOŠĆU TERCIJARNIH LIMFOIDNIH STRUKTURA	35
4.2. ANALIZA UKUPNOG PREŽIVLJENJA PREMA PRISUTNOSTI TERCIJARNIH LIMFOIDNIH STRUKTURA.....	36
4.3. POVEZANOST ZRELOSTI TERCIJARNIH LIMFOIDNIH STRUKTURA S KLINIČKO-PATOLOŠKIM OBILJEŽJIMA I IMUNOLOŠKIM SASTAVOM TLS-A	38
4.4. POVEZANOST FOXP3 ⁺ REGULATORNIH LIMFOCITA UNUTAR TERCIJARNIH LIMFOIDNIH STRUKTURA S UKUPNIM PREŽIVLJENJEM ISPITANIKA	39
4.5. POVEZANOST GUSTOĆE FOXP3 ⁺ REGULATORNIH LIMFOCITA U LIMFNIM ČVOROVIMA S PŃ STATUSOM ..	41
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČCI.....	50
7. SAŽETAK	52
8. SUMMARY	54
9. LAIČKI SAŽETAK	56
10. LAY SUMMARY	58
11. REFERENCE	60
12. ŽIVOTOPIS	68

POPIS OZNAKA I KRATICA

CagA – citotoksinom povezani gen A (engl. Cytotoxin-associated gene A)

CDH1 – kadherin 1 (engl. Cadherin 1)

CEA – karcinoembrionalni antigen (engl. Carcinoembryonic Antigen)

CIN – kromosomska nestabilnost (engl. Chromosomal Instability)

CLDN18.2 – kladin 18.2 (engl. Claudin 18.2)

dMMR – nedostatak proteina odgovornih za popravak pogrešno sparenih baza DNA (engl. deficient mismatch repair)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EBV – Epstein–Barrov virus (engl. Epstein–Barr virus)

EGDS – ezofagogastroduodenoskopija

EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. Epidermal Growth Factor Receptor)

EMR – endoskopska mukozna resekcija (engl. Endoscopic Mucosal Resection)

ESD – endoskopska submukozna disekcija (engl. Endoscopic Submucosal Dissection)

FLOT – 5-fluorouracil, leukovorin, oksaliplatin i docetaksel

FOXP3 – Forkhead box P3

GIST – gastrointestinalni stromalni tumor (engl. Gastrointestinal Stromal Tumor)

GS – genomski stabilan (engl. Genomically Stable)

HE – hematoksilin-eozin

HER2 – receptor humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (engl. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

IKR – interkvartilni raspon (hrvatska inačica od dolje navedenog IQR)

IL-2 – interleukin-2

IQR – interkvartilni raspon (engl. Interquartile Range)

JGCA – Japansko društvo za karcinom želuca (engl. Japanese Gastric Cancer Association)

LVI – limfovaskularna invazija (engl. Lymphovascular Invasion)

MSI – mikrosatelitna nestabilnost (engl. Microsatellite Instability)

NK – prirodne ubojice (engl. Natural Killer stanice)

PD-L1 – ligand programirane stanične smrti 1 (engl. Programmed Death-Ligand 1)

PNI – perineuralna invazija (engl. Perineural Invasion)

RNA – ribonukleinska kiselina

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TCGA – Atlas genoma raka (engl. The Cancer Genome Atlas)

TIM – tumorski imuni mikrookoliš

TLS – tercijarne limfoidne strukture (engl. Tertiary Lymphoid Structures)

TNM – klasifikacija tumora prema proširenosti primarnog tumora (T), regionalnih limfnih čvorova (N) i udaljenih metastaza (M)

Treg – regulatorni T limfociti (engl. Regulatory T cells)

VacA – vakuolizirajući citotoksin A (engl. Vacuolating Cytotoxin A)

1. UVOD

1.1. Epidemiologija karcinoma želuca

Karcinom želuca peti je najčešći zloćudni tumor i četvrti vodeći uzrok smrti od raka u svijetu. Unatoč kontinuiranom padu incidencije u proteklim desetljećima, on se i dalje svrstava među najvažnije javnozdravstvene izazove (1,2). Prema procjenama Međunarodne agencije za istraživanje raka, u 2022. godini zabilježeno je 968 350 novooboljelih od karcinoma želuca i 659 853 smrtna ishoda povezanih s tom bolešću (1). Raspodjela bolesti obilježena je izraženim geografskim razlikama, s najvišim stopama incidencije u istočnoj Aziji i dijelovima istočne Europe i Južne Amerike, a nižom incidencijom u većini zapadnih zemalja (1–3). Razlike odražavaju složeno međudjelovanje okolišnih čimbenika, prehrambenih navika, prevalencije infekcije bakterijom *Helicobacter pylori* (kratica *H. pylori*), genetskih i socioekonomskih obilježja populacije (2–4). Bolest je gotovo dvostruko češća u muškaraca nego u žena, a incidencija raste sa životnom dobi i najviša je nakon šezdesete godine života (1,2). Iako se karcinom želuca i dalje smatra bolešću starije populacije, novija epidemiološka istraživanja upozoravaju na porast incidencije u ranoj životnoj dobi (engl. *early-onset gastric cancer*) koji se najčešće definira kao bolest dijagnosticirana prije 50. godine života. Premda ukupna incidencija karcinoma želuca opada, u pojedinim zemljama zabilježen je porast incidencije među mlađim odraslim osobama, a uzroci promjene u epidemiologiji bolesti nisu potpuno razjašnjeni (5,6).

Više od 90 % zloćudnih tumora želuca otpada na adenokarcinom, dok su limfomi, gastrointestinalni stromalni tumori (GIST) i neuroendokrini tumori mnogo rjeđi (7). Prema anatomskoj lokalizaciji, oko 15 % adenokarcinoma nastaje u području kardije, a 85 % u nekardijalnom dijelu želuca. Podjela po lokaciji ima važno epidemiološko i etiopatogenetsko značenje jer se kardijalni i nekardijalni adenokarcinomi razlikuju prema čimbenicima rizika, molekularnim obilježjima i trendu incidencije (2,8).

Posljednjih desetljeća zabilježen je pad incidencije karcinoma distalnog dijela želuca, što se povezuje s poboljšanjem higijenskih uvjeta, smanjenjem prevalencije *H.pylori* infekcije i boljim načinom čuvanja hrane. Istodobno, u nekim populacijama raste incidencija adenokarcinoma ezofagogastričnog spoja i kardijalnog dijela želuca, što se povezuje s pretilošću i gastroezofagealnom refluksnom bolesti (2–4). U Hrvatskoj je u posljednjim desetljećima također zabilježen trend smanjenja incidencije karcinoma želuca, ali je stopa

pobola viša nego u većini zapadnoeuropskih zemalja (9,10). Prema podacima Registra za rak Republike Hrvatske za 2020. godinu, na karcinom želuca otpada 4 % svih zloćudnih tumora u muškaraca i 3 % u žena, uz dobno standardiziranu stopu incidencije od 16,5 na sto tisuća muškaraca i 7,9 na sto tisuća žena (10). U skladu s globalnim trendovima, bolest se češće javlja u muškaraca i pretežno pogađa stariju dob (1,10). Unatoč padu incidencije, karcinom želuca i dalje je povezan s visokom smrtnošću te je omjer smrtnosti i incidencije 0,82 (1,10). Dobno standardizirana stopa incidencije raka želuca u Splitsko-dalmatinskoj županiji viša je od hrvatskog prosjeka, što dodatno naglašava njenu javnozdravstvenu važnost u lokalnoj sredini (10).

1.2. Etiopatogeneza karcinoma želuca

Kao što je rečeno, karcinom želuca nastaje kao posljedica složene interakcije okolišnih, infektivnih, genetskih i epigenetskih čimbenika koji tijekom dugotrajnog razdoblja dovode do nakupljanja molekularnih promjena u želučanoj sluznici (4,11). Pritom kronična upala želučane sluznice ima ključnu ulogu u oštećenju epitela, poremećaju regeneracije sluznice i progresiji prema neoplastičnoj promjeni (12). Dugotrajni upalni proces stvara mikrookoliš opterećen oksidacijskim stresom, povećanim stvaranjem reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva i stalnom aktivacijom upalnih signalnih puteva. Posljedica je postupno nakupljanje oštećenja DNA, poremećaj mehanizama popravka genoma i promjene u regulaciji proliferacije, diferencijacije i apoptoze epitelnih stanica želučane sluznice. Istodobno dolazi do epigenetskih promjena, kao što su aberantna metilacija promotorskih regija i izražaja regulatornih nekodirajućih RNA, čime se dodatno potiče zloćudna preobrazba epitela (11,13).

Među poznatim čimbenicima rizika najvažnija je infekcija bakterijom *H. pylori*, koja je prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka svrstana u karcinogene prve skupine. Infekcija ovom bakterijom glavni je etiološki čimbenik razvoja nekardijalnog adenokarcinoma želuca i odgovorna za 90 % distalnog adenokarcinoma želuca u svijetu (11,14).

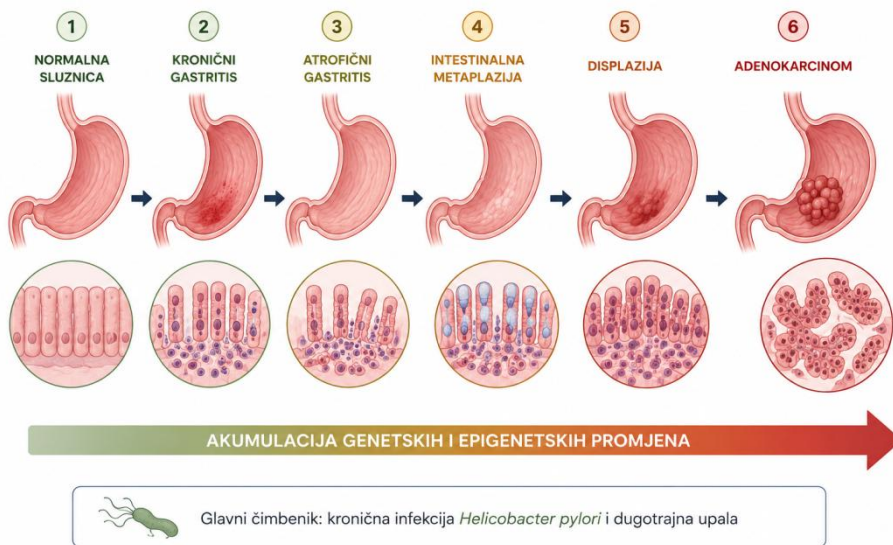
Procjenjuje se da je, uz izražene geografske razlike u prevalenciji, bakterijom *H. pylori* zaražena gotovo polovica svjetske populacije, ali samo 1 – 3 % inficiranih osoba tijekom života oboli od adenokarcinoma želuca (15,16). To ukazuje da rizik razvoja bolesti ovisi o

složenom međudjelovanju bakterijske virulencije, genetske predispozicije domaćina i okolišnih čimbenika (14,15). Posebno su virulentni sojevi koji izražavaju proteine CagA (engl. *cytotoxin-associated gene A*) i VacA (engl. *vacuolating cytotoxin A*). Toksin VacA se izlučuje u okolinu i veže za receptore poput integrina ili EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) na epitelu želučane sluzice, dok se onkoprotein CagA ubrizgava izravno u stanice domaćina. Ovi procesi uzrokuju oštećenje stanica i intenzivnu upalnu reakciju, što značajno povećava rizik od razvoja prekanceroza i adenokarcinoma želuca (15,17).

Dugotrajna infekcija s *H. pylori* može dovesti do razvoja atrofičnog gastritisa, intestinalne metaplazije i displazije epitela te konačno invazivnog karcinoma (12). Eradikacija infekcije *H. pylori* dokazano smanjuje rizik nastanka karcinoma želuca, osobito ako se provede prije razvoja uznapredovalih prekanceroznih promjena želučane sluznice (14).

Osim *H. pylori* infekcije, razvoju adenokarcinoma želuca pridonose okolišni čimbenici. Prehrana bogata soli, dimljena i konzervirana hrana te nitrozamini povezani su s povećanim rizikom nastanka bolesti, dok prehrana bogata svježim voćem i povrćem ima zaštitni učinak (3). Pušenje je potvrđeni čimbenik rizika, a razvoju bolesti pridonose i prekomjerna konzumacija alkohola, kronični atrofični gastritis (uključujući autoimuni gastritis s pernicioznom anemijom) te prethodna kirurška resekcija želuca. Za razliku od nekardijalnog adenokarcinoma, nastanak adenokarcinoma kardije češće se povezuje s pretilošću i gastroezofagealnom refluksnom bolešću (4,11).

Patogeneza intestinalnog tipa adenokarcinoma želuca najčešće se opisuje Correa kaskadom, koja prikazuje postupnu progresiju od kroničnog aktivnog gastritisa preko atrofičnog gastritisa i intestinalne metaplazije do displazije i invazivnog adenokarcinoma (Slika 1) (12). Proces u pravilu traje više desetljeća i predstavlja model višestupanjske karcinogeneze u kojem svaka razvojna faza povećava vjerojatnost nastanka sljedeće. Ipak, progresija se u ranim stadijima može usporiti ili zaustaviti uklanjanjem etioloških čimbenika, osobito eradikacijom infekcije *H. pylori* (12,14).



Slika 1. Makroskopske i histološke promjene sluznice želuca u stupnjevitoj karcinogenezi vezanoj uz *H. pylori* gastritis. Izvor podataka: Correa P. i sur. (12). Izrađeno pomoću alata umjetne inteligencije ChatGPT (OpenAI, GPT-5.5).

Za razliku od intestinalnog podtipa, difuzni podtip adenokarcinoma želuca češće je povezan s poremećajima gena odgovornih za međustaničnu adheziju, među kojima je najvažniji gen *CDH1* koji kodira E-kadherin. Gubitak funkcije E-kadherina dovodi do slabljenja međustanične povezanosti, infiltrativnog načina rasta tumora i povećane sklonosti lokalnom širenju bolesti. Nasljedne mutacije gena *CDH1* odgovorne su za nastanak nasljednog difuznog karcinoma želuca, rijetkog sindroma obilježenog izrazito visokim rizikom razvoja bolesti. Osim nasljednih mutacija, smanjen izražaj E-kadherina može nastati i zbog somatskih mutacija ili epigenetskog utišavanja gena, što dodatno pridonosi infiltrativnom načinu rasta difuznog podtipa adenokarcinoma (11,18).

Dodatnu ulogu u karcinogenezi ima infekcija Epstein-Barr virusom (EBV), prisutna u približno 10 % adenokarcinoma želuca. EBV-pozitivni adenokarcinomi pokazuju karakterističan obrazac epigenetskih promjena, izraženu limfocitnu infiltraciju i povećan izražaj molekula kontrolnih točaka, zbog čega predstavljaju zasebnu molekularnu podskupinu prema TCGA klasifikaciji (19).

1.3. Prevencija i probir karcinoma želuca

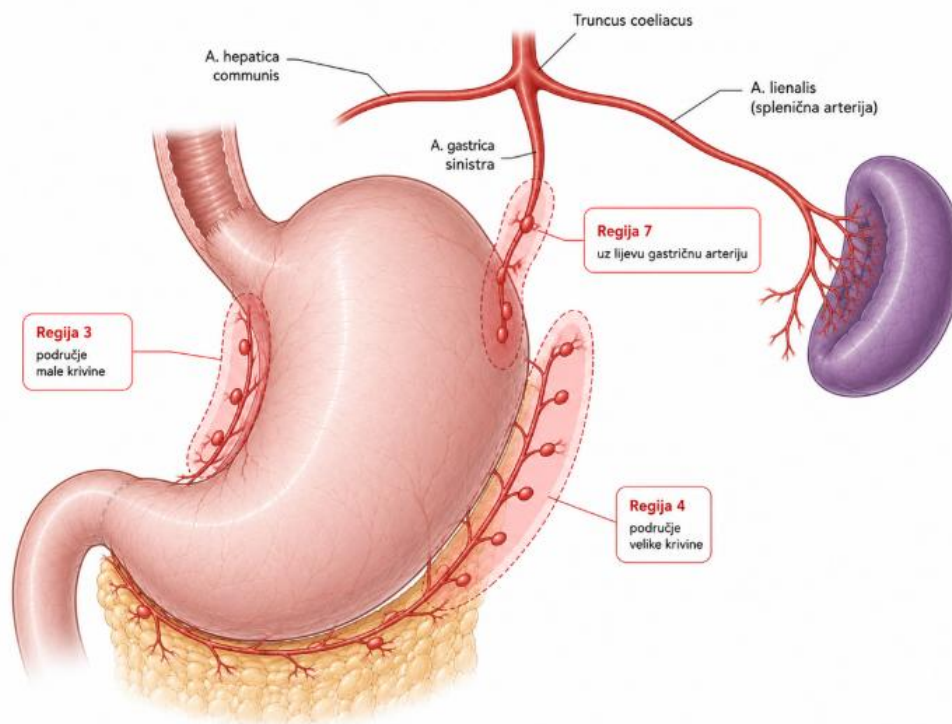
Adenokarcinom želuca se, na žalost, često dijagnosticira u uznapređovalom stadiju kad su mogućnosti liječenja ograničene. Stoga prevencija i rano otkrivanje bolesti imaju ključnu ulogu u smanjenju incidencije i smrtnosti te poboljšanju ishoda liječenja (11,14). Primarna prevencija usmjerena je na sprječavanje nastanka bolesti uklanjanjem ili smanjenjem izloženosti poznatim čimbenicima rizika. Najvažnija mjera primarne prevencije je eradikacija *H. pylori* infekcije, osobito ako se provede prije nastanka prekanceroznih promjena želučane sluznice (14). Dodatno se preporučuje usvajanje zdravih prehrambenih navika koje uključuju povećan unos svježeg voća i povrća, a smanjenje unosa soli, dimljene i konzervirane hrane. Važan doprinos imaju prestanak pušenja, umjerena konzumacija alkohola i održavanje primjerenog indeksa tjelesne mase (20). U osoba koje imaju određeni nasljedni sindrom povezan s povećanim rizikom razvoja adenokarcinoma želuca potrebno je provoditi individualizirani program genskog savjetovanja, praćenja i prevencije (21).

Sekundarna prevencija obuhvaća rano otkrivanje prekanceroznih promjena i adenokarcinoma u početnim stadijima bolesti, kad postoji mogućnost izliječenja. Optimalna metoda probira je ezofagogastroduodenoskopija (EGDS) koja omogućuje izravni pregled sluznice, bioptiranje te dijagnosticiranje preneoplastičnih i ranih neoplastičnih promjena, uz procjenu stupnja atrofičnog gastritisa, intestinalne metaplazije i displazije, čime se određuje rizik od daljnje progresije bolesti (22). Organizirani populacijski programi probira koji se provode u Japanu i Južnoj Koreji, zemljama s visokom incidencijom karcinoma želuca, doveli su do značajnog povećanja udjela ranog adenokarcinoma i boljeg ishoda liječenja. Petogodišnje preživljenje bolesnika s adenokarcinomom želuca je u većini zapadnih zemalja manje od 35 %, a u Japanu i Južnoj Koreji prelazi 60 % (23,24).

U skupini bolesnika s povećanim rizikom razvoja adenokarcinoma želuca, uključujući osobe s atrofičnim gastritisom ili intestinalnom metaplazijom, prethodnom resekcijom želuca, pernicioznom anemijom, pozitivnom obiteljskom anamnezom ili nasljednim sindromima povezanim s razvojem adenokarcinoma želuca, preporučuje se endoskopsko praćenje radi pravodobnog otkrivanja displazije i ranog karcinoma (14,22).

1.4. Anatomija želuca i limfna drenaža

Želudac je intraperitonealni organ smješten u gornjem dijelu trbušne šupljine između jednjaka i dvanaesnika. Tijekom embrionalnog razvoja nastaje iz prednjeg crijeva (engl. foregut), a njegovom rotacijom oblikuju se velika i mala krivina i omentalna burza (25). Zbog složenog embrionalnog razvoja i bogate vaskularizacije, želudac ima izrazito razvijenu limfnu mrežu koja prati lijevu i desnu gastičnu arteriju, lijevu i desnu gastroepiploičnu arteriju i kratke želučane arterije. Limfna drenaža odvija se prema limfnim čvorovima smještenim uz veliku i malu krivinu te uz glavne arterijske ogranke celijačnog stabla, a potom prema udaljenijim limfnim čvorovima (26). Prema smjernicama Japanskog društva za karcinom želuca (JGCA), limfni čvorovi dijele se na perigastične (stanice 1 – 6), regionalne ekstraperigastične (stanice 7 – 12) i udaljene (stanice 13–20 te 110 – 112) (27).



Slika 2. Shematski prikaz najčešćih regija limfogenog širenja adenokarcinoma želuca: regije 3, 4 i 7. Izvor podataka: López Sala P i sur. 2023. (28). Izrađeno pomoću alata umjetne inteligencije ChatGPT (OpenAI, GPT-5.5).

Takva anatomska organizacija određuje karakteristični obrazac limfogenog širenja adenokarcinoma želuca i temelj je za planiranje kirurške limfadenektomije i određivanja patološkog stadija bolesti. Najčešće limfogeno širenje adenokarcinoma želuca je u limfne čvorove stanice 3 uz malu krivinu, stanice 4 uz veliku krivinu i stanice 7 uz lijevu gastričnu arteriju (Slika 2) (28). U toku operacije adenokarcinoma želuca D1 limfadenektomija uključuje perigastrične čvorove koji se nalaze neposredno uz želudac i desnu/lijevu stranu kardije, a D2 limfadenektomija uz to još i ekstraperigastrične čvorove smještene duž celijačnog trunkusa i njegovih glavnih ogranaka (27).

1.5. Simptomi i dijagnostika karcinoma želuca

Klinička slika adenokarcinoma želuca ovisi o stadiju bolesti. U ranim stadijima bolest je često asimptomatska, ili se očituje nespecifičnim simptomima poput dispepsije, osjećaja ranog zasićenja i punoće nakon obroka, nelagode u epigastriju, mučnine ili gubitka teka. Kako bolest napreduje, javljaju se izraženiji simptomi poput nenamjernog gubitka tjelesne mase, boli u gornjem dijelu trbuha, disfagije, povraćanja, anemije i znakova gastrointestinalnog krvarenja. U uznapredovalim stadijima mogu biti prisutni ascites, palpabilni metastatski limfni čvorovi i kliničke manifestacije udaljenih metastaza. Zbog nespecifičnosti ranih simptoma, u većine bolesnika dijagnoza se postavlja tek u lokalno uznapredovalom ili metastatskom stadiju bolesti. Laboratorijski nalazi nisu specifični za adenokarcinom želuca, ali mogu upućivati na postojanje bolesti. Kronično okultno krvarenje može dovesti do sideropenične anemije, a poremećaj nutritivnog statusa do hipoalbuminemije i povišenih upalnih pokazatelja (2,4,29). Tumorski biljezi CEA, CA 19-9 i CA 72-4 nisu dovoljno osjetljivi i specifični za primjenu u probiru i kod postavljanje dijagnoze, ali mogu biti korisni u praćenju tijeka bolesti, odgovora na liječenje i otkrivanju recidiva (29). Zlatni standard u dijagnostici adenokarcinoma želuca je EGDS jer omogućuje izravni prikaz želučane sluznice, biopsiranje promjena i patohistološku dijagnozu (22). U bolesnika s pozitivnim nalazom potrebno je slikovnim metodama procijeniti proširenost bolesti i odrediti klinički stadij tumora. Najčešće se primjenjuje višeslojna kompjutorizirana tomografija prsnog koša, abdomena i zdjelice. Pomoću endoskopskog ultrazvuka procjenjuje se dubina invazije tumora i zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova. U odabranih bolesnika može biti indicirana pozitronska emisijska tomografija ili dijagnostička laparoskopija, osobito u svrhu otkrivanja okultnih peritonealnih metastaza (30).

1.6. Patološka dijagnoza

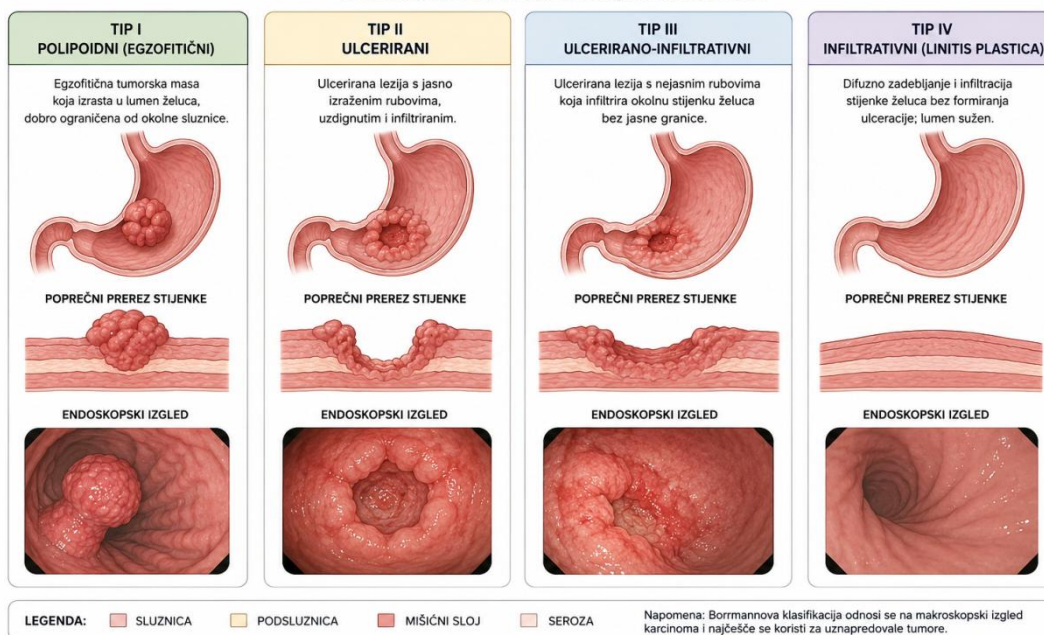
Na maloj biopsiji moguće je histološki dijagnosticirati tumor i analizirati prediktivne biljege, a za određivanje prognostičkih pokazatelja i patološkog stadija potrebno je sustavno analizirati cijeli uzorak nakon gastrektomije s limfadenektomijom (29). Makroskopski se određuje veličina i lokalizacija tumora te odnos prema ostalim strukturama. Mikroskopski se, uz histološki tip i stupanj diferencijacije tumora, opisuju dubina invazije, zahvaćenost limfnih čvorova metastatskim tumorom, prisutnost limfovaskularne i perineuralne invazije, tumorsko pupanje i stanje resekcijskih rubova (7). U dodatnim imunohistokemijskim analizama moguće je odrediti status mikrosatelitne nestabilnosti (MSI), izražaj HER 2 i Claudina 18.2 na tumorskim stanicama i izražaj molekula kontrolne točke kao što je PD-L1 u tumorskim stanicama i tumorskom imunom mikrookolišu (30).

1.6.1. Anatomska, makroskopska, histološka i molekularna podjela adenokarcinoma želuca

Adenokarcinomi želuca koji se razvijaju u području ezofagogastričnog spoja i proksimalnog želuca nazivaju se kardijalni (proksimalni), dok se oni koji nastaju u drugim djelovima želuca označavaju kao nekardijalni (distalni) (2). Razlika među njima je u epidemiološkim obilježjima, čimbenicima rizika i molekularnom mehanizmu nastanka te se mogu smatrati zasebnim biološkim entitetima (8). Makroskopski izgled uznapredovalog karcinoma želuca najčešće se opisuje prema Borrmannovoj klasifikaciji koja razlikuje polipoidni (tip I), ulcerirani jasno ograničeni (tip II), ulcerirani infiltrativni (tip III) i difuzno infiltrativni oblik, tzv. *linitis plastica* (tip IV) (7) (Slika 3). Najčešći je tip III, dok je tip IV povezan s difuznim infiltrativnim rastom tumora i nepovoljnijom prognozom (13).

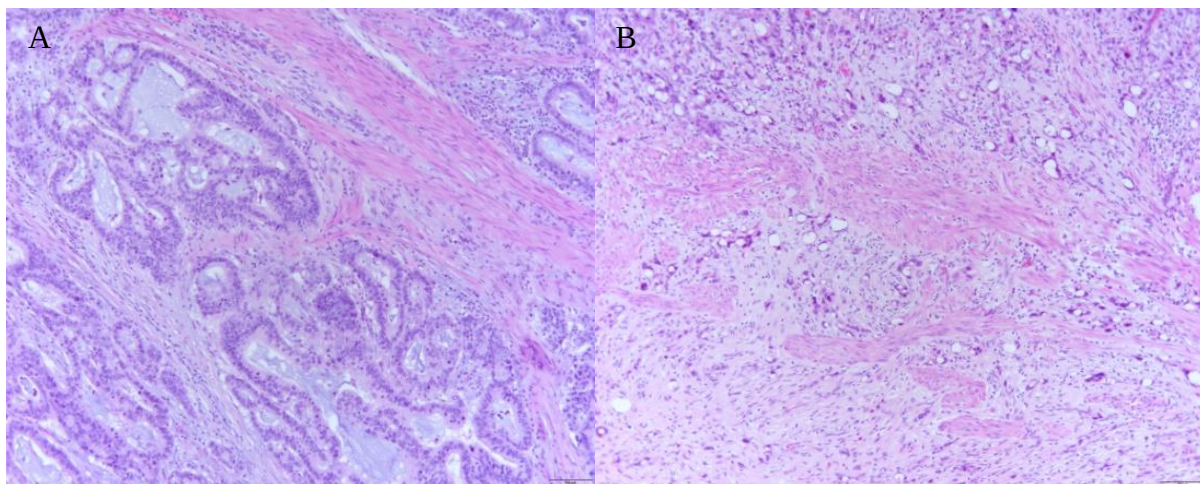
BORMANNOVA KLASIFIKACIJA KARCINOMA ŽELUCA

Makroskopski oblici uznapredovalog karcinoma želuca



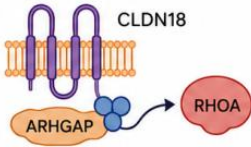
Slika 3. Makroskopski oblici adenokarcinoma želuca. Izvor podataka: Machlowska J i sur. (13). Izrađeno pomoću alata umjetne inteligencije ChatGPT (OpenAI, GPT-5.5).

Prema klasifikaciji SZO, adenokarcinom želuca se histološki dijeli na tubularni, papilarni, mucinozni i slabo kohezivni tip. Međutim, u praksi se i danas često koristi starija Laurenova podjela na intestinalni, difuzni i mješoviti podtip (7,31) (Slika 4). U intestinalnom podtipu atipične epitelne stanice oblikuju nepravilne žljezdane formacije, u difuznom podtipu su slabo povezane, dok miješani podtip ima obje histološke slike (7,31). Intestinalni podtip povezan je s kroničnim gastritisom, intestinalnom metaplazijom i Correa kaskadom, dok je difuzni podtip često bez prekanceroznih promjena (2).



Slika 4. Adenokarcinom želuca prema Laurenovoj klasifikaciji: (A) intestinalni podtip i (B) difuzni podtip (HE, 200×); Izvor: vlastito istraživanje.

Napredak molekularne biologije i tehnologije sekvenciranja omogućio je dublji uvid u biološku heterogenost adenokarcinoma želuca. (2). Zahvaljujući projektu Genomskog atlasa karcinoma (TCGA, od engl. *The Cancer Genome Atlas*) iz 2014. godine, identificirana su četiri molekularna podtipa adenokarcinoma želuca: povezan s EBV-om, mikrosatelitski nestabilan (MSI), genomski stabilan (GS) i kromosomski nestabilan (CIN) (Slika 5) (19). Molekularna klasifikacija omogućila je bolje razumijevanje patogeneze karcinoma želuca i postavila temelje za razvoj personaliziranog pristupa liječenju. Podtip povezan s EBV-om i MSI podtip pokazuju obilnu infiltraciju imunološkim stanicama, pojačan izražaj molekula imunoloških kontrolnih točaka te veću osjetljivost na imunoterapiju. Nasuprot tome, GS podtip i CIN podtip imaju drugačiji molekularni mehanizam karcinogeneze i obrazac tumorskog mikrookoliša (2). Te spoznaje dodatno su istakle važnost interakcije tumorskih stanica i imunološkog sustava te potaknule istraživanja tumorskog mikrookoliša, uključujući ulogu tercijarnih limfoidnih struktura i različitih populacija imunoloških stanica u progresiji bolesti i odgovoru na liječenje (32).

EBV	MSI	GS	CIN
 EBER+			
 PIK3CA mutacije	 MSI-H (hipermutacijski fenotip)	 RHOA mutacije	 Česte mutacije TP53
 PD-L1 / PD-L2 visoka ekspresija	 Inaktivacija MLH1 (promotorska metilacija)	 CLDN18-ARHGAP fuzije	 Amplifikacije RTK (HER2, EGFR i dr.)
 Lokalizacija: fundus / korpus	 Lokalizacija: antrum	 Češće difuzni histološki tip	 Češće intestinalni histološki tip
 Češće muškarci	 Češća starija dob	 Češća mlađa dob	 Lokalizacija: kardija / GE-spojište
 Imunološki aktivan	 Imunološki aktivan	 Lošija prognoza	 Češće muškarci

Slika 5. Molekularni podtipovi adenokarcinoma želuca. Izvor podataka: TCGA klasifikacija 2014. (19). Izrađeno pomoću alata umjetne inteligencije ChatGPT (OpenAI, GPT-5.5).

1.6.2. Određivanje stadija bolesti

Stadij karcinoma želuca određuje se prema TNM klasifikaciji Američkog zajedničkog odbora za rak (AJCC) i Međunarodne unije za borbu protiv raka (UICC) (33) (Tablica 1). Temelji se na procjeni dubine invazije primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova (N) i prisutnosti udaljenih metastaza (M) (33). T kategorija označava dubinu invazije tumora u stjenku, a N kategorija broj regionalnih limfnih čvorova zahvaćenih metastatskim tumorom (33). Preporučuje se izoliranje i mikroskopski pregled najmanje 16 drenažnih limfnih čvorova (34). M1 kategorija označava prisutnost udaljenih metastaza (33).

Tablica 1. TNM klasifikacija prema AJCC/UICC (8. izdanje) (33)

T – primarni tumor

Tx		Primarni tumor ne može se procijeniti
T0		Nema dokaza o primarnom tumoru
Tis		Karcinom in situ
T1		Tumor zahvaća laminu propriju, mišićnu laminu sluznice ili submukozu
	T1a	Invazija lamine proprije ili mišićne lamine sluznice
	T1b	Invazija submukoze
T2		Invazija mišićnog sloja (muscularis propria)
T3		Invazija subseroznog vezivnog tkiva bez zahvaćanja visceralnog peritoneuma ili susjednih struktura
T4		Tumor zahvaća serozu ili susjedne organe odnosno strukture
	T4a	Invazija seroze (visceralnog peritoneuma)
	T4b	Invazija susjednih organa ili struktura

N – regionalni limfni čvorovi

Nx		Regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti
N0		Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1		Metastaze u 1–2 regionalna limfna čvora
N2		Metastaze u 3–6 regionalnih limfnih čvorova
N3		Metastaze u sedam ili više regionalnih limfnih čvorova
	N3a	Metastaze u 7–15 regionalnih limfnih čvorova
	N3b	Metastaze u 16 ili više regionalnih limfnih čvorova

M – udaljene metastaze

M0		Bez udaljenih metastaza
M1		Prisutne udaljene metastaze

Stadiji bolesti prema TNM klasifikaciji prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Stadiji adenokarcinoma želuca prema AJCC/UICC (8. izdanje) (33)

Stadij 0:	Tis, N0, M0
Stadij IA:	T1, N0, M0
Stadij IB:	T2, N0, M0
	T1, N1, M0
Stadij IIA:	T3, N0, M0
	T2, N1, M0
	T1, N2, M0
Stadij IIB:	T4a, N0, M0
	T3, N1, M0
	T2, N2, M0
	T1, N3a, M0
Stadij IIIA:	T4b, N0, M0
	T4a, N1, M0
	T4a, N2, M0
	T3, N2, M0
	T2, N3a, M0
Stadij IIIB:	T4b, N1, M0
	T4b, N2, M0
	T4a, N3a, M0
	T3, N3a, M0
	T2, N3b, M0
	T1, N3b, M0
Stadij IIIC:	T4b, N3a, M0
	T4b, N3b, M0
	T4a, N3b, M0
	T3, N3b, M0
Stadij IV:	bilo koji T, bilo koji N, M1

Napomena: T – primarni tumor; N – regionalni limfni čvorovi; M – udaljene metastaze.

Bolesnici u ranom stadiju bolesti imaju značajno bolje izgleda za dugoročno preživljenje, osobito ako se tumor otkrije dok je ograničen na sluznicu/podsluznicu želuca. Progresija

bolesti i pojava limfogenih ili udaljenih metastaza pogoršava prognozu; manje od 10 % bolesnika s metastatskom bolešću preživi pet godina (2).

1.7. Liječenje adenokarcinoma želuca

Liječenje adenokarcinoma želuca ovisi o stadiju bolesti, lokalizaciji tumora, općem stanju bolesnika te histološkim i molekularnim obilježjima tumora. Multidisciplinarni tim koji uključuje kirurga, onkologa, gastroenterologa, radiologa i patologa predlaže terapijski pristup za svakog pojedinog bolesnika (29,30,35).

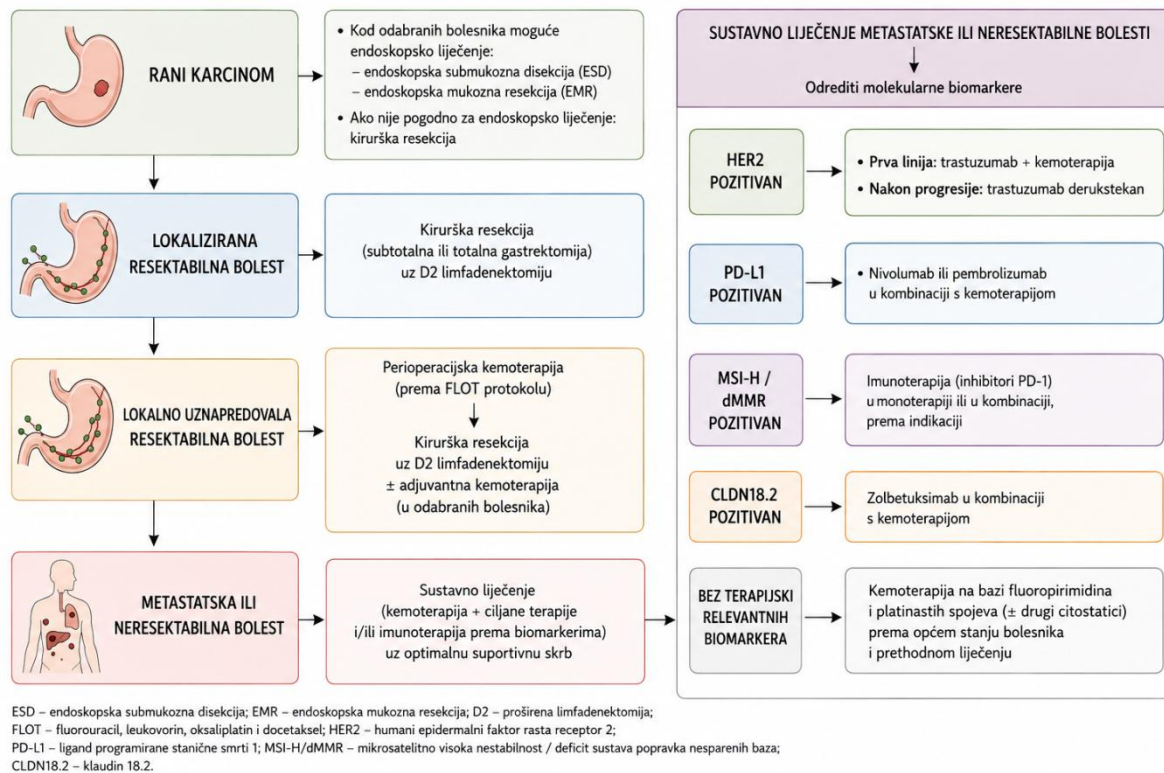
Kirurška resekcija s limfadenektomijom je zlatni standard u liječenju lokalizirane bolesti i omogućuje izlječenje. Kod odabranih bolesnika s ranim karcinomom želuca moguće je endoskopsko liječenje, najčešće endoskopskom submukoznom disekcijom ili endoskopskom mukoznom resekcijom. U lokaliziranoj bolesti koja nije pogodna za endoskopsko liječenje temelj terapije predstavlja subtotalna ili totalna gastrektomija uz D2 limfadenektomiju.

Kod lokalno uznapredovale resektabilne bolesti standard liječenja predstavlja perioperacijska ili adjuvantna kemoterapija, s ciljem smanjenja rizika recidiva i duljeg preživljenja. Perioperacijska kemoterapija prema FLOT protokolu (fluoruracil, lekovorin, oksaliplatin, taksotera) danas predstavlja standardni terapijski pristup (29,30).

U neresektibilnoj lokalno uznapredovalo ili metastatskoj bolesti liječenje je prvenstveno sustavno, pri čemu se najčešće primjenjuju kombinacije fluoropirimidina i citostatika temeljenih na platini, uz druge citostatike i ciljane lijekove prema indikaciji. Sastavni dio liječenja je optimalna suportivna skrb, usmjerena na ublažavanje simptoma i očuvanje kvalitete života bolesnika (29,30).

1.7.1. Suvremena ciljana terapija i imunoterapija

Posljednjih godina liječenje uznapredovalog adenokarcinoma želuca značajno se promijenilo razvojem ciljane terapije i imunoterapije, zbog čega je molekularna karakterizacija tumora postala sastavni dio suvremene patološke obrade (Slika 6). Danas se u bolesnika s uznapredovalom bolešću u rutinskoj dijagnostičkoj obradi molekularnim metodama određuje MSI/dMMR status, a imunohistokemijski izražaj HER2, PD-L1 i sve češće CLDN18.2 zbog mogućnosti primjene ciljane terapije (29,30).



Slika 6. Shematski prikaz liječenja adenokarcinoma želuca prema stadiju bolesti i molekularnim biomarkerima. Izvor podataka: Bišof i sur. 2018. (35), Lordick i sur. 2022. (29), Ajani i sur. 2025. (30). Izrađeno pomoću alata umjetne inteligencije ChatGPT (OpenAI, GPT-5.5).

Kod *HER2-pozitivnih* tumora standard ciljane terapije prve linije predstavlja trastuzumab u kombinaciji s kemoterapijom, dok se nakon progresije bolesti može primijeniti trastuzumab derukstekan. U bolesnika čiji tumori pokazuju izražaj *CLDN18.2* dostupna je terapija zolbetuksimabom u kombinaciji s kemoterapijom (29,30).

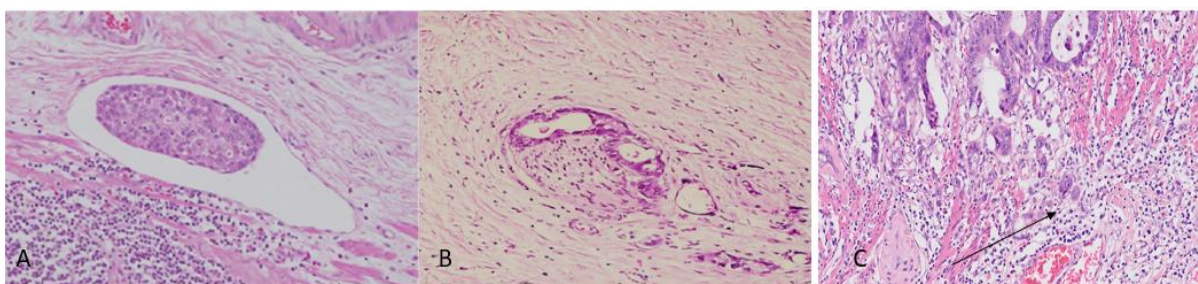
Inhibitori imunoloških kontrolnih točaka također su postali važan dio liječenja uznapredovalog adenokarcinoma želuca. U odabranih bolesnika primjenjuju se nivolumab ili pembrolizumab u kombinaciji s kemoterapijom, a kod *HER2-pozitivnih* tumora pembrolizumab se može primijeniti i u kombinaciji s trastuzumabom i kemoterapijom. Najizraženiji odgovor na imunoterapiju postiže se u tumorima s *MSI-H/dMMR* fenotipom, dok se u ostalih bolesnika odabir liječenja temelji ponajprije na izražaju *PD-L1* (29,30).

Razvoj ciljane terapije i imunoterapije dodatno je naglasio važnost tumorskog imunog mikrokoliša u određivanju odgovora na liječenje. Uz etablirane biomarkere sve se više

istražuju novi prognostički i prediktivni pokazatelji, uključujući tercijarne limfoidne strukture te sastav imunoloških stanica unutar njih, koji bi u budućnosti mogli pridonijeti preciznijem odabiru terapije (36).

1.8. Prognostički i prediktivni biljezi

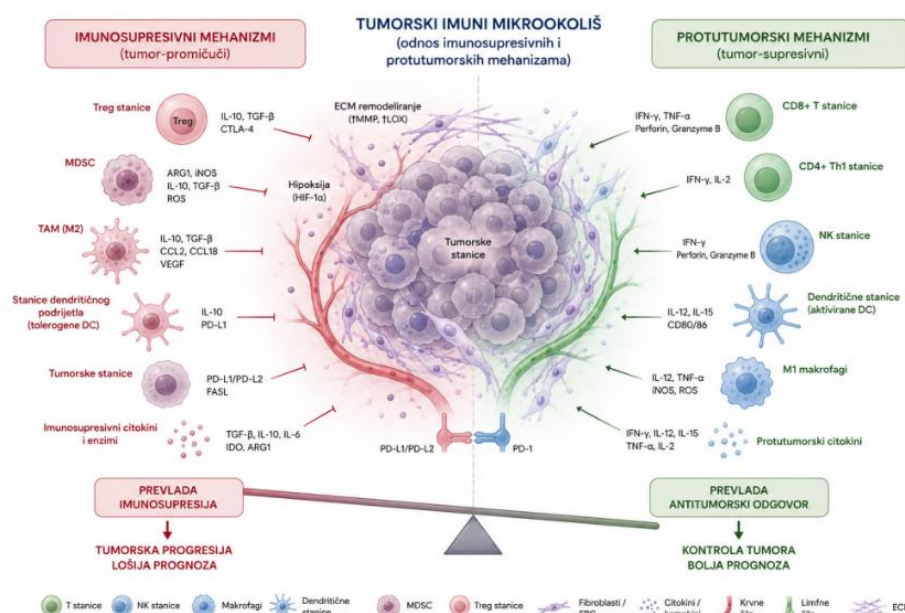
Iako je TNM stadij najvažniji prognostički čimbenik u adenokarcinomu želuca, bolesnici u istom stadiju bolesti mogu imati različit klinički tijek i odgovor na liječenje, što ukazuje na složenost biološkog ponašanja tumora (37). Klasični prognostički čimbenici su limfovaskularna invazija (LVI), perineuralna invazija (PNI) i tumorsko pupanje (Slika 7). Njihova prisutnost povezuje se s većom lokalnom invazivnošću tumora, povećanim rizikom limfogenog i hematogenog širenja i nepovoljnijom prognozom (38–41). Razvoj ciljane terapije i imunoterapije dodatno je istaknuo važnost prediktivnih biljega koji bi mogli pomoći u odabiru optimalnog terapijskog pristupa. Molekularna obilježja tumora sve se češće koriste za procjenu vjerojatnosti odgovora na pojedine terapijske strategije i odabir najprikladnijeg liječenja za pojedinog bolesnika (30). Međutim, biološko ponašanje adenokarcinoma želuca ne određuju samo genetske i molekularne značajke tumorskih stanica, već i njihova interakcija s komponentama tumorskog imunog mikrokoliša (42). Zbog toga je tumorski imuni mikrokoliš (TIM) postao jedno od središnjih područja istraživanja adenokarcinoma želuca, osobito u kontekstu progresije bolesti, odgovora na liječenje i preživljenja bolesnika.



Slika 7. Nepovoljni prognostički čimbenici u adenokarcinomu želuca su (A) limfovaskularna invazija, (B) perineuralna invazija i (C) tumorsko pupanje (HE, 200×); Izvor: vlastito istraživanje.

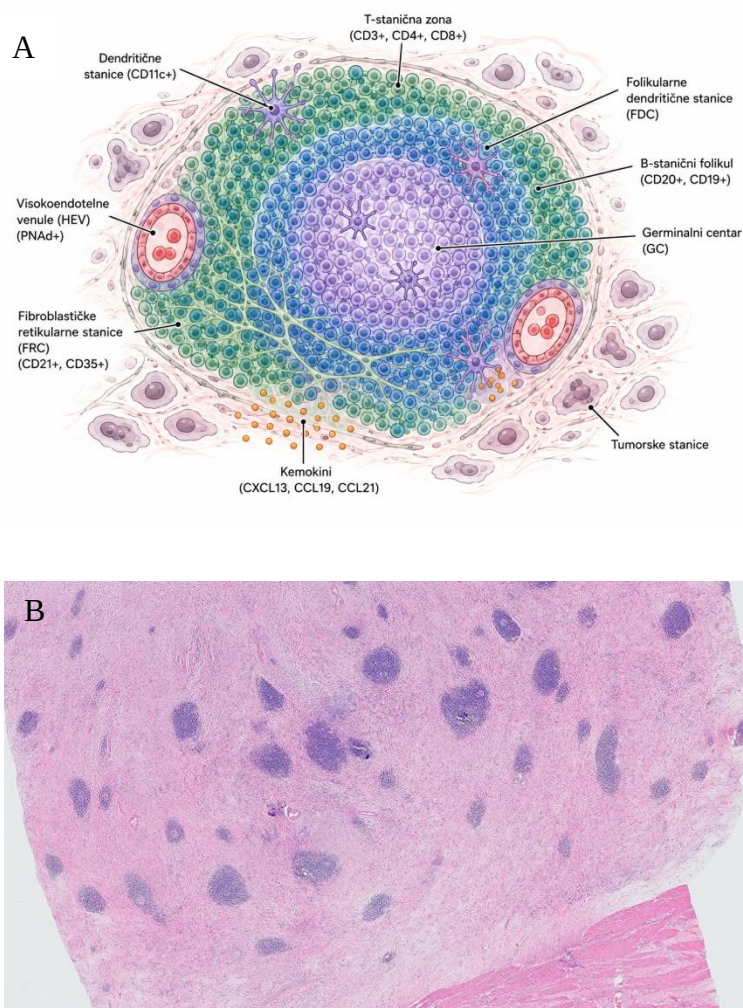
1.9. Tumorski mikrookoliš karcinoma želuca

Tumorski mikrookoliš je složeni dinamični sustav sastavljen od tumorskih i stromalnih stanica, krvnih i limfnih žila, izvanstaničnog matriksa i stanica urođenog i stečenog imuniteta. Interakcija među njima važna je u regulaciji tumorskog rasta, angiogeneze, invazivnosti, metastaziranja i u odgovoru na liječenje. Biološko ponašanje tumora nije zadano isključivo njegovim genetskim značajkama, već i komunikacijom s mikrookolišem preko citokina i kemokina (43–45). TIM obuhvaća različite populacije imunoloških stanica u tumoru i neposrednoj okolini (46) (Slika 8).



Slika 8. Stanični sastav i funkcija tercijarnih limfoidnih struktura u tumorskom mikrookolišu. Izvor podataka: Schumacher TN i sur. 2022. (48). Izrađeno pomoću alata umjetne inteligencije ChatGPT (OpenAI, GPT-5.5).

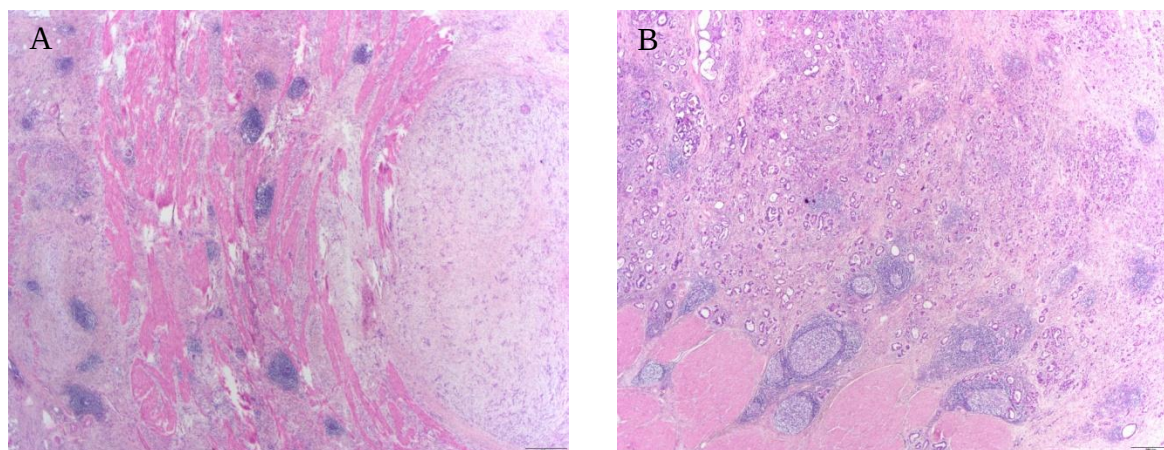
Učinak TIM-a ovisi o ravnoteži između protutumorskih i imunosupresivnih mehanizama koja utječe na tijek bolesti, odgovor na liječenje i sklonost metastaziranju (42). Ključnu ulogu u protutumorskom imunološkom odgovoru imaju citotoksični T limfociti ($CD8^{+}$) koji prepoznaju neoantigene i mogu izravno uništiti tumorske stanice. Povećana infiltracija citotoksičnih T limfocita u solidnim tumorima povezana je s povoljnijom prognozom i boljim odgovorom na liječenje (32). Važnu ulogu imaju dendritičke stanice koje prezentacijom antigena povezuju urođeni i stečeni imunološki odgovor i stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer*, *NK*) koje mogu eliminirati tumorske stanice neovisno o prethodnoj senzibilizaciji. Nasuprot tome, određene populacije imunoloških stanica potiču imunološku toleranciju. Regulatorni T limfociti (Treg) ograničavaju aktivaciju efektorskih T limfocita i potiskuju protutumorski imunološki odgovor. Sličan učinak imaju M2 makrofagi i mijeloidne supresorske stanice koje lučenjem različitih citokina i čimbenika rasta pridonose progresiji tumora, angiogenezi i metastaziranju (42). Posljednjih godina istražuje se brojnost pojedinih populacija imunoloških stanica, njihova organizacija i prostorni raspored u tumorskom mikrookolišu (47). U tom kontekstu posebnu pozornost privlače tercijarne limfoidne strukture (engl. *tertiary lymphoid structures*, *TLS*) – organizirani limfocitni agregati kao mjesto lokalne aktivacije i koordinacije protutumorskog imunološkog odgovora (48). U tumorskom mikrookolišu se imune stanice mogu naći u difuznom rasporedu ili u nakupinama koje su koji put organizirane poput limfnog čvora bez čahure (48) (Slika 9).



Slika 9. Tercijarna limfoidna struktura u adenokarcinomu želuca difuznog podtipa prema Laurenu. (A) Shematski prikaz; Izvor podataka: Schumacher TN i sur. 2022. (48). Izrađeno pomoću alata umjetne inteligencije ChatGPT (OpenAI, GPT-5.5). (B) Histološki prikaz (HE 40×); Izvor: vlastito istraživanje.

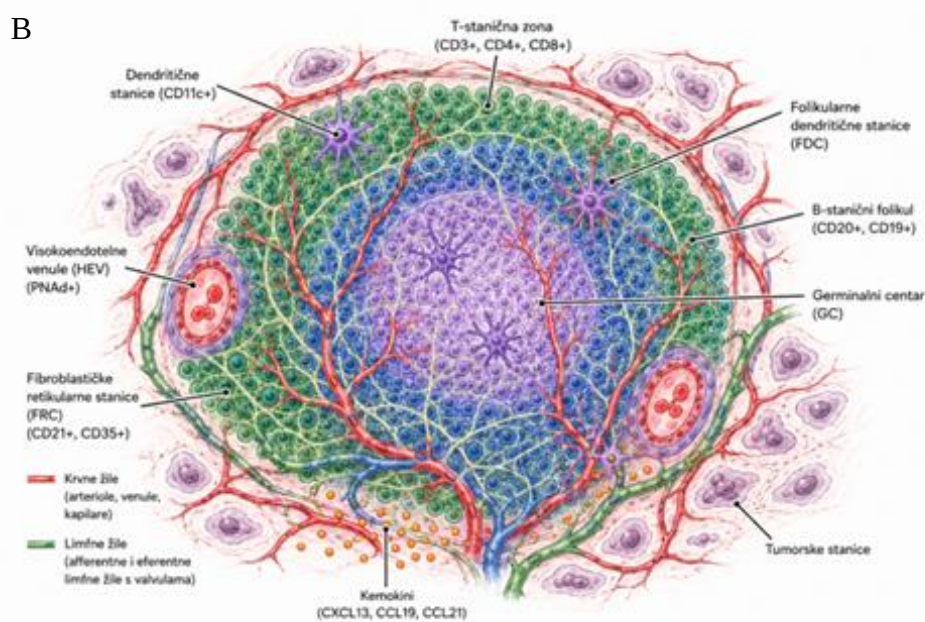
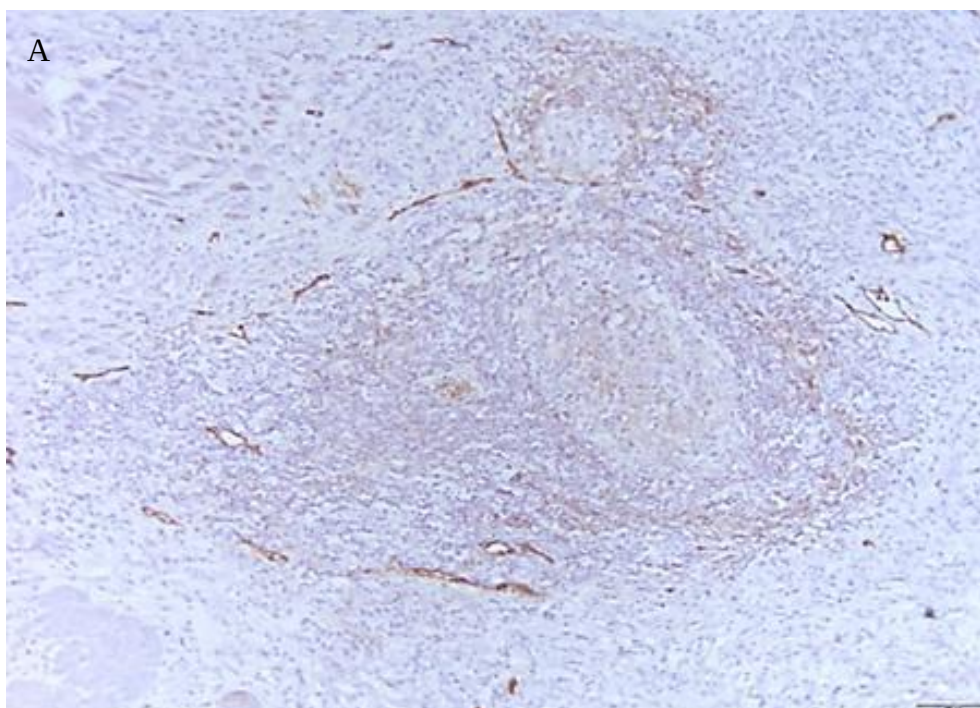
TLS-ovi nisu specifični za tumore već se mogu naći u kroničnim upalnim stanjima – u autoimunim bolestima, kroničnim infekcijama i kod kroničnog odbacivanja solidnog presađka. TLS-ovi predstavljaju lokalno organizirani imunološki odgovor u ne-limfoidnim tkivima koji nastaje kao posljedica dugotrajne antigene stimulacije (49). Zbog sposobnosti okupljanja i organizacije različitih populacija imunih stanica, TLS-ovi imaju važnu ulogu u regulaciji lokalnog imunološkog odgovora (48). U tumorskoj imunologiji intenzivno se istražuje utjecaj TLS-ova na progresiju bolesti, odgovor na liječenje i ishod bolesti (32). TLS-ovi pokazuju različit stupanj organizacije – od jednostavnih limfoidnih agregata do razvijenih

struktura koje nalikuju sekundarnim limfnim organima (Slika 10) (48). U zrelim TLS-ovima moguće je razlikovati parafolikularnu T zonu i B-staničnu zonu s germinativnim centrom, što upućuje na lokalnu aktivaciju i zrelost imunološkog odgovora. Osim T i B limfocita, TLS-ovi sadrže dendritičke stanice, venule visokog endotela, stromalne stanice i druge imunološke populacije kojih sastav ovisi o stupnju sazrijevanja i obilježjima lokalnog mikrookoliša (50).



Slika 10. Tercijarne limfoidne strukture u mikrookolišu adenokarcinoma želuca kao (A) limfocitni agregati i (B) zreli s formiranim sekundarnim folikulima i parafolikularnom T zonom (HE, 100×); Izvor: vlastito istraživanje.

TLS-ovi su povezani s razvijenom mrežom krvnih i limfnih žila koje omogućuju kontinuiranu regrutaciju, migraciju i recirkulaciju imunoloških stanica (Slika 11).



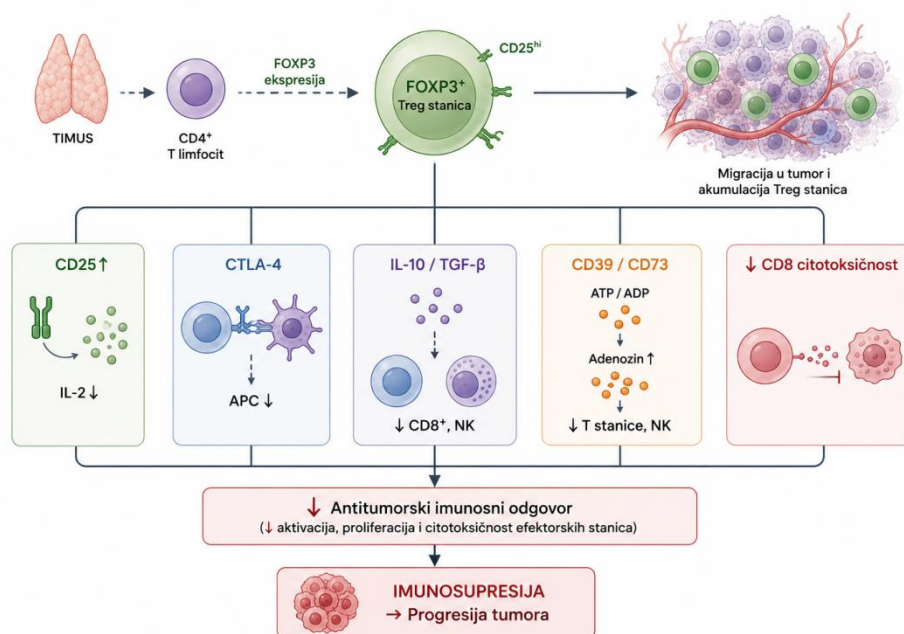
Slika 11. Limfatična mreža oko tercijarne limfoidne strukture u mikrookolišu adenokarcinoma želuca prikazana (A) histološki (podoplanin, 200×); Izvor: vlastito istraživanje i (B) shematski; Izvor podataka: Schumacher TN i sur. 2022. (48). Izrađeno pomoću alata umjetne inteligencije ChatGPT (OpenAI, GPT-5.5).

TLS-ovi nisu pasivne nakupine limfocita, već dinamične imunološke niše koje aktivno sudjeluju u regulaciji lokalnog imunološkog odgovora i stalno komuniciraju s tumorskim

mikrookolišem (48,50). Funkcionalni učinak TLS-ova ne ovisi samo o njihovoj prisutnosti i stupnju organizacije, nego i sastavu imunih stanica koje ih tvore i unutarnjoj ravnoteži efektorskih i imunosupresivnih mehanizama (32,48). Istraživanja u različitim zloćudnim tumorima uključujući adenokarcinom želuca, pokazala su da je prisutnost TLS-ova najčešće povezana s povoljnijim ishodom bolesti i duljim preživljenjem bolesnika (32,48,51,52). Rezultati studija nisu posve jednoznačni jer nema standardiziranih kriterija za identifikaciju i vrednovanje TLS-ova te se rabe različite metode za procjenu njihove prisutnosti, gustoće i stupnja sazrijevanja (36,53). U novije vrijeme pozornost se posvećuje staničnom sastavu i funkcionalnim obilježjima TLS-ova. Izgleda da TLS-ovi nisu jedinstvene strukture, već im učinak ovisi o međusobnim odnosima imunoloških populacija koje okupljaju. Dok TLS-ovi bogati efektorskim imunim stanicama mogu poticati protutumorski odgovor, izgleda da povećana zastupljenost imunosupresivnih populacija mijenja funkciju i slabi zaštitnu ulogu TLS-a (32).

1.9.1. Regulatorni T limfociti

Regulatorni T limfociti (Treg) su subpopulacija T stanica koja ima ključnu ulogu u održavanju imunološke tolerancije i sprječavanju pretjeranog imunološkog odgovora. Treg stanice nastaju u timusu pod utjecajem transkripcijskog čimbenika FOXP3 (engl. *forkhead box P3*). Te stanice ostvaruju imunosupresivni učinak lučenjem imunosupresivnih citokina i izražajem CD25, receptora za IL-2 kojeg tako oduzimaju efektorskim T limfocitima i inhibiraju njihovu aktivaciju i efektorsku funkciju (54). Navedeni mehanizmi prirodno su potrebni za održavanje imunološke homeostaze i sprječavanje autoimunosti, ali u tumorskom mikrookolišu mogu pogodovati izbjegavanju imunološkog nadzora, poticati rast i progresiju tumora (55). Dvoje američkih i jedan japanski znanstvenik koji su otkrili FOXP3 i njegovu važnost u perifernoj imunosti, dobitnici su Nobelove nagrade za medicinu i fiziologiju 2025. godine. Mary E. Brunkow i Fred Ramsdell su 2001. godine otkrili i identificirali gen *FOXP3* i dokazali da njegove mutacije uzrokuju teške autoimune bolesti kod miševa i ljudi, tzv. IPEX sindrom (engl. *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*) (56,57). Šest godina prije Shimon Sakaguchi je otkrio regulacijske T-limfocite (Treg) (58), a potom 2003. godine povezao ta dva otkrića i dokazao da je FOXP3 glavni "prekidač" koji upravlja razvojem i radom tih ključnih obrambenih stanica - "kočničara" imuniteta (59) (Slika 12).

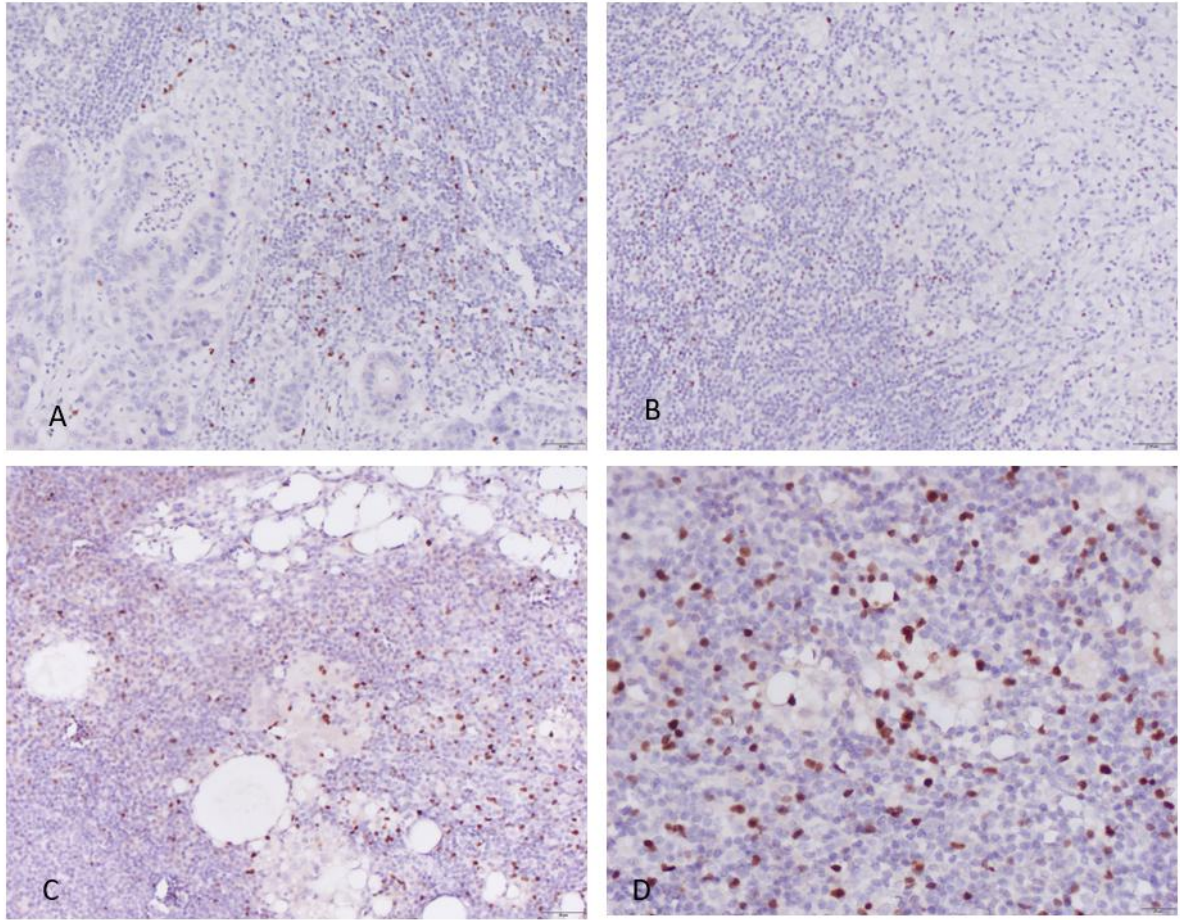


Slika 12. Djelovanje Treg stanica u tumorskom mikrookolišu. Izvor podataka: Sakaguchi S i sur. 2020. (54). Izrađeno pomoću alata umjetne inteligencije ChatGPT (OpenAI, GPT-5.5).

FOXP3 je ključni transkripcijski čimbenik i najčešće korišten imunohistokemijski biljeg regulatornih T limfocita (Treg) (59). Međutim, njegova ekspresija nije potpuno specifična te se može prolazno javiti i u aktiviranim konvencionalnim $CD4^{+}$ T limfocitima tijekom snažne imunološke stimulacije, pri čemu te stanice ne stječu karakterističnu imunosupresivnu funkciju regulatornih T limfocita (60). Unatoč tome, FOXP3 se u tumorskom mikrookolišu rutinski koristi kao surogatni biljeg regulatornih T limfocita jer $FOXP3^{+}$ limfociti u najvećoj mjeri odgovaraju toj staničnoj populaciji (54).

Prognostički značaj $FOXP3^{+}$ regulatornih T limfocita nije jednoznačan već ovisi o sijelu i molekularnim obilježjima tumora i prostornoj raspodjeli Treg stanica u tumorskom mikrookolišu (54). Većina meta-analiza pokazuje da je infiltracija $FOXP3^{+}$ T stanica u solidnim tumorima povezana s nepovoljnom prognozom (61). Perrone i sur. te Zhou i sur. dokazali su u adenokarcinomu želuca povezanost između povećane intratumorske gustoće $FOXP3^{+}$ T limfocita i lošijeg kliničkog ishoda (62,63). Uz gustoću $FOXP3^{+}$ T stanica u tumorskom mikrookolišu analizira se njihova raspodjela, posebno u tercijarnim limfoidnim strukturama. Smatra se da sastav imunih stanica TLS-ova kao fokusa lokalne aktivacije protutumorskog imunološkog odgovora, može taj odgovor modificirati (64). Devi-Marulka i

sur. analizirali su gustoću FOXP3⁺ T limfocita u tumorskom mikrookolišu i u TLS-ovima kod bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica i dokazali da je veća gustoća u obje lokalizacije povezana s nepovoljnijom prognozom (65). Međutim, mehanizmi njihova djelovanja nisu identični jer intratumorski FOXP3⁺ T limfociti prvenstveno suprimiraju efektorski T-stanični odgovor, a FOXP3⁺ T stanice unutar TLS-a mogu regulirati i B-staničnu aktivaciju, sazrijevanje u germinativnom centru i humoralni imuni odgovor (66). Zaključak je da prisutnost regulatornih T limfocita može narušiti zaštitnu ulogu TLS-a i pridonijeti stvaranju lokalnog imunosupresivnog mikrookoliša. Stoga se FOXP3⁺ regulatorni T limfociti unutar TLS-a smatraju potencijalno važnim prognostičkim biljegom i metom budućih imunoterapijskih strategija (36). U većini objavljenih istraživanja o tercijarnim limfoidnim strukturama analizirana je njihovu prisutnost, ali ne i morfološka obilježja, stupanj sazrijevanja i sastav imunoloških stanica (32,67). Moguće je da odnos efektorskih i regulatornih T limfocita TLS-a određuje njegovu pretežnu protutumorsku ili imunosupresivnu ulogu (36,68,69). Povećana gustoća FOXP3⁺ regulatornih T limfocita u adenokarcinomu želuca povezana je s nepovoljnijom prognozom (62). U nekim gastrointestinalnim tumorima utvrđena je veća zastupljenost FOXP3⁺ stanica u metastatskim limfnim čvorovima nego u primarnom tumoru (63,70,71) (Slika 13). Uloga FOXP3⁺ regulatornih T limfocita u TLS-u i veza sa stupnjem sazrijevanja TLS-ova nije potpuno razjašnjena (47,50,72). Osim toga, većina dostupnih podataka potječe iz azijskih populacija, dok su istraživanja provedena u europskim kohortama malobrojna (68). Potrebna su stoga daljnja ispitivanja odnosa TLS-a i FOXP3⁺ regulatornih T limfocita u adenokarcinomu želuca, osobito u kontekstu biološkog ponašanja tumora i kliničkog ishoda bolesti.



Slika 13. FOXP3⁺ regulacijski limfociti u drenažnim limfnim čvorovima u adenokarcinomu želuca (A) intestinalnog podtipa, (B) difuznog podtipa i (C i D) drenažni limfni čvor bez metastaze u ispitanika s N1 bolešću. (FOXP3, A, B i C 200×; D 400×); Izvor: vlastito istraživanje.

2. HIPOTEZE I CILJEVI

Hipoteze

1. Prisutnost, stupanj organizacije i stanični sastav intratumorskih tercijarnih limfoidnih struktura (TLS) povezani su s općim preživljenjem bolesnika operiranih zbog adenokarcinoma želuca.
2. Stupanj organizacije intratumorskih TLS-ova povezan je s histološkim obilježjima agresivnosti adenokarcinoma želuca.
3. Prisutnost FOXP3⁺ regulatornih limfocita unutar intratumorskih TLS-ova povezana je s kraćim općim preživljenjem bolesnika operiranih zbog adenokarcinoma želuca.

Glavni ciljevi

u ispitanika operiranih zbog adenokarcinoma želuca analizirati

- prognostički značaj intratumorskih TLS-ova
- prognostički značaj prisutnosti FOXP3⁺ regulatornih limfocita u intratumorskim TLS-ovima

Sporedni ciljevi su:

- analizirati brojnost, veličinu i stupanj organizacije intratumorskih TLS-ova u adenokarcinomu želuca.
- odrediti broj i gustoću CD8⁺ T limfocita i FOXP3⁺ regulatornih limfocita unutar intratumorskih TLS-ova.
- ispitati povezanost morfoloških obilježja intratumorskih TLS-ova sa CD8⁺ T limfocitima i FOXP3⁺ limfocitima te s histološkim obilježjima agresivnosti tumora.
- analizirati povezanost morfoloških obilježja intratumorskih TLS-ova te gustoće CD8⁺ T limfocita i FOXP3⁺ limfocita s ukupnim preživljenjem bolesnika operiranih zbog adenokarcinoma želuca.
- analizirati prisutnost FOXP3⁺ regulatornih limfocita u drenažnim limfnim čvorovima s obzirom na prisutnost metastatskog tumora i pN stadij.

3. METODE I ISPITANICI

3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je ustrojeno kao retrospektivna opservacijska studija s presječnom analizom patohistoloških obilježja i longitudinalnim praćenjem preživljenja ispitanika. Izvor podataka bio je primarni, a podaci su prikupljeni iz pismohrane Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split. Na istom Zavodu urađeno je cjelokupno istraživanje. Podaci o preživljenju ispitanika i datumu smrti prikupljeni su iz bolničkog mrtvozorstva i Matice umrlih Splitsko-dalmatinske županije. Za provedbu istraživanja ishođena je suglasnost Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (br. 520-03/19-01/102, 30.10.2025). Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije i odredbama Kodeksa medicinske etike i deontologije.

3.2. Ispitanici

U studiji su 92 ispitanika koji su od 1. siječnja 2015. do 31. prosinca 2019. godine zbog adenokarcinoma želuca bili podvrgnuti gastrektomiji s limfadenektomijom. Prikupljeni su demografski podaci o dobi i spolu i kliničko-patološki podaci o podtipu adenokarcinoma, prisutnosti LVI i PNI te patološkom TNM stadiju. Opće preživljenje je analizirano od datuma operacije do datuma smrti od bilo kojeg uzroka ili posljednjeg dana kliničkog praćenja 31. svibnja 2025. godine kad je ishod cenzoriran kao živ ili mrtav. Iz studije su isključeni ispitanici s karcinomom gastrointestinalnog spoja, sinhronim karcinomom, prethodno provedenom neoadjuvantnom terapijom, nepotpunim podacima o kliničkom praćenju ili ispitanici koji nisu imali dostupne parafinske blokove tumorskog tkiva.

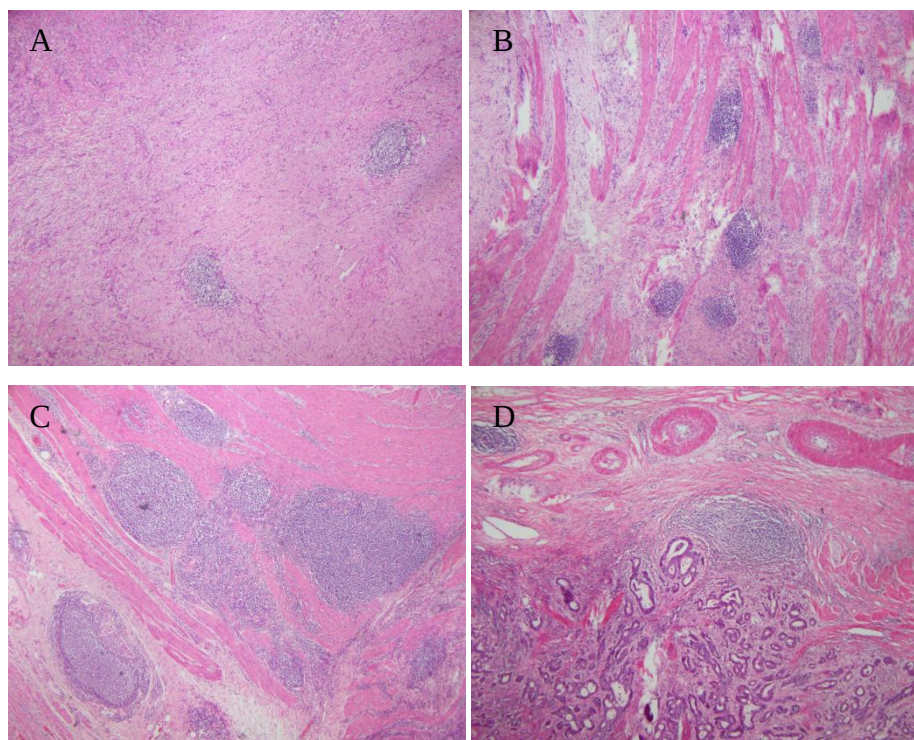
3.3. Metode

Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva izrezani su preparati debljine 3 μm i obojeni hematoksilin-eozinom (HE). Imunohistokemijsko bojenje izvršeno je na uređaju Ultra Benchmark (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, SAD). Za imunohistokemijsku analizu rabljeno je mišje monoklonsko protutijelo FOXP3 (236A/E7; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) i zečje monoklonsko protutijelo CD8 (SP239; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, SAD). Imunoreakcija je vizualizirana uporabom UltraView Universal DAB detekcijskog kita (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, SAD). Histološka i

imunohistokemijska stakalca analizirani su svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX63, Olympus Corporation, Tokyo, Japan), fotografirani digitalnom kamerom i analizirani uporabom računalnog programa cellSens (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Sve preparate neovisno su analizirala dva patologa, a u slučaju neslaganja konačna procjena donesena je zajedničkim pregledom i konsenzusom.

3.3.1. Procjena veličine i zrelosti tercijarnih limfoidnih struktura

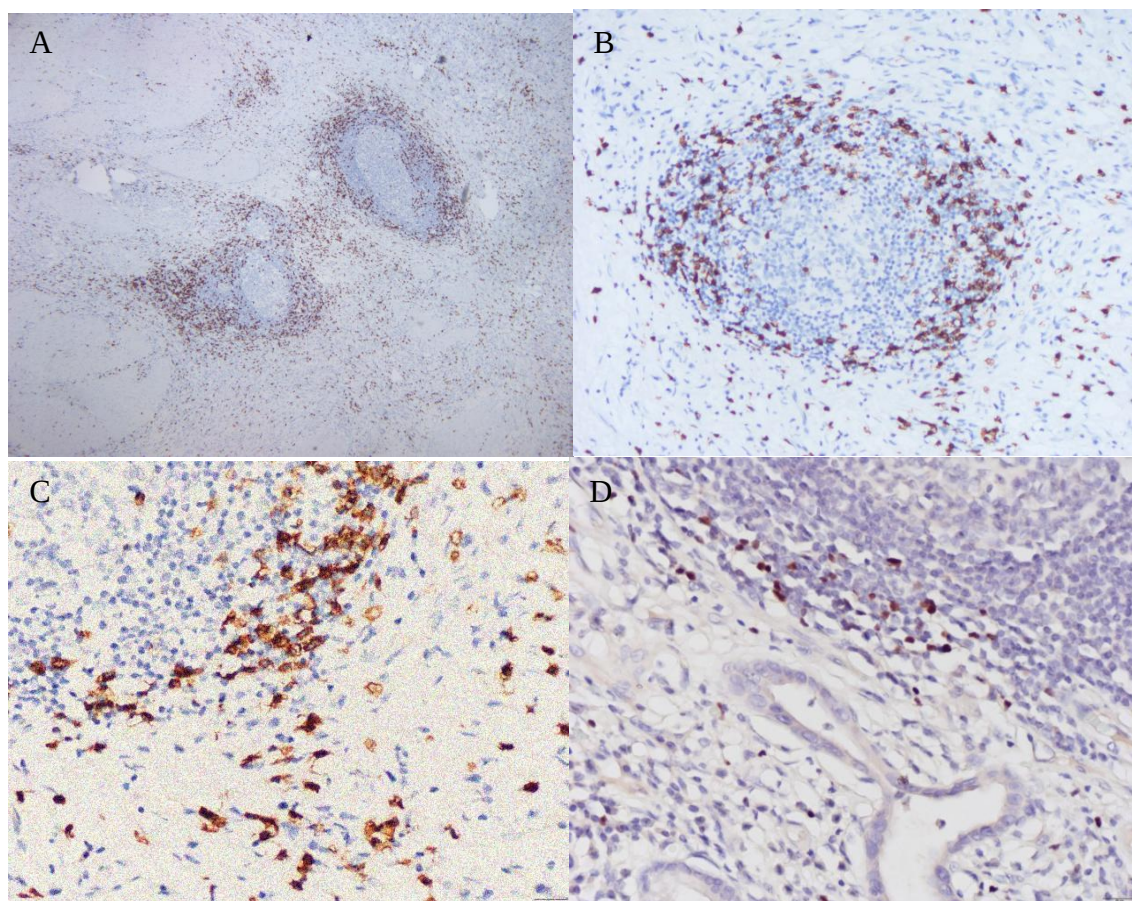
Radi standardizacije analize, tercijarne limfoidne strukture (TLS) definirane su kao neinkapsulirani organizirani limfoidni agregati promjera najmanje 200 μm , smješteni u sluznici, intratumorski ili na invazivnom rubu tumora. Analizirani su njihova lokalizacija, gustoća, veličina i stupanj zrelosti. Gustoća TLS-ova određena je brojanjem tercijarnih limfoidnih struktura u tri uzastopna mikroskopska vidna polja pri povećanju 40 $\times$. Prosječna površina TLS-a u mm^2 izračunata je kao srednja vrijednost površina četiri uzastopna TLS-a na preparatu. Stupanj zrelosti određivan je prema prisutnosti germinativnog centra. Strukture s jasno oblikovanim germinativnim centrom smatrane su zrelim TLS-ovima, dok su limfoidni agregati i nakupine limfocita bez jasne folikularne organizacije svrstani u skupinu nezrelih TLS-ova (Slika 14). Slučajevi s isključivo nezrelim TLS-ovima klasificirani su kao nezreli, dok su slučajevi sa zrelim TLS-ovima, neovisno o istodobnoj prisutnosti nezrelih oblika, klasificirani kao zreli.



Slika 14. Tercijarne limfoidne strukture u adenokarcinomu želuca kao (A i B) limfoidni agregati ili (C i D) zreli s formiranim germinativnim centrom i parafolikularnom T zonom (HE, 40×); Izvor: vlastito istraživanje.

3.3.2. Imunohistokemijska analiza

Imunohistokemijska stakalca analizirana su i fotografirana pri povećanju 400×. $CD8^+$ T limfociti imali su smeđe membransko obojenje, a $FOXP3^+$ regulatorni limfociti smeđe nuklearno obojenje (Slika 15). Broj $CD8^+$ T stanica, odnosno $FOXP3^+$ stanica analiziran je uporabom računalnog programa cellSens (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) i izražen kao apsolutni broj na jedinicu površine TLS-a (broj stanica/mm²).



Slika 15. Imunohistokemijski prikaz efektorskih $CD8^+$ T limfocita (A – 200×, C – 400×) te regulacijskih $FOXP3^+$ limfocita (B – 200×, D – 400×) u terciarnoj limfoidnoj strukturi; Izvor: vlastito istraživanje.

3.4. Statistička analiza podataka

Statistička analiza provedena je uporabom programskog paketa IBM SPSS Statistics for Windows, verzija 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, SAD). Kategorički podatci prikazani su kao apsolutne frekvencije i postoci, a analizirani χ^2 -testom, Fisherovim egzaktnim testom i Wilcoxonovim testom prema potrebi. Numerički podatci prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon, a uspoređivani Mann-Whitneyjevim U testom. Povezanost histoloških pokazatelja s pozitivnim nodalnim statusom analizirana je binarnom logističkom regresijom. Ukupno preživljenje analizirano je Kaplan-Meierovom metodom, a razlike između skupina procijenjene su log-rank testom. Sve P-vrijednosti bile su dvostrane, a razina statističke značajnosti postavljena je na $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Kliničko-patološke značajke ispitanika i povezanost s prisutnošću tercijarnih limfoidnih struktura

Od 92 ispitanika s lokaliziranim ili lokalno uznapredovalim karcinomom želuca, 63 (68,5 %) su bili muškog, a 29 (31,5 %) ženskog spola. Medijan dobi bio je 75 godina (IQR 64–81). Intestinalni podtip adenokarcinoma prema Laurenovoj klasifikaciji je bio najviše zastupljen, u 63,3 % slučajeva. Prema Borrmannovoj klasifikaciji najčešći su bili ulcerativni (33,0 %) i ulcero-vegetirajući tumori (27,5 %), dok su infiltrativni i polipoidni bili zastupljeni u 23,1 %, odnosno 16,5 % slučajeva. Većina tumora bila je u uznapredovalom lokalnom stadiju (pT3 i pT4), njih 79,3 %. Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima imalo je 73,9 % ispitanika. Limfovaskularna invazija nađena je u 78,6 %, a perineuralna invazija u 62,3 % slučajeva. Tercijarne limfoidne strukture identificirane su u 66 (71,7 %) slučajeva, dok u 26 (28,3 %) nisu bile prisutne. Usporedbom ispitanika sa i bez TLS-ova nisu utvrđene statistički značajne razlike po spolu, dobi, Laurenovu histološkom podtipu, Borrmannovu makroskopskom tipu, dubini invazije tumora, zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova, kliničkom stadiju bolesti ni prisutnosti limfovaskularne i perineuralne invazije (Tablica 3). Ispitanici s TLS-pozitivnim tumorima imali su značajno dulje ukupno preživljenje u odnosu na ispitanike bez TLS-ova (19,4 naspram 9,5 mjeseci; Mann-Whitney U test, $p = 0,006$).

Tablica 3. Demografski, klinički i patološki pokazatelji u 92 ispitanika s adenokarcinomom želuca

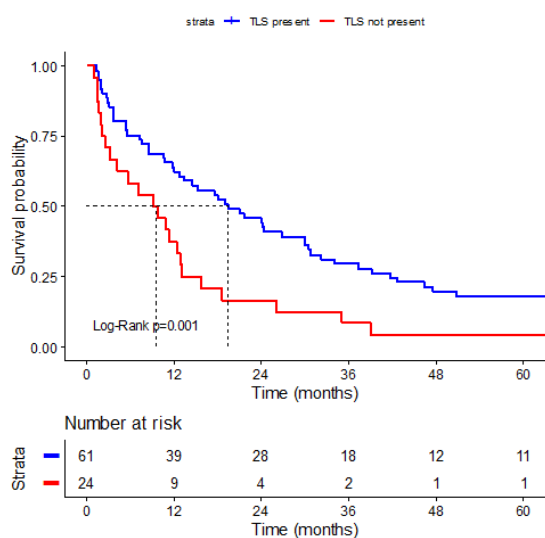
VARIJABLA		TLS		p
		N (%) ili median (IQR)		
		Prisutni (N=66. 71.7%)	Odsutni (N=26. 28.3%)	
Spol	muški	46 (69.7)	17 (65.4)	0.689*
	ženski	20 (30.3)	9 (34.6)	
Dob, godine		74.45 (62.5-81.25)	76 (67-80.25)	0.529 [#]
Lauren podtip	intestinalni	41 (62.1)	16 (66.7)	0.692*
	Difuzni/miješani	25 (37.9)	8 (33.3)	
Bormann tip	polipoidni	9 (13.6)	6 (24)	0.564*
	ulcerativni	24 (36.4)	6 (24)	
	ulcerovegetativni	18 (27.3)	7 (28)	
	infiltrativni	15 (22.7)	6 (24)	
pT	pT1, 2	16 (24.2)	3 (11.5)	0.175*
	pT3, 4	50 (75.8)	23 (88.5)	

pN	negativni	18 (27.3)	6 (23.1)	0.680*
	pozitivni	48 (72.7)	20 (76.9)	
Klinički stadij	I, II	32 (49.2)	9 (34.6)	0.206*
	III, IV	33 (50.8)	17 (65.4)	
Limfovaskularna invazija	ne	10 (20.4)	5 (23.8)	0.751*
	da	39 (79.6)	16 (76.2)	
Perineuralna invazija	ne	20 (42.6)	6 (27.3)	0.222*
	da	27 (57.4)	16 (72.7)	
Ukupno preživljenje, mjeseci		19.4 (6.5-42.1)	9.45 (2.23-15.05)	0.006[#]

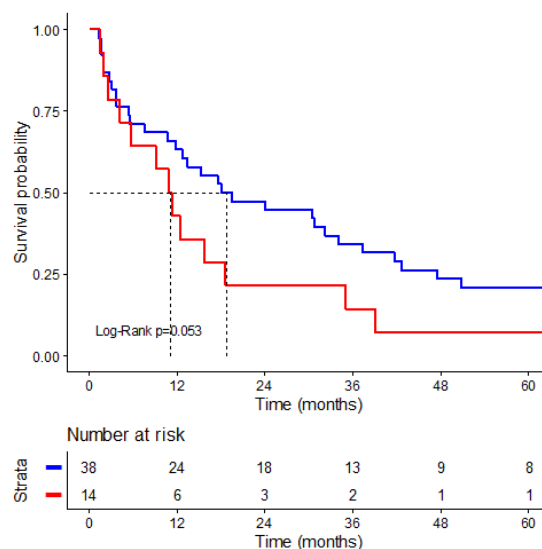
*- χ^2 test; # - Mann-Whitney U test; **boldirano** p vrijednost < 0.05; IQR interkvartilni raspon

4.2. Analiza ukupnog preživljenja prema prisutnosti tercijarnih limfoidnih struktura

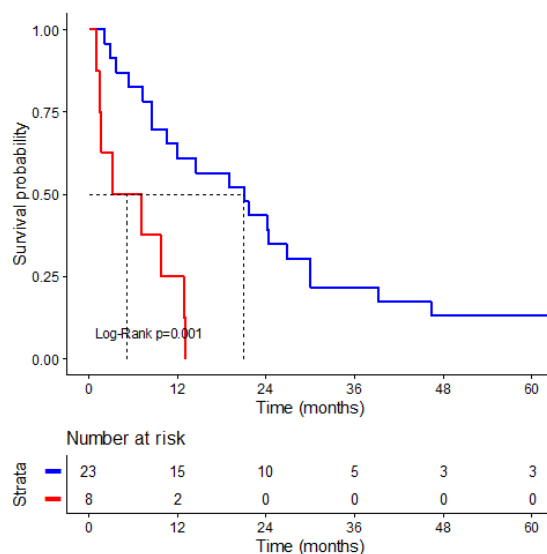
Analiza ukupnog preživljenja provedena je kod 85 ispitanika. Razdoblje praćenja bilo je od postavljanja dijagnoze do smrti ili zadnjeg dana praćenja 31. svibnja 2025. godine. Ukupno je cenzurirano 9 ispitanika (10,6 %), a medijan ukupnog preživljenja bio je 13,5 mjeseci (95 % CI 7,979 – 19,021). Kaplan-Meierovom analizom utvrđena je statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju između ispitanika s prisutnim i odsutnim intratumorskim TLS-ovima (Slika 16A). Medijan ukupnog preživljenja u skupini TLS-pozitivnih ispitanika iznosio je 19,4 mjeseca (95 % CI 9,779 – 29,021), a u skupini bez TLS-ova 9,2 mjeseca (95 % CI 3,079 – 15,321) (log-rank test, $p = 0,001$). Procijenjena dvogodišnja stopa preživljenja iznosila je 44,3% (95 % CI 33,4 – 58,7) u skupini s TLS-ovima u tumoru i 16,7 % (95 % CI 6,8 – 40,8) u skupini bez TLS-ova u tumoru. Analizom prema Laurenovu histološkom podtipu uočen je sličan obrazac preživljenja. U skupini ispitanika s intestinalnim podtipom je medijan ukupnog preživljenja bio 15,2 mjeseca (95 % CI 8,604 – 21,796) ako su imali TLS-ove, a 10,8 mjeseci (95 % CI 6,950 – 14,650) ako su TLS-ovi bili odsutni (log-rank test, $p = 0,053$) (Slika 16B). U skupini difuznog i mješovitog podtipa medijan ukupnog preživljenja iznosio je 21,0 mjesec (95 % CI 9,887 – 32,113) u ispitanika s TLS-ovima, a 3,3 mjeseca (95 % CI 0 – 10,784) ako su TLS-ovi bili odsutni (log-rank test, $p = 0,001$) (Slika 16C).



(A)



(B)



(C)

Slika 16. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja prema statusu tercijarnih limfoidnih struktura (TLS): (A) svi ispitanici; (B) ispitanici s intestinalnim podtipom i (C) ispitanici s difuznim/mješovitim podtipom adenokarcinoma želuca. Isprekidane linije označavaju medijan preživljenja.

4.3. Povezanost zrelosti tercijarnih limfoidnih struktura s kliničko-patološkim obilježjima i imunološkim sastavom TLS-a

Od ukupno 66 ispitanika s prisutnim TLS-ovima, u 49 (74,2 %) su nađeni isključivo limfoidni agregati/nezreli TLS-ovi, a u 17 (25,8 %) TLS-ovi s germinativnim centrom. Među tako određenim skupinama ispitanika nisu utvrđene statistički značajne razlike po spolu, životnoj dobi, Laurenovu histološkom podtipu, Borrmannovu tipu, dubini invazije tumora (pT), kliničkom stadiju bolesti ni prisutnosti perineuralne invazije (Tablica 4). Nezreli TLS-ovi bili su češće povezani s limfovaskularnom invazijom, 88,6 % naspram 57,1 % ($\chi^2 = 6.081$, $p = 0,014$) i metastazama u regionalne limfne čvorove, 79,6 % naspram 52,9 % ($\chi^2 = 4.520$, $p = 0,034$). Nasuprot tome, zreli TLS-ovi su bili češće prisutni u ispitanika koji nisu imali metastazom zahvaćene limfne čvorove. Zreli TLS-ovi bili su značajno brojniji od nezrelih TLS-ova, s medijanom 8 naspram 4 (Mann-Whitney U test, $p = 0,001$) i s prosječno većom površinom, 59 mm² naspram 19 mm² (Mann-Whitney U test, $p = 0,016$). Analiza imunološkog sastava TLS-ova pokazala je da je gustoća CD8⁺ T limfocita nije značajno različita među skupinama (Mann-Whitney U test, $p = 0,795$). Međutim, zreli TLS-ovi imali su značajno veću gustoću FOXP3⁺ regulatornih T limfocita u odnosu na nezrele TLS-ove, 169,05 naspram 27,27 stanica/mm² (Mann-Whitney U test, $p = 0,029$). Sukladno tome, omjer CD8⁺/FOXP3⁺ bio je značajno niži u zrelim TLS-ovima nego u nezrelim TLS-ovima, 3,61 naspram 26,49 (Mann-Whitney U test, $p = 0,013$). Ispitanici sa zrelim TLS-ovima imali su značajno dulje ukupno preživljenje u usporedbi s ispitanicima koji su imali isključivo nezrele TLS-ove (34,6 naspram 15,2 mjeseca; Mann-Whitney U test, $p = 0,033$).

Tablica 4. Povezanost zrelosti tercijarnih limfoidnih struktura s kliničko-patološkim obilježjima i zrelošću tercijarnih limfoidnih struktura u adenokarcinomu želuca

VARIJABLA		TLS N (%) ili median (IQR)		p
		Limfoidni agregati/nezreli (N=49. 74.2%)	Zreli (N=17. 25.8%)	
Spol	Muški	35 (71.4)	11 (64.7)	0.602*
	Ženski	14 (28.6)	6 (35.3)	
Dob, godine		71.3 (59.5-80.3)	77 (67.5-82.5)	0.284 [#]
Lauren podtip	Intestinalni	31 (63.3)	10 (58.8)	0.745*
	Difuzni/miješani	18 (36.7)	7 (41.2)	
Bormann klasifikacija	Polypoid	7 (14.3)	2 (11.8)	0.487*
	Ulcerative	18 (36.7)	6 (35.3)	

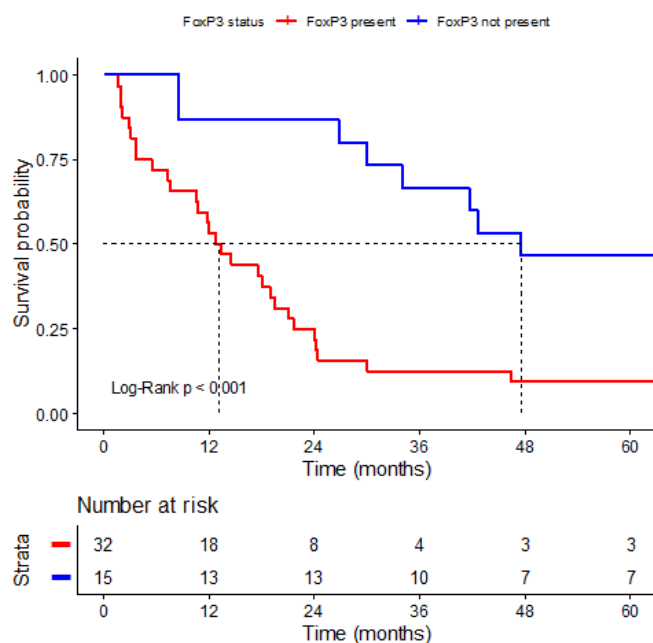
	Ulcerovegetative	15 (30.6)	3 (17.6)	
	Infiltrativni	9 (18.4)	6 (35.3)	
pT	pT1, 2	10 (20.4)	6 (35.3)	0.217*
	pT3, 4	39 (79.6)	11 (64.7)	
pN	negativni	10 (20.4)	8 (47.1)	0.034*
	pozitivni	39 (79.6)	9 (52.9)	
Klinički stadij	I, II	23 (47.9)	9 (52.9)	0.722*
	III, IV	25 (52.1)	8 (47.1)	
Limfovaskularna invazija	Ne	4 (11.4)	6 (42.9)	0.014*
	Da	31 (88.6)	8 (57.1)	
Perineuralna invazija	Ne	14 (42.4)	6 (42.9)	0.978*
	Da	19 (57.6)	8 (57.1)	
Ukupno preživljenje, mjeseci		15.2 (5.4-34)	34.55 (18.93-87.03)	0.033[#]
TLS prosječna površina, mm²		19 (9-125)	59 (19.25-190.75)	0.016[#]
Broj TLS**		4 (2-6)	8 (6-12.5)	0.001[#]
CD8/mm² u TLS***		750 (590-999)	790 (578.25-980.5)	0.795 [#]
FOXP3/mm² u TLS***		27.27 (11.25-60)	169.05 (24.84-223.21)	0.029[#]
CD8/FOXP3		26.49 (19.73-73.3)	3.61 (3.3-28.37)	0.013[#]

*- χ^2 test; # - Mann-Whitney U test; **boldirno** p vrijednost < 0.05

** mjereno u 3 vidna polja malog povećanja ; *** mjereno u 3 vidna polja velikog povećanja; TLS, tercijarne limfoidne strukture; IQR interkvartilni raspon

4.4. Povezanost FOXP3⁺ regulatornih limfocita unutar tercijarnih limfoidnih struktura s ukupnim preživljenjem ispitanika

Analiza ukupnog preživljenja provedena je kod 47 ispitanika s obzirom na prisutnost FOXP3⁺ regulatornih limfocita unutar intratumorskih tercijarnih limfoidnih struktura. Kaplan-Meierovom analizom utvrđeno je značajno kraće ukupno preživljenje u ispitanika s prisutnim FOXP3⁺ regulatornim limfocitima u TLS-ovima u usporedbi s ispitanicima kod kojih FOXP3⁺ stanice nisu bile prisutne. Medijan ukupnog preživljenja u skupini s FOXP3⁺ regulatornim limfocitima bio je 12,7 mjeseci (95 % CI: 8,958 – 16,442), a u skupini bez FOXP3⁺ regulatornih limfocita 47,5 mjeseci (95 % CI: 0 – 101,655) (log-rank test, p < 0,001). Procijenjena dvogodišnja stopa preživljenja iznosila je 21,9 % (95 % CI: 11,4 – 42,1) u ispitanika s FOXP3⁺ regulatornim limfocitima u TLS-ovima i 86,7 % (95 % CI: 71,0 – 100,0) u ispitanika bez FOXP3⁺ stanica u TLS-ovima (Slika 17).



Slika 17. Kaplan-Meierova analiza ukupnog preživljenja prema prisutnosti FOXP3⁺ regulatornih limfocita unutar tercijarnih limfoidnih struktura u adenokarcinomu želuca. Isprekidane linije označavaju medijan preživljenja.

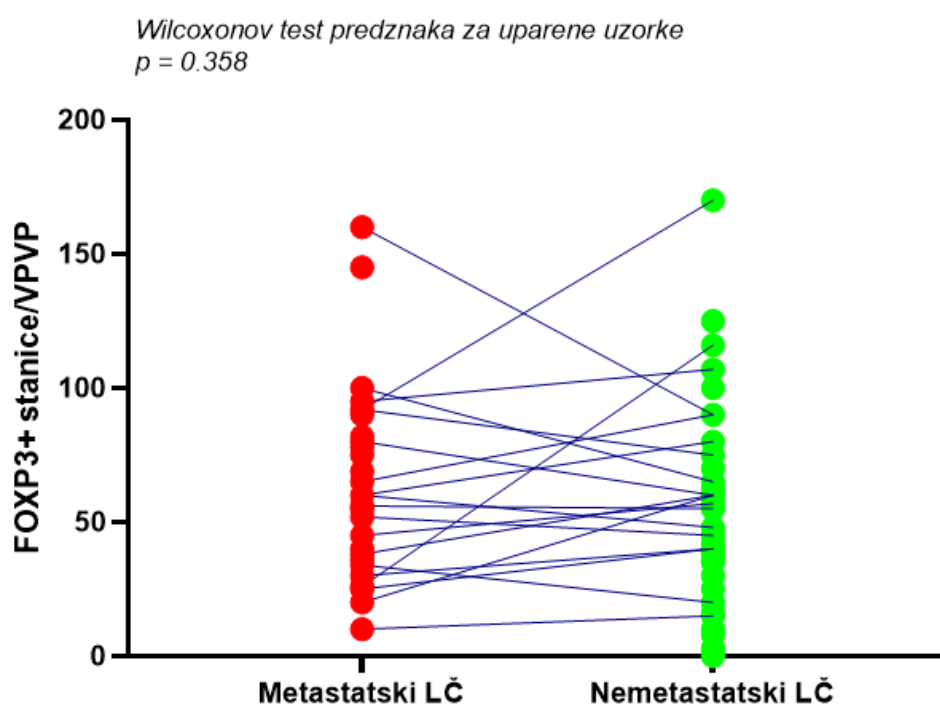
Nakon prilagodbe za dob, patološki stadij (pT) i status limfnih čvorova u multivarijantnoj Coxovoj regresijskoj analizi, prisutnost FOXP3⁺ regulatornih limfocita u TLS-ovima (prisutni/nisu prisutni) ostala je neovisni prediktor kraćeg ukupnog preživljenja (HR = 8,165; 95 % CI 3,341 – 19,955; $p < 0,001$) (Tablica 5).

Tablica 5. Neovisni prognostički čimbenici ukupnog preživljenja ispitanika s karcinomom želuca: multivarijatna Coxova regresijska analiza

VARIJABLA	HR (95% CI)	P
Dob	1,059 (1,024-1,097)	0,001
pT	1,328 (0,527-3,345)	0,547
pN	2,061 (0,813-5,222)	0,127
Status FOXP3 ⁺ limfocita	8,165 (3,341-19,955)	<0,001

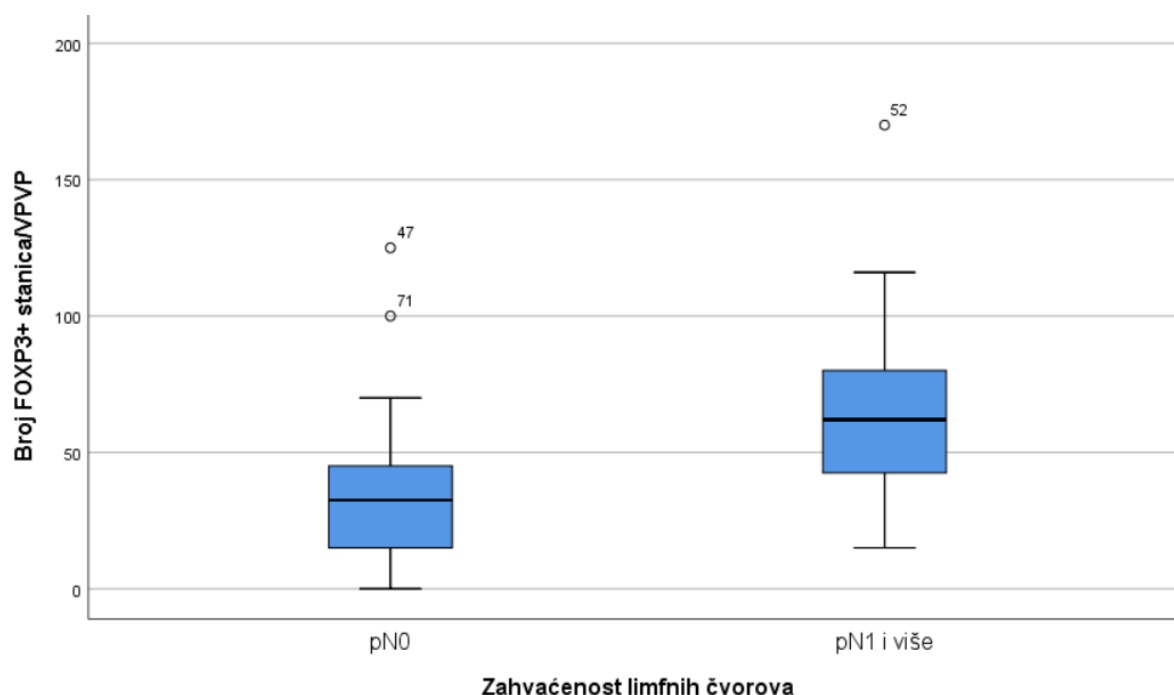
4.5. Povezanost gustoće FOXP3⁺ regulatornih limfocita u limfnim čvorovima s pN statusom

Medijan broja FOXP3⁺ stanica po vidnom polju velikog povećanja u metastatskom limfnom čvoru (medijan 56; IKR 30 – 92) nije se statistički značajno razlikovao u odnosu na medijan broja FOXP3⁺ stanica u nemetastatskom limfnom čvoru (medijan 60; IKR 45 – 90) istog ispitanika ($p = 0,358$) (Slika 18).



Slika 18. Usporedba broja FOXP3⁺ stanica na vidnom polju velikog povećanja (VPVP) u metastatskom i nemetastatskom limfnom čvoru.

Usporedbom samo nemetastatskih limfnih čvorova, utvrđeno je da su ispitanici s regionalnim limfnim čvorovima zahvaćenim metastatskim tumorom (pN1 i više) imali gotovo dvostruko veći medijan broja FOXP3⁺ regulatornih T limfocita po vidnom polju velikog povećanja u svojim nemetastatskim limfnim čvorovima (medijan 62; IKR 41.25 – 80) u odnosu na nemetastatske limfne čvorove ispitanika s pN0 statusom (medijan 32.5; IKR 13.75 – 47.5) (Mann-Whitney U test, $p < 0,0001$) (Slika 19).



Slika 19. Broj FOXP3⁺ T limfocita u nezahvaćenim limfnim čvorovima s obzirom na N status ispitanika s adenokarcinomom želuca.

Napravljena je multivarijatna logistička regresija kako bi se procijenio neovisni utjecaj broja FOXP3⁺ stanica u nemetastatskom limfnom čvoru u ispitanika sa ili bez nodalnih metastaza. Model je bio statistički značajan (Mann-Whitney U test, $p < 0,0001$) i objasnio je 66.5 % varijance u pojavnosti nodalnih metastaza, s ukupnom točnošću od 83 %. Nakon što je model standardiziran u odnosu na dob ispitanika, postojanje limfovaskularne invazije i patološki stadij bolesti, broj FOXP3⁺ stanica u nemetastatskom limfnom čvoru ostao je neovisni prediktor prisutnosti nodalnih metastaza u ispitanika s adenokarcinomom želuca (OR = 1,048; 95 % CI 1,007 – 1,090; $p = 0,022$).

5. RASPRAVA

Tumorski mikrookoliš ima ključnu ulogu u razvoju i progresiji karcinoma (42,43). Često poprima obilježja imunosupresivnog okruženja koje pogoduje preživljavanju tumorskih stanica, izbjegavanju imunološkog nadzora i razvoju otpornosti na terapiju, ali u određenim okolnostima može potaknuti razvoj tercijarnih limfoidnih struktura (47). Smatra se da kronična izloženost tumorskim antigenima i dugotrajna upalna stimulacija dovode do regrutacije limfocita i njihove organizacije u strukturirane limfoidne nakupine (73–77). Tijekom tog procesa aktivirani fibroblasti poprimaju obilježja fibroblastičnih retikularnih stanica dok se diferencijacijom visokih endotelnih venula omogućuje kontinuirani ulazak limfocita iz cirkulacije u tumorsko tkivo (78–80). Posljedično nastaju organizirane limfoidne strukture s odvojenim T-staničnim i B-staničnim zonama koje po svojoj organizaciji i funkciji nalikuju sekundarnim limfatičnim organima (48,50). Za razliku od difuzne limfocitne infiltracije, TLS-ovi predstavljaju visoko organizirana mjesta prezentacije antigena, aktivacije limfocita i razvoja adaptivnog imunološkog odgovora te se njihova prisutnost u brojnim solidnim tumorima često povezuje s povoljnijim kliničkim ishodom (32,36,50,81,82).

Tercijarne limfoidne strukture nisu rijedak histološki nalaz u adenokarcinomu želuca, iako njihova učestalost značajno varira među objavljenim istraživanjima. Xie i sur. opisali su prisutnost TLS-ova u 55 % slučajeva adenokarcinoma želuca, a Jiang i suradnici TLS-ove identificirali u čak 95 % analiziranih tumora (83). Prema Zhang i sur., 7,5 % resekiranih adenokarcinoma želuca bili su bez peritumorskih i intratumorskih TLS-ova (51). U našem istraživanju TLS-ovi su bili prisutni u 71,7 % slučajeva, što je u skladu s rasponom navedenim u literaturi. Razlike u učestalosti TLS-ova među pojedinim studijama odražavaju heterogenost ispitivanih populacija, biološke razlike tumora i njihova mikrookoliša i metodološke razlike u procjeni TLS-ova. Naime, pojedini autori analizirali su isključivo intratumorske TLS-ove, a drugi uključivali i peritumorske ili nisu jasno razlikovali njihovu lokalizaciju. Dodatno, ne postoji jedinstveno prihvaćena definicija TLS-a pa se kriteriji za njihovo prepoznavanje i klasifikaciju razlikuju (36). Takva metodološka neujednačenost otežava izravnu usporedbu rezultata i djelomično objašnjava široki raspon učestalosti TLS-ova u adenokarcinomu želuca. Unatoč navedenim metodološkim razlikama, većina istraživanja dosljedno pokazuje da prisutnost TLS-ova odražava imunološki aktivniji tumorski mikrookoliš i povezan je najčešće s povoljnijim kliničkim ishodom (36).

U našem istraživanju ispitanici s TLS-pozitivnim adenokarcinomom želuca imali su značajno dulje ukupno preživljenje nego ispitanici čiji tumori nisu sadržavali tercijarne

limfoidne strukture. Sličan trend zabilježen je nakon stratifikacije ispitanika prema Laurenovu histološkom podtipu, pri čemu su ispitanici s TLS-pozitivnim tumorima u oba podtipa imali dulje preživljenje od ispitanika bez TLS-ova. Povoljna prognostička vrijednost TLS-ova najčešće se objašnjava time da djeluju kao lokalna mjesta aktivacije i organizacije protutumorskog imunološkog odgovora. Unutar TLS-ova dolazi do prezentacije tumorskih antigena, aktivacije i proliferacije T limfocita, sazrijevanja B limfocita i koordinacije adaptivnog imunološkog odgovora neposredno u tumorskom tkivu. Takva lokalna organizacija omogućuje učinkovitiju komunikaciju između različitih populacija imunoloških stanica i smanjuje potrebu za aktivacijom isključivo u regionalnim limfnim čvorovima. Posljedično se ubrzava razvoj citotoksičnog odgovora usmjerenog protiv tumorskih stanica (36,53). Osim toga, zreli TLS-ovi s germinativnim centrima omogućuju lokalnu aktivaciju i diferencijaciju B limfocita i lokalno stvaranje protutijela (36,84). Naši rezultati su u skladu s brojnim istraživanjima koja su pokazala povoljnu prognostičku vrijednost TLS-ova u adenokarcinomu želuca. Zhang i sur. utvrdili su povezanost TLS-ova s obilnijom limfocitnom infiltracijom tumora i boljim preživljenjem ispitanika (51). Xie i sur. pokazali su da su intratumorski TLS-ovi, osobito smješteni u središtu tumora, povezani s povoljnijom prognozom i boljim odgovorom na terapiju inhibitorima imunoloških kontrolnih točaka (47). Slične rezultate opisali su Yu i sur. u meta-analizi tumora probavnog sustava, potvrđujući povezanost TLS-ova s povoljnijim kliničkim ishodom (52). Navedeni nalazi upućuju da TLS-ovi nisu tek morfološki nalaz, nego odražavaju funkcionalno aktivan protutumorski imunološki odgovor.

Međutim, prognostički značaj TLS-ova nije jednoznačan jer, između ostalog, ovisi o njihovoj lokalizaciji, stupnju organizacije i staničnom sastavu. U svojoj meta-analiza Zhao i sur. pokazali su da su intratumorski TLS-ovi značajno povezani s povoljnijom prognozom, dok su peritumorski TLS-ovi u pojedinim tumorima povezani s boljim, a u drugima s lošijim kliničkim ishodom (32). Kemi i sur. nisu multivarijatnom analizom uspjeli potvrditi neovisnu povezanost prisutnosti i gustoće TLS-ova s ukupnim preživljenjem (68). Navedeni dokazi upućuju da prisutnost TLS-ova nije dovoljna za procjenu njihova biološkog značaja i naglašavaju važnost analize kvalitativnih obilježja TLS-ova. U tom kontekstu posebno je važan stupanj sazrijevanja TLS-ova. Posch i sur. pokazali su da je visok udio zrelih TLS-ova bolji prognostički pokazatelj od ukupnog broja TLS-ova u nemetastatskom kolorektalnom karcinomu, što upućuje da funkcionalna svojstva TLS-ova ovise prvenstveno o njihovoj organizaciji i stupnju razvoja (85). U našem istraživanju su ispitanici čiji su tumori sadržavali

isključivo nezrele TLS-ove imali značajno kraće ukupno preživljenje nego ispitanici u kojih su u tumoru bili prisutni zreli TLS-ovi ili kombinacija zrelih i nezrelih oblika. Osim toga, limfovaskularna invazija i pozitivan nodalni status bili su značajno češći u tumorima s nezrelim TLS-ovima, što dodatno podupire povezanost nezrelih limfoidnih struktura s agresivnijim biološkim ponašanjem tumora. Biološka podloga tih razlika vjerojatno je u funkcionalnoj aktivnosti pojedinih razvojnih stadija TLS-ova. Nezreli TLS-ovi predstavljaju ranu fazu organizacije lokalnog imunološkog odgovora i nemaju razvijenu unutarnju arhitekturu potrebnu za učinkovitu aktivaciju adaptivne imunosti. Sadrže regulatorne T limfocite i M2 makrofage – stanice koje potiskuju citotoksični imunološki odgovor i pridonose stvaranju imunosupresivnog mikrokoliša (53). Nasuprot tome, zreli TLS-ovi karakterizirani su prisutnošću organiziranih B-staničnih folikula i germinativnih centara i predstavljaju funkcionalno aktivna mjesta lokalnog adaptivnog imunološkog odgovora. U njima se aktiviraju i diferenciraju B limfociti, stvaraju plazma stanice i razvija humoralna imunost koja vjerojatno sudjeluje u protutumorskom odgovoru (84,86,87). Pokazano je da plazma stanice diferencirane u TLS-ovima mogu migrirati u tumorsko tkivo i lučiti protutijela usmjerena protiv tumorskih antigena (88). Važnost zrelosti TLS-ova potvrđena je u meta-analizama tumora probavnog sustava koje pokazuju da su zreli TLS-ovi s razvijenim germinativnim centrima značajno povezani s dužim preživljenjem (52,89–91).

Osim stupnja sazrijevanja, važan čimbenik koji određuje funkcionalna svojstva TLS-ova je njihov stanični sastav. Posebnu pozornost posljednjih godina privlače regulatorni limfociti (Treg), definirani izražajem transkripcijskog čimbenika FOXP3 na T stanicama. U fiziološkim uvjetima Treg stanice imaju ključnu ulogu u održavanju imunološke tolerancije i sprječavanju razvoja autoimunih bolesti, a u tumorskom mikrokolišu potiskuju aktivaciju i citotoksičnu funkciju efektorskih T limfocita čime doprinose evaziji tumora i tako slabe protutumorski imunološki odgovor (47,62). U našem su istraživanju ispitanici čiji su TLS-ovi sadržavali FOXP3⁺ regulatorne limfocite imali značajno kraće ukupno preživljenje u odnosu na ispitanike bez FOXP3⁺ stanica u TLS-ovima. Naši rezultati u skladu su s ranijim istraživanjima koja su pokazala povezanost povećane infiltracije FOXP3⁺ stanica s nepovoljnijim kliničkim ishodom u adenokarcinomu želuca. Hennequin i sur. pokazali su da je izražena infiltracija FOXP3⁺ limfocita u tumorskoj stromi lokaliziranog adenokarcinoma želuca povezana s kraćim preživljenjem bez povrata bolesti, dok su slični rezultati opisani istraživanjima koja su analizirala ukupnu intratumorsku gustoću FOXP3⁺ stanica (92). Zanimljivo je da su u našem istraživanju zreli TLS-ovi, koji su bili povezani s povoljnijim

kliničko-patološkim obilježjima i duljim preživljenjem, istodobno sadržavali veću gustoću FOXP3⁺ limfocita. Nalaz se čini proturječnim, ali je sve više dokaza da je uloga Treg stanica unutar TLS-ova složenija nego u ostatku tumorskog mikrookoliša. Osim imunoregulacijske funkcije, smatra se da mogu sudjelovati u organizaciji i održavanju strukture TLS-ova te regulaciji lokalnog imunološkog odgovora. Prisutnost FOXP3⁺ stanica vjerojatno nije dovoljna za procjenu funkcionalnog stanja TLS-a, već je treba promatrati u kontekstu njihove organizacije, stupnja sazrijevanja i odnosa prema drugim populacijama imunoloških stanica. Tome u prilog govori činjenica da se gustoća CD8⁺ citotoksičnih T limfocita u našem istraživanju nije značajno razlikovala između zrelih i nezrelih TLS-ova. S druge strane, omjer CD8/FOXP3 bio je značajno viši u nezrelim TLS-ovima, što je prvenstveno posljedica veće gustoće FOXP3⁺ limfocita u zrelih TLS-ovima. Iako se viši omjer CD8/FOXP3 smatra pokazateljem prevage efektorskog odgovora nad regulatornim imunološkim odgovorom i često povezuje s povoljnijom prognozom, naši rezultati pokazuju da taj odnos nije nužno primjenjiv na TLS-ove. Unatoč nižem omjeru CD8/FOXP3, zreli TLS-ovi bili su povezani s povoljnijim kliničko-patološkim obilježjima i duljim preživljenjem bolesnika. Hennequin i sur. su također istaknuli važnost koordiniranog djelovanja različitih sastavnica adaptivnog imunološkog odgovora, osobito pomoćničkih Th1 limfocita i B stanica (92). Njihovi rezultati upućuju da učinkoviti protutumorski odgovor proizlazi iz složenih međustaničnih interakcija unutar tumorskog mikrookoliša, a ne iz izoliranog djelovanja pojedine populacije imunoloških stanica. Zajedno s našim rezultatima, navedeni nalazi podupiru koncept prema kojem je za razumijevanje biološke uloge TLS-ova potrebno analizirati ne samo njihovu prisutnost i stupanj sazrijevanja, nego i stanični sastav. Takav integrirani pristup može pružiti potpuniji uvid u složene mehanizme lokalnog protutumorskog imunološkog odgovora u karcinomu želuca.

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u gustoći FOXP3⁺ regulatornih limfocita između metastatskih i nemetastatskih limfnih čvorova istog bolesnika. Čak nasuprot, nemetastatski limfni čvorovi bolesnika s pN1 i višim N statusom sadržavali su gotovo dvostruko više FOXP3⁺ regulatornih T limfocita u odnosu na ne-metastatske limfne čvorove ispitanika bez limfogenih metastaza (pN0). Multivarijatna logistička regresijska analiza pokazala je da je broj FOXP3⁺ regulatornih T limfocita u histološki nezahvaćenom limfnom čvoru neovisni prediktor prisutnosti limfogenih metastaza, neovisno o dobi ispitanika, limfovaskularnoj invaziji i patološkom stadiju bolesti. Ovi rezultati sugeriraju nam da

povećana infiltracija FOXP3⁺ regulatornim limfocitima nije obilježje isključivo metastatski zahvaćenog limfnog čvora već je povezana s procesom limfogenog širenja bolesti.

Dosadašnja istraživanja regulatornih T limfocita u regionalnim limfnim čvorovima su malobrojna, a većina usmjerena na usporedbu metastatskih i nemetastatskih limfnih čvorova ili analizu tzv. *sentinel* limfnog čvora. Lee i sur. pokazali su da je povećana gustoća FOXP3⁺ regulatornih T limfocita u *sentinel* limfnom čvoru povezana s prisutnošću metastaza u ostalim regionalnim limfnim čvorovima ispitanika s adenokarcinomom želuca. Autori su zaključili da imunološke promjene u regionalnim limfnim čvorovima prethode ili prate limfogeno širenje tumora te da povećana infiltracija regulatornim T limfocitima može predstavljati rani pokazatelj razvoja limfnih metastaza (70). Naši rezultati nadopunjuju njihova opažanja jer pokazuju da se razlike u gustoći FOXP3⁺ stanica mogu uočiti već među histološki nezahvaćenim limfnim čvorovima ispitanika sa ili bez limfogenih metastaza.

Slična opažanja opisana su i u melanomu, gdje je povećana FOXP3 imunoreaktivnost u histološki negativnim *sentinel* limfnim čvorovima bila povezana s nepovoljnijim kliničkim ishodom, što podupire pretpostavku da se imunosupresivne promjene mogu razviti prije morfološki dokazive metastatske kolonizacije limfnog čvora (93).

S druge strane, Jiang i sur. su u ispitanika s adenokarcinomom gušterače utvrdili veću gustoću FOXP3⁺ regulatornih T limfocita u metastatskim nego u nemetastatskim limfnim čvorovima te su pokazali da je povećana infiltracija ovim stanicama povezana s limfogenim širenjem bolesti i nepovoljnijom prognozom (71). Takvu razliku u našem istraživanju nismo utvrdili, što može odražavati razlike u biologiji tumora, metodologiji istraživanja ili dinamici imunoloških promjena tijekom limfogenog širenja bolesti. Također, nije isključeno da broj regulatornih T limfocita nije određen isključivo lokalnom prisutnošću metastatskog tumorskog tkiva, već odražava imunološke promjene čitavog regionalnog limfnog sustava bolesnika s limfogenim metastazama.

Takvo tumačenje u skladu je s konceptom premetastatske niše (engl. *pre-metastatic niche*), prema kojem primarni tumor prije dolaska tumorskih stanica može putem citokina, kemokina, ekstracelularnih vezikula i drugih signalnih molekula inducirati remodeliranje regionalnih limfnih čvorova i tako stvoriti mikrookruženje pogodno za kasniju kolonizaciju tumorskim stanicama. Eksperimentalna istraživanja pokazala su da takvo remodeliranje uključuje limfangiogenezu, promjene stromalnih stanica te regrutaciju i nakupljanje različitih

imunosupresivnih populacija u drenažne limfne čvorove. Hirakawa i sur. su među prvima pokazali da primarni tumor može inducirati limfangiogenezu i funkcionalne promjene u regionalnim limfnim čvorovima prije pojave metastaza (94). Sleeman je dodatno razradio koncept limfnog čvora kao premetastatske niše, naglašavajući da se prije dolaska tumorskih stanica odvija opsežno strukturno i funkcionalno remodeliranje limfnog čvora (95). U novijem pregledu Gillot i sur. opisuju kako takvo remodeliranje uključuje i stvaranje imunosupresivnog mikrookruženja obilježenog nakupljanjem regulatornih T limfocita, mijeloidnih supresorskih stanica te promjenama u funkciji dendritičkih stanica i makrofaga (96).

Navedene spoznaje o premetastatskoj niši pružaju okvir za tumačenje rezultata našeg istraživanja. Posebno je zanimljivo da povećana infiltracija FOXP3⁺ regulatornih limfocita nije bila povezana s metastatskom zahvaćenošću pojedinog limfnog čvora, nego s prisutnošću limfogenih metastaza. Takav nalaz upućuje da povećana infiltracija regulatornim T limfocitima nije isključivo lokalna posljedica prisutnosti metastaze, već odražava šire imunološke promjene regionalnih limfnih čvorova povezane s limfogenim širenjem bolesti. U tom kontekstu naši rezultati pružaju dodatnu kliničku potporu konceptu premetastatske niše. Iako ne omogućuju zaključivanje o vremenskom slijedu tih promjena, u skladu su s pretpostavkom da se imunološko remodeliranje regionalnih limfnih čvorova odvija prije ili usporedno s nastankom limfnih metastaza.

Unatoč ograničenjima koja uključuju relativno mali uzorak i homogenu populaciju ispitanika, ovo istraživanje pridonosi boljem razumijevanju uloge tercijarnih limfoidnih struktura i imunološkog mikrookruženja regionalnih limfnih čvorova u adenokarcinomu želuca. Dobiveni rezultati upućuju da procjena zrelosti i staničnog sastava tercijarnih limfoidnih struktura te infiltracije FOXP3⁺ regulatornim limfocitima u regionalnim limfnim čvorovima može imati prognostičku vrijednost i pomoći u boljem razumijevanju mehanizama limfogenog širenja bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. Prisutnost intratumorskih tercijarnih limfoidnih struktura je statistički značajno povezana s duljim ukupnim preživljenjem ispitanika s adenokarcinomom želuca ($p = 0,006$).
2. Zreli TLS-ovi su brojniji ($p = 0,001$) i veći ($p = 0,016$) od nezrelih i statistički značajno povezani s duljim ukupnim preživljenjem ispitanika s adenokarcinomom želuca ($p = 0,033$).
3. Nezreli TLS-ovi su statistički značajno povezani s limfovaskularnom invazijom ($p = 0,014$) i metastazama u regionalne limfne čvorove ($p = 0,034$) ispitanika s adenokarcinomom želuca.
4. Zreli TLS-ovi sadržavaju veću gustoću FOXP3⁺ regulatornih limfocita ($p = 0,029$) i niži omjer CD8⁺/FOXP3⁺ limfocita ($p = 0,013$) u odnosu na nezrele TLS-ove, dok se gustoća CD8⁺ T limfocita među njima ne razlikuje ($p = 0,795$).
5. Prisutnost FOXP3⁺ regulatornih limfocita unutar TLS-ova je statistički značajno povezana s kraćim ukupnim preživljenjem ispitanika ($p < 0,001$).
6. Povećana gustoća FOXP3⁺ regulatornih limfocita u ne-metastatskim drenažnim limfnim čvorovima značajno je i neovisno povezana s pozitivnom N kategorijom adenokarcinoma želuca ($p < 0,0001$).

7. SAŽETAK

Globalno je adenokarcinom želuca jedan od vodećih uzroka smrti od zloćudnih bolesti. Tercijarne limfoidne strukture (TLS) su organizirana žarišta lokalnog adaptivnog imunološkog odgovora čije prognostičko značenje, kao i uloga FOXP3⁺ regulacijskih limfocita u njima nisu u potpunosti razjašnjeni.

Cilj istraživanja je ispitati povezanost morfologije intratumorskih tercijarnih limfoidnih struktura (TLS), gustoće CD8⁺ T limfocita i FOXP3⁺ regulatornih T limfocita u TLS-ovima te gustoće FOXP3⁺ stanica u drenažnim limfnim čvorovima s kliničkopatološkim obilježjima i ukupnim preživljenjem ispitanika s adenokarcinomom želuca.

U uzorku su 92 ispitanika operirana zbog adenokarcinoma želuca u KBC Split od 2015.-2019. godine. Demografski podaci i parafinski blokovi tumorskog tkiva i drenažnih limfnih čvorova prikupljeni su iz arhive Zavoda za patologiju, a podaci o preživljenju iz bolničkog mrtvozorstva. Izrezani su preparati debljine 3 µm i obojeni HE te strojno imunohistokemijski uporabom protutijela na CD8 i FOXP3. U histološkim prepratima analizirana je brojnost, površina i zrelost TLS-ova, a u imunohistokemijski obojenim preparatima brojnost CD8⁺ T limfocita i FOXP3⁺ regulacijskih stanica.

Intratumorski TLS-ovi su bili prisutni u 71,7 % slučajeva i značajno su povezani s duljim ukupnim preživljenjem ($p = 0,006$). Zreli TLS-ovi su brojniji i veći od nezrelih ($p = 0,001$ odnosno $p = 0,016$) i povezani s duljim preživljenjem ($p = 0,033$). Nezreli TLS-ovi su povezani s limfovaskularnom invazijom i metastazama u regionalne limfne čvorove ($p = 0,014$ odnosno $p = 0,034$). Zreli TLS-ovi imaju veću gustoću FOXP3⁺ regulatornih limfocita i manji omjer CD8⁺/FOXP3⁺ ($p = 0,029$ odnosno $p = 0,013$), dok gustoća CD8⁺ T limfocita nije povezana sa zrelošću TLS-a ($p = 0,795$). Prisutnost FOXP3⁺ regulatornih limfocita unutar TLS-ova povezana je s kraćim ukupnim preživljenjem ($p < 0,001$). Veća gustoća FOXP3⁺ stanica u nemetastatskim drenažnim limfnim čvorovima je neovisni prediktor pozitivnog nodalnog statusa ($p < 0,0001$).

Prisutnost i zrelost intratumorskih TLS-ova su povoljni prognostički pokazatelji u adenokarcinomu želuca. Povećana zastupljenost FOXP3⁺ regulatornih limfocita u TLS-ovima i regionalnim limfnim čvorovima odražava imunosupresivni mikrookoliš povezan s nepovoljnijim tijekom bolesti.

8. SUMMARY

TITLE: The role of tertiary lymphoid structures in gastric adenocarcinoma

Globally, gastric adenocarcinoma is one of the leading causes of cancer-related mortality. Tertiary lymphoid structures (TLS) are organized hubs of local adaptive immune response whose prognostic significance, as well as the role of FOXP3⁺ regulatory lymphocytes within them, are not yet fully understood. The aim of this study is to analyze the morphology of intratumoral TLSs and the density of CD8⁺ T-cells and FOXP3⁺ regulatory lymphocytes within them, as well as FOXP3⁺ cells in draining lymph nodes, and to compare these findings with clinicopathological characteristics and overall survival of patients with gastric adenocarcinoma. The study sample included 92 patients who underwent surgery for gastric adenocarcinoma at the University Hospital Split between 2015. and 2019. Demographic data and paraffin blocks of tumor tissue and draining lymph nodes were retrieved from the archive of the Department of Pathology, while survival data were obtained from the hospital mortuary records. Tissue sections of 3 μ m thickness were cut, stained with H&E, and automated immunohistochemical staining was performed using CD8 and FOXP3 antibodies. The abundance, area, and maturity of TLSs were analyzed in histological sections, while the density of CD8⁺ T-lymphocytes and FOXP3⁺ regulatory cells was assessed in immunohistochemically stained sections. Intratumoral TLSs were present in 71.7% of cases. The presence of intratumoral TLSs was associated with longer overall survival ($p = 0.006$). Mature TLSs were more numerous and larger than immature ones ($p = 0.001$ and $p = 0.016$, respectively) and were associated with longer survival ($p = 0.033$). Immature TLSs were associated with lymphovascular invasion and regional lymph node metastases ($p = 0.014$ and $p = 0.034$, respectively). Mature TLSs exhibited a higher density of FOXP3⁺ regulatory lymphocytes and a lower CD8⁺/FOXP3⁺ ratio ($p = 0.029$ and $p = 0.013$, respectively), whereas CD8⁺ lymphocyte density was not associated with TLS maturity ($p = 0.795$). The presence of FOXP3⁺ regulatory lymphocytes within TLSs was associated with shorter overall survival ($p < 0.001$). Higher density of FOXP3⁺ cells in non-metastatic draining lymph nodes was an independent predictor of positive nodal status ($p < 0.0001$). The presence and maturity of intratumoral TLSs are favorable prognostic indicators in gastric adenocarcinoma. Conversely, the increased presence of FOXP3⁺ regulatory lymphocytes in TLSs and regional lymph nodes reflects an immunosuppressive microenvironment associated with a less favorable disease course.

9. LAIČKI SAŽETAK

Rak želuca jedan je od vodećih uzroka smrti od zloćudnih bolesti u svijetu. Unatoč napretku u dijagnostici i liječenju, prognoza mnogih bolesnika i dalje je nepovoljna, zbog čega postoji potreba za pronalaženjem novih pokazatelja koji bi mogli pomoći u procjeni tijeka bolesti i odabiru liječenja.

Ovo istraživanje ispitalo je ulogu posebnih nakupina imunoloških stanica unutar tumora, nazvanih tercijarne limfoidne strukture, te pojedinih stanica imunološkog sustava u njima i u limfnim čvorovima koji odvedu limfu iz područja tumora.

Analizirani su uzorci tumorskog tkiva i limfnih čvorova 92 ispitanika operiranih zbog adenokarcinoma želuca u Kliničkom bolničkom centru Split.

Rezultati su pokazali da su ispitanici čiji su tumori sadržavali tercijarne limfoidne strukture živjeli dulje od ispitanika kod kojih one nisu bile prisutne. Također, bolje organizirane tercijarne limfoidne strukture bile su povezane s povoljnijim tijekom bolesti, dok su slabije razvijene bile povezane sa znakovima agresivnijeg širenja tumora. S druge strane, povećan broj FOXP3⁺ regulatornih imunoloških stanica koje smanjuju imunološki odgovor bio je povezan s kraćim preživljenjem te s većom vjerojatnošću širenja tumora u limfne čvorove.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da tercijarne limfoidne strukture i sastav imunoloških stanica unutar njih predstavljaju važne pokazatelje tijeka bolesti kod bolesnika s rakom želuca. Bolje razumijevanje njihove uloge moglo bi u budućnosti pridonijeti preciznijoj procjeni prognoze i razvoju novih pristupa liječenju.

10. LAY SUMMARY

Stomach cancer is one of the leading causes of cancer-related deaths worldwide. Despite advances in diagnosis and treatment, the prognosis for many patients remains poor. Therefore, there is a crucial need to find new indicators that could help predict the course of the disease and guide treatment decisions.

This study investigated the role of specific clusters of immune cells within the tumor, known as tertiary lymphoid structures, as well as individual immune cells within these structures and in the lymph nodes draining the tumor area.

Tissue samples from tumors and lymph nodes were analyzed from 92 patients who underwent surgery for gastric adenocarcinoma at the University Hospital Split.

The results showed that patients whose tumors contained tertiary lymphoid structures lived longer than those without them. Furthermore, well-organized tertiary lymphoid structures were associated with a more favorable disease course, whereas poorly developed structures were linked to signs of more aggressive tumor spread. Conversely, an increased number of FOXP3⁺ regulatory immune cells, which suppress the body's immune response, was associated with shorter survival and a higher likelihood of tumor spread to the lymph nodes.

The findings of this study suggest that tertiary lymphoid structures and the composition of immune cells within them serve as important indicators of disease progression in stomach cancer patients. A better understanding of their role could contribute to more accurate prognostic assessments and the development of new treatment approaches in the future.

11. REFERENCE

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229–63.
2. Patel AK, Sethi NS, Park H. Gastric Cancer: A Review. *JAMA*. 2026;335(5):439–50.
3. Thrift AP, Wenker TN, El-Serag HB. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(5):338–49.
4. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, van Grieken NC, Lordick F. Gastric cancer. *Lancet Lond Engl*. 2020;396(10251):635–48.
5. Wang X, Gao X, Yu J, Zhang X, Nie Y. Emerging trends in early-onset gastric cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2024;137(18):2146–56.
6. Li Y, Hahn AI, Laszkowska M, Jiang F, Zauberg AG, Leung WK. Global burden of young-onset gastric cancer: a systematic trend analysis of the global burden of disease study 2019. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc*. 2024;27(4):684–700.
7. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive System tumours. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019.
8. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2014;23(5):700–13.
9. OECD; European Commission. EU Country Cancer Profile: Croatia 2025 [Internet]. Paris: OECD Publishing; 2025 [cited 2026 Jul 18]. (EU Country Cancer Profiles). Available from: <https://doi.org/10.1787/46c5e70c-en>
10. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2020. Bilten br. 45. Registar za rak Republike Hrvatske [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2022 [cited 2026 Jul 18]. Report no.: 45. Available from: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2022/11/Bilten-Incidencija-raka-u-Hrvatskoj-2020.-godine.pdf>
11. Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2017;3:17036.
12. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*. 1992;52(24):6735–40.
13. Machlowska J, Baj J, Sitarz M, Maciejewski R, Sitarz R. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11).
14. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022;71(9):1724–62.

15. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017;153(2):420–9.
16. Wroblewski LE, Peek RMJ, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(4):713–39.
17. Polk DB, Peek RMJ. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):403–14.
18. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182–8.
19. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202–9.
20. Clinton SK, Giovannucci EL, Hursting SD. The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *J Nutr*. 2020;150(4):663–71.
21. Blair VR, McLeod M, Carneiro F, Coit DG, D’Addario JL, van Dieren JM, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines. *Lancet Oncol*. 2020;21(8):e386–97.
22. Dinis-Ribeiro M, Libânio D, Uchima H, Spaander MCW, Bornschein J, Matysiak-Budnik T, et al. Management of epithelial precancerous conditions and early neoplasia of the stomach (MAPS III): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European *Helicobacter* and Microbiota Study Group (EHMSG) and European Society of Pathology (ESP) Guideline update 2025. *Endoscopy*. 2025;57(5):504–54.
23. Kusano C, Ishibashi F, Ichita C, Gotoda T. Current Status of Gastric Cancer Screening and Future Perspectives. *DEN Open*. 2026;6(1):e70148.
24. Eom SS, Ryu KW, Han HS, Kong SH. A Comprehensive and Comparative Review of Global Gastric Cancer Treatment Guidelines: 2024 Update. *J Gastric Cancer*. 2025;25(1):153–76.
25. McCracken KW, Wells JM. Mechanisms of embryonic stomach development. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;66:36–42.
26. Rosa F, Costamagna G, Doglietto GB, Alfieri S. Classification of nodal stations in gastric cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2017;2:2.
27. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc*. 2011;14(2):101–12.
28. López Sala P, Leturia Etxeberria M, Inchausti Iguíñiz E, Astiazaran Rodríguez A, Aguirre Oteiza MI, Zubizarreta Etxaniz M. Gastric adenocarcinoma: A review of the TNM classification system and ways of spreading. *Radiologia*. 2023;65(1):66–80.

29. Lordick F, Carneiro F, Cascinu S, Fleitas T, Haustermans K, Piessen G, et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2022;33(10):1005–20.
30. Ajani JA, D'Amico TA, Bentrem DJ, Corvera CU, Das P, Enzinger PC, et al. Gastric Cancer, Version 2.2025, NCCN Clinical Practice Guidelines In Oncology. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 2025;23(5):169–91.
31. LAUREN P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31–49.
32. Zhao L, Jin S, Wang S, Zhang Z, Wang X, Chen Z, et al. Tertiary lymphoid structures in diseases: immune mechanisms and therapeutic advances. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):225.
33. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93–9.
34. Smyth EC, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(suppl 5):v38–49.
35. Clinical recommendations for diagnosis, treatment and monitoring of patients with gastric cancer. *Liječnički Vjesn*. 2018;140(11–12):285–92.
36. Teillaud JL, Houel A, Panouillot M, Riffard C, Dieu-Nosjean MC. Tertiary lymphoid structures in anticancer immunity. *Nat Rev Cancer*. 2024;24(9):629–46.
37. Sano T, Coit DG, Kim HH, Roviello F, Kassab P, Wittekind C, et al. Proposal of a new stage grouping of gastric cancer for TNM classification: International Gastric Cancer Association staging project. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc*. 2017;20(2):217–25.
38. Alangari AI, Kim S, Lee HH, Song KY, Seo H. Prognostic impact of lymphovascular invasion in node-negative gastric cancer: a retrospective cohort study. *World J Surg Oncol*. 2024;22(1):340.
39. Zhang F, Chen H, Luo D, Xiong Z, Li X, Yin S, et al. Lymphovascular or perineural invasion is associated with lymph node metastasis and survival outcomes in patients with gastric cancer. *Cancer Med*. 2023;12(8):9401–8.
40. Deng J, You Q, Gao Y, Yu Q, Zhao P, Zheng Y, et al. Prognostic value of perineural invasion in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2014;9(2):e88907.
41. Xue C, Du Y, Li Y, Xu H, Zhu Z. Tumor budding as a predictor for prognosis and therapeutic response in gastric cancer: A mini review. *Front Oncol*. 2022;12:1003959.
42. Cozac-Szóke AR, Cozac DA, Negovan A, Tinca AC, Vilaia A, Cocuz IG, et al. Immune Cell Interactions and Immune Checkpoints in the Tumor Microenvironment of Gastric Cancer. *Int J Mol Sci*. 2025;26(3).

43. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*. 2023;41(3):374–403.
44. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
45. Proper DJ, Balkwill FR. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(4):237–53.
46. Pernot S, Terme M, Radosevic-Robin N, Castan F, Badoual C, Marcheteau E, et al. Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc*. 2020;23(1):73–81.
47. Xie Y, Peng H, Hu Y, Jia K, Yuan J, Liu D, et al. Immune microenvironment spatial landscapes of tertiary lymphoid structures in gastric cancer. *BMC Med*. 2025;23(1):59.
48. Schumacher TN, Thommen DS. Tertiary lymphoid structures in cancer. *Science*. 2022;375(6576):eabf9419.
49. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(7):447–62.
50. Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(6):307–25.
51. Zhang N, Zhang G, Wang D, Liu H, Zhang Y, Ayarick VA, et al. The relationship of the tertiary lymphoid structures with the tumor-infiltrating lymphocytes and its prognostic value in gastric cancer. *Arch Med Sci AMS*. 2024;20(1):255–66.
52. Yu A, Cao M, Zhang K, Yang Y, Ma L, Zhang X, et al. The prognostic value of the tertiary lymphoid structure in gastrointestinal cancers. *Front Immunol*. 2023;14:1256355.
53. Chen Y, Wu Y, Yan G, Zhang G. Tertiary lymphoid structures in cancer: maturation and induction. *Front Immunol*. 2024;15:1369626.
54. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:541–66.
55. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*. 2017;27(1):109–18.
56. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20–1.
57. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001;27(1):68–73.

58. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1995;155(3):1151–64.
59. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057–61.
60. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EIH, Huizinga TWJ, Toes REM. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):129–38.
61. Shang B, Liu Y, Jiang S, Juan, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:15179.
62. Perrone G, Ruffini PA, Catalano V, Spino C, Santini D, Muretto P, et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2008;44(13):1875–82.
63. Zhou S, Shen Z, Wang Y, Ma H, Xu S, Qin J, et al. CCR7 expression and intratumoral FOXP3+ regulatory T cells are correlated with overall survival and lymph node metastasis in gastric cancer. *PloS One*. 2013;8(9):e74430.
64. Rossi A, Belmonte B, Carnevale S, Liotti A, De Rosa V, Jaillon S, et al. Stromal and Immune Cell Dynamics in Tumor Associated Tertiary Lymphoid Structures and Anti-Tumor Immune Responses. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:933113.
65. Devi-Marulkar P, Fastenackels S, Karapentiantz P, Goc J, Germain C, Kaplon H, et al. Regulatory T cells infiltrate the tumor-induced tertiary lymphoid structures and are associated with poor clinical outcome in NSCLC. *Commun Biol*. 2022;5(1):1416.
66. Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*. 2011;17(8):983–8.
67. Munoz-Erazo L, Rhodes JL, Marion VC, Kemp RA. Tertiary lymphoid structures in cancer - considerations for patient prognosis. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(6):570–5.
68. Kemi N, Ylitalo O, Väyrynen JP, Helminen O, Junttila A, Mrena J, et al. Tertiary lymphoid structures and gastric cancer prognosis. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2023;131(1):19–25.
69. Sun H, Liu Y, Cheng W, Xiong R, Gu W, Zhang X, et al. The distribution and maturation of tertiary lymphoid structures can predict clinical outcomes of patients with gastric adenocarcinoma. *Front Immunol*. 2024;15:1396808.
70. Lee HE, Park DJ, Kim WH, Kim HH, Lee HS. High FOXP3+ regulatory T-cell density in the sentinel lymph node is associated with downstream non-sentinel lymph-node metastasis in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2011;105(3):413–9.
71. Jiang Y, Du Z, Yang F, Di Y, Li J, Zhou Z, et al. FOXP3+ lymphocyte density in pancreatic cancer correlates with lymph node metastasis. *PloS One*. 2014;9(9):e106741.

72. Groen-van Schooten TS, Franco Fernandez R, van Grieken NCT, Bos EN, Seidel J, Saris J, et al. Mapping the complexity and diversity of tertiary lymphoid structures in primary and peritoneal metastatic gastric cancer. *J Immunother Cancer*. 2024;12(7).
73. Barone F, Gardner DH, Nayar S, Steinthal N, Buckley CD, Luther SA. Stromal Fibroblasts in Tertiary Lymphoid Structures: A Novel Target in Chronic Inflammation. *Front Immunol*. 2016;7:477.
74. Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):205–17.
75. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol*. 2006;7(4):344–53.
76. Sautès-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, et al. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Front Immunol*. 2016;7:407.
77. Colbeck EJ, Ager A, Gallimore A, Jones GW. Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: Drivers of Antitumor Immunity, Immunosuppression, or Bystander Sentinels in Disease? *Front Immunol*. 2017;8:1830.
78. Grasso C, Pierie C, Mebius RE, van Baarsen LGM. Lymph node stromal cells: subsets and functions in health and disease. *Trends Immunol*. 2021;42(10):920–36.
79. Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K. Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):350–61.
80. Moussion C, Girard JP. Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature*. 2011;479(7374):542–6.
81. Peng H, Wu X, Zhang C, Liang Y, Cheng S, Zhang H, et al. Analyzing the associations between tertiary lymphoid structures and postoperative prognosis, along with immunotherapy response in gastric cancer: findings from pooled cohort studies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2024;150(3):153.
82. Dieu-Nosjean MC, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol*. 2014;35(11):571–80.
83. Jiang S, Liao X, Ding X. Maturity and density of tertiary lymphoid structures associate with tumor metastasis and chemotherapy response. *Front Med*. 2024;11:1435620.
84. Sautès-Fridman C, Verneau J, Sun CM, Moreira M, Chen TWW, Meylan M, et al. Tertiary Lymphoid Structures and B cells: Clinical impact and therapeutic modulation in cancer. *Semin Immunol*. 2020;48:101406.
85. Posch F, Silina K, Leibl S, Mündlein A, Moch H, Siebenhüner A, et al. Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2018;7(2):e1378844.
86. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup Larsen M, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020;577(7791):561–5.

87. Li H, Zhang MJ, Zhang B, Lin WP, Li SJ, Xiong D, et al. Mature tertiary lymphoid structures evoke intra-tumoral T and B cell responses via progenitor exhausted CD4(+) T cells in head and neck cancer. *Nat Commun*. 2025;16(1):4228.
88. Meylan M, Petitprez F, Becht E, Bougoüin A, Pupier G, Calvez A, et al. Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer. *Immunity*. 2022;55(3):527-541.e5.
89. Sun H, Shi Y, Ran H, Peng J, Li Q, Zheng G, et al. Prognostic value of tertiary lymphoid structures (TLS) in digestive system cancers: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2023;23(1):1248.
90. Yu A, Fan Z, Ma L, Tang J, Liu W, Han Z, et al. The relationship between the tertiary lymphoid structure and immune-infiltrating cells in gastrointestinal cancers: A systematic review and meta-analysis. *Immun Inflamm Dis*. 2024;12(9):e70003.
91. Yin YX, Ling YH, Wei XL, He CY, Wang BZ, Hu CF, et al. Impact of mature tertiary lymphoid structures on prognosis and therapeutic response of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer patients. *Front Immunol*. 2022;13:973085.
92. Hennequin A, Derangère V, Boidot R, Apetoh L, Vincent J, Orry D, et al. Tumor infiltration by Tbet+ effector T cells and CD20+ B cells is associated with survival in gastric cancer patients. *Oncoimmunology*. 2016;5(2):e1054598.
93. Speeckaert R, Vermaelen K, van Geel N, Autier P, Lambert J, Haspeslagh M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2012;48(13):2004–11.
94. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*. 2005;201(7):1089–99.
95. Sleeman JP. The lymph node pre-metastatic niche. *J Mol Med Berl Ger*. 2015;93(11):1173–84.
96. Gillot L, Baudin L, Rouaud L, Kridelka F, Noël A. The pre-metastatic niche in lymph nodes: formation and characteristics. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2021;78(16):5987–6002.

12. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Ana Paparella Karaman

Datum rođenja: 20. srpnja 1991.

E-pošta: anapaparella@hotmail.com

OBRAZOVANJE

2017. – danas	Poslijediplomski doktorski studij „Klinička medicina utemeljena na dokazima“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
2010. – 2016.	Studij medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
2006. – 2010.	III. gimnazija, Split
1998. – 2006.	Osnovna škola Lučac, Split

RADNO ISKUSTVO

01.08.2022. – danas	Specijalizantica patologije i citologije, Klinički bolnički centar Split
2019. – 31.07.2022.	Specijalizantica onkologije i radioterapije, Klinički bolnički centar Split
2016. – 2019.	Doktorica medicine u primarnoj zdravstvenoj zaštiti i hitnoj medicinskoj službi • Zavod za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije • Zavod za hitnu medicinu Dubrovačko-neretvanske županije • Dom zdravlja „Dr. Ante Franulović“ • Ordinacija obiteljske medicine dr. Lucijana Matijević • Ordinacija obiteljske medicine dr. Sonja Vojnović • Ordinacija obiteljske medicine dr. Besim Agoli

NASTAVNA I STRUČNA AKTIVNOST

2012. – 2014.	Demonstratorica na Katedri za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
2012. – 2014.	Demonstratorica na Katedri za neuroznanost, Medicinski fakultet

Sveučilišta u Splitu

2013. Jednomjesečna studentska razmjena (CroMSIC, IFMSA) – Oftalmologija, Semmelweis University, Department of Ophthalmology, Budimpešta, Mađarska
2014. Jednomjesečna studentska razmjena (CroMSIC, IFMSA) – Pedijatrija, Hôpital universitaire Robert-Debré, Pariz, Francuska
2015. Jednomjesečna studentska razmjena (CroMSIC, IFMSA) – Dermatovenerologija, Department of Dermatology and Allergology, CHRU Nancy – Hôpitaux de Brabois, Nancy, Francuska

ČLANSTVA

2017. – danas Hrvatska liječnička komora
2019. – danas Hrvatsko onkološko društvo
2022. – danas Hrvatski liječnički zbor
2022. – danas Hrvatsko društvo za patologiju i sudsku medicinu

VJEŠTINE

Rad na računalu: aktivno i svakodnevno korištenje paketa Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook, OneNote)

Strani jezici: Engleski (C1), Talijanski (B1), Francuski (B1)

Vozačka dozvola: B kategorija

PUBLIKACIJE

1. **Paparella Karaman A**, Ivanović T, Mustapić K, Minarik L, Vukojević K, Glavina Durdov M, Đolonga P. FOXP3⁺ Cells in Tertiary Lymphoid Structures Have Adverse Impact on Overall Survival in Patients with Gastric Cancer. Medical Sciences. 2026;14(1):145.
2. Mustapić K, Đolonga P, Ivanović T, **Paparella Karaman A**, Minarik L, Vukojević K, Glavina Durdov M. SARIFA Is Associated with Lymph Node Metastases in PT3 and PT4 Gastric Cancers. Cancers (Basel). 2025;17(21):3593.