

# Izraženost i prognostičko značenje PD-L1 i NY-ESO1 u karcinomima žučnog mjehura

---

Ibukić, Amir

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:586709>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Amir Ibukić**

**Izraženost i prognostičko  
značenje PD-L1 i NY-ESO1 u  
karcinomima žučnog mjehura**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2024.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Amir Ibukić**

**Izraženost i prognostičko  
značenje PD-L1 i NY-ESO1 u  
karcinomima žučnog mjehura**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2024.**

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ i Klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Mario Zovak

dr. sc. Alma Demirović, znanstveni suradnik

*Zahvaljujem svojim mentorima prof. dr. sc. Mariju Zovak i dr. sc. Almi Demirović  
na trudu, vremenu te stručnoj i znanstvenoj podršci.*

*Zahvaljujem dragim kolegama koji su pridonijeli istraživanju.*

*Hvala mojoj obitelji na strpljenju, motivaciji i podršci.  
Disertaciju posvećujem svojim roditeljima.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Karcinom žučnog mjehura .....	1
1.1.1. Epidemiologija i incidencija.....	1
1.1.2. Etiologija .....	2
1.1.3. Klinička slika.....	5
<i>1.1.3.1. Laboratorijske pretrage .....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.3.2. Slikovne metode dijagnostike.....</i>	<i>6</i>
1.1.4. Patohistologija karcinoma žučnog mjehura .....	7
<i>1.1.4.1. Benigni epitelni tumori i prekursori karcinoma žučnog mjehura .....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.4.2. Maligni tumori žučnog mjehura .....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.4.3. Određivanje stadija bolesti.....</i>	<i>10</i>
1.1.5. Klinički stadiji bolesti .....	13
1.1.6. Terapija karcinoma žučnog mjehura.....	14
<i>1.1.6.1. Kirurški zahvat .....</i>	<i>15</i>
<i>1.1.6.2. Radioterapija/zračenje.....</i>	<i>17</i>
<i>1.1.6.3. Kemoterapija .....</i>	<i>17</i>
1.2. Biomarkeri i ciljana terapija.....	21
1.2.1. Imunološki odgovor na tumore (PD1/PD-L1).....	21
<i>1.2.1.1. PD-1/PD-L1 mehanizam.....</i>	<i>24</i>

1.2.2. Antigeni karcinoma testisa .....	26
1.2.2.1. NY-ESO1 .....	27
1.2.2.2. Terapijske opcije usmjerene na NY-ESO1 .....	29
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>33</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>34</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>35</b>
4.1.    Bolesnici.....	35
4.2.    Metode .....	35
4.3.    Statistička analiza .....	36
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>38</b>
5.1.    Imunohistokemijska izraženost PD-L1 i NY-ESO1.....	42
5.1.1. PD-L1 i NY-ESO1 i kliničko-patološke karakteristike .....	45
5.2.    Doživljenje bolesnika .....	50
5.1.2. Doživljenje bolesnika ovisno o izraženosti PD-L1 i NY-ESO1 .....	56
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>62</b>
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>67</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>68</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>69</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>70</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>86</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>AJCC</b>	Američka združena komisija za rak (engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i> )
<b>BMI</b>	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i> )
<b>CA 19-9</b>	karbohidratni antigen 19-9, tumorski biljeg (engl. <i>carbohydrate antigen 19-9</i> )
<b>CAR</b>	kimerični antigenski receptor (engl. <i>chimeric antigen receptor</i> )
<b>CEA</b>	karcinoembrionalni antigen, tumorski biljeg (engl. <i>carcinoembryonic antigen</i> )
<b>CIN</b>	kromosomska nestabilnost (engl. <i>chromosomal instability</i> )
<b>CT</b>	kompjuterizirana tomografija (engl. <i>computerized tomography</i> )
<b>CTA</b>	antigeni raka testisa (engl. <i>cancer testis antigens</i> )
<b>DC</b>	dendritička stanica (engl. <i>dendritic cell</i> )
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina
<b>ECOG</b>	dogovoreni kriterij za procjenu općeg stanja onkološkog bolesnika (engl. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> )
<b>EGD</b>	ezofagogastroduodenoskopija; endoskopska metoda kojom se pregledavaju jednjak, želudac i dvanaesnik
<b>EMA</b>	Europska agencija za praćenje i kontrolu lijekova (engl. <i>European Medicines Agency</i> ) koja štiti i promiče zdravlje ljudi i životinja unutar Europske unije i Europskog gospodarskog prostora (EEA)
<b>ERCP</b>	endoskopska retrogradna kolangiopankreatografija
<b>ESMO</b>	Europsko društvo za medicinsku onkologiju koje utvrđuje preporuke u kliničkoj onkološkoj praksi (engl. <i>European Society for Medical Oncology</i> )
<b>EUS</b>	endoskopski ultrazvuk (engl. <i>endoscopic ultrasound</i> )
<b>FGFR 2</b>	receptor 2 za faktor rasta fibroblasta (engl. <i>fibroblast growth factor receptor 2</i> )
<b>FNA</b>	citološka aspiracija tankom iglom (engl. <i>fine-needle aspiration</i> )
<b>FNAC</b>	aspiracijska biopsija tankom iglom (engl. <i>fine-needle aspiration biopsy</i> )
<b>HE</b>	hematoksilin-eozin, standardno bojenje histološkog materijala u patologiji
<b>HR, RR</b>	mjera omjera izgleda i relativnog rizika korištena u statistici (engl. <i>hazard</i> )

*risk, relative risk)*

<b>HZJZ</b>	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
<b>IGFR-1</b>	receptor za inzulinu sličan faktor rasta 1 (engl. <i>insulin like growth factor receptor 1</i> )
<b>IHC</b>	metoda imunohistokemijskog bojenja (engl. <i>immunohistochemistry</i> ) za dokazivanje prisutnosti proteina od interesa u stanicama/tkivu
<b>ISH</b>	hibridizacija <i>in situ</i> (ISH/BRISH) metoda dokazivanja broja kopija gena ili genskih rearanžmana metodom hibridizacije direktno u ciljanom tkivu/stanici. Za vizualizaciju probe koriste se različiti markeri; srebro (SISH), kromogen (CISH), fluorescencijska proba (FISH)
<b>MMR</b>	mehanizam popravka nepodudarnosti/krivo sparenih baza koje mogu nastati tijekom replikacije DNA (engl. <i>mismatch repair</i> ). U mehanizam je uključeno više proteina MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2. Pogreške u MMR dovode do pojave genomske nestabilnosti i povećanja stope mutacija.
<b>MR</b>	magnetska rezonanca, metoda slikovne dijagnostike
<b>MRCP</b>	kolangiopankreatografija magnetskom rezonancom
<b>MSI</b>	mikrosatelitna nestabilnost (engl. <i>microsatellite instability</i> )
<b>NCCN</b>	neprofitno udruženje stručnjaka SAD-a koji utvrđuju preporuke u kliničkoj onkološkoj praksi (engl. <i>National Comprehensive Cancer Network</i> )
<b>NGS</b>	metoda sekvenciranja nove generacije koja u kratkom vremenu omogućava sekvenciranje (utvrđivanje slijeda baza u nukleinskim kiselinama) cijelog genoma ili velikog broja uzoraka istovremeno
<b>NHS</b>	Javni zdravstveni sustav u Ujedinjenom Kraljevstvu (engl. <i>National Health Service</i> )
<b>NY-ESO1</b>	(engl. <i>New York esophageal squamous cell cancer-1</i> ) pripada skupini CTA (engl. <i>cancer/testis antigen 1A; CTAG1A</i> )
<b>OS</b>	ukupno doživljenje (engl. <i>overall survival</i> )
<b>pCR</b>	kompletni patološki odgovor (engl. <i>pathologic complete response</i> )
<b>PCR</b>	metoda lančane reakcije polimeraze kojom možemo stvoriti veliki broj kopija kraćih odječaka DNA i analizirati prisutnost mutacija (engl. <i>polimeraza chain reaction</i> )
<b>PD-1/PD-L1</b>	receptor odgovoran za programiranu smrt stanice (PD-1) (kodiran genom



	PDCD1) na kojeg se veže ligand PD-L1 ili PD-L2
<b>PET/FDG</b>	pozitronska emisijska tomografija s fluorodeoksiglukozom
<b>PGA</b>	adenom piloričnih žlijezda žučnjaka (engl. <i>pyloric gland adenoma of gallbladder</i> )
<b>pN</b>	patološki N stadij zahvaćenosti limfnih čvorova
<b>PS</b>	opće stanje bolesnika (engl. <i>patients performance score</i> )
<b>pT</b>	patološki T stadij dubine prodora karcinoma
<b>PTC</b>	perkutana transhepatična kolangiografija
<b>RNA</b>	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
<b>r<sub>s</sub></b>	koeficijent korelacije
<b>SEER</b>	program Američkog nacionalnog instituta za rak (engl. <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i> )
<b>TMB</b>	opterećenje tumora mutacijama (engl. tumor mutation burden)
<b>TNM</b>	sistem stupnjevanja raka prema značajkama dubine prodora primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorskim stanicama (N) te prisutnosti udaljenih metastaza (M)
<b>UZV</b>	ultrazvuk
<b>vs.</b>	suprotno, u odnosu na, protiv (engl. <i>versus</i> )
<b>WHO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organization</i> )
<b>χ<sup>2</sup></b>	hi-kvadrat test

# 1. UVOD

## 1.1. Karcinom žučnog mjehura

### 1.1.1. Epidemiologija i incidencija

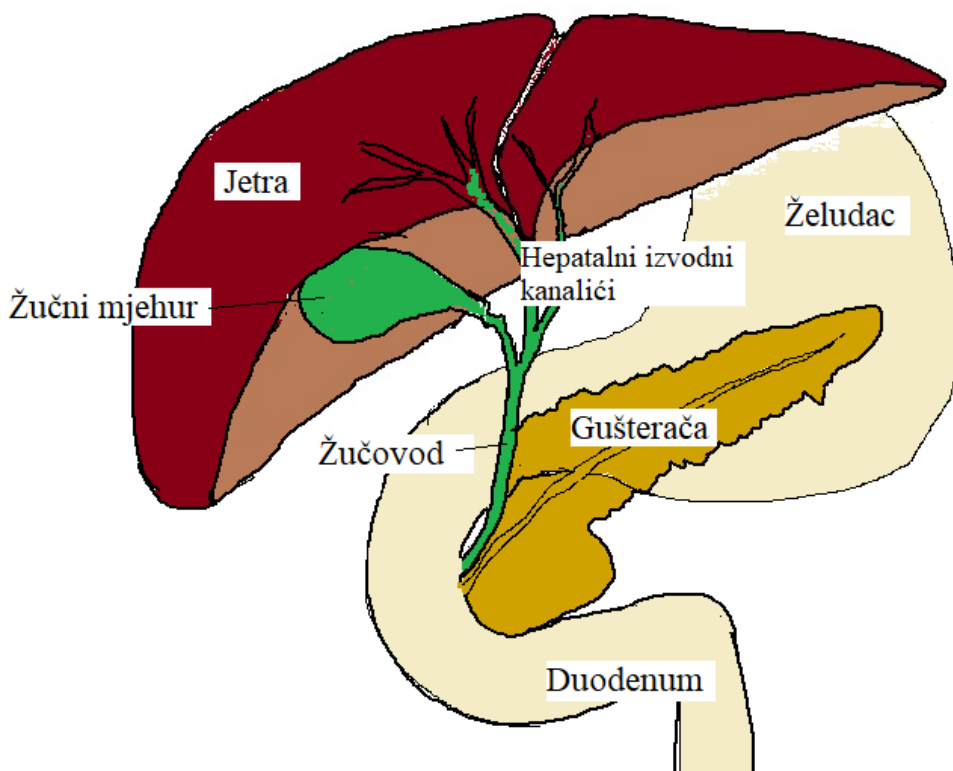
Karcinom žučnog mjehura ili žučnjaka (lat. *vesica fellea*) pripada skupini rijetkih primarnih malignih tumora (1). Smatra se najčešćim primarnim malignim tumorom bilijarnog trakta te šestim najčešćim gastroenterološkim karcinomom (1-4).

Prema učestalosti u općoj svjetskoj populaciji 2020. godine nalazio se na 25. mjestu s oko 0,6 % slučajeva svih novootkrivenih karcinoma dok je po udjelu od 0,9 % u broju svih novih smrtnih slučajeva uzrokovanih karcinomima bio na 22. mjestu. Stoga je, na svjetskoj razini, ukupno dijagnosticirano 115 695 novooboljelih od karcinoma žučnog mjehura, a umrlih je 84 695 (2-5). Obzirom na spol, na globalnoj razini u 2020. godini karcinom žučnjaka bio je 1,82 puta učestaliji kod osoba ženskog spola, a prema tome je i broj smrtnih ishoda kod ženskog spola bio 1,79 puta veći. U zemljama s visokim stopama učestalosti ove bolesti i omjeri učestalosti su izraženiji pa se penju do 2,4. Ponajviše se pojavljuje između 60. i 70. godine života u osoba ženskog spola, s medijanom dobi od 67 godina (6). Zemljopisna raspodjela pojavnosti (incidencija) karcinoma žučnog mjehura je izrazito neujednačena, s neuobičajeno visokim stopama učestalosti u regijama Latinske Amerike među domicilnim indijanskim stanovništvom, zatim u državama Indijskog potkontinenta, te istočnoj Europi, Japanu i Izraelu (6,7). Stope incidencije su niske u području zapadne Europe, te u sjevernoj Americi među potomcima europskih doseljenika.

Podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo pokazuju da je tijekom 2020. godine u Republici Hrvatskoj registrirano 120 novih slučajeva karcinoma žučnog mjehura. Oboljelo je 80 osoba ženskog spola i 40 osoba muškog spola. Omjer mortaliteta i incidencije je bio iznimno visok te je iznosio 0,86 za žene i 0,84 za muškarce. Stopa incidencije karcinoma žučnog mjehura na 100 000 stanovnika je iste godine iznosila ukupno 3,0 (2,0 za muškarce i 3,8 za žene) (8).

### 1.1.2. Etiologija

Čimbenici rizika povezani s nastankom karcinoma žučnjaka su: kolecistolitijaza (kamenci u žučnom mjehuru), porculanski žučnjak (znak kronične upale žučnog mjehura), polipi žučnjaka (benigni tumori sluznice; adenomi), specifična prehrana i pretilost, spol, infekcije te anomalije bilijarnog trakta (9,10). Slika 1 prikazuje anatomsku poziciju žučnog mjehura.



Slika 1. Shematski prikaz anatomske pozicije žučnog mjehura (autor A. Ibukić).

Žučni kamenci (konkrementi) su danas najistaknutiji čimbenik rizika nastanka neoplazme žučnog mjehura. U preko 80% bolesnika s karcinomom žučnjaka pronađeni su konkrementi žučnog mjehura (11,12). Istodobno studije provedenih obdukcija pokazale su rijetku pojavnost karcinoma žučnjaka od svega 0,5 % udjela u populaciji bolesnika s kamencima (13). Vjeruje se da veličina konkremenata iznad 3 cm kao i dugotrajnost neliječene kolecistolitijaze (duže od 20 godina) ima značajnu ulogu u karcinogenezi zbog opetovanih mikrotrauma i iritacije sluznice. Posljedično se javlja kronična upala koja uzrokuje metaplaziju, potom displaziju i u konačnici karcinom (14). Invazivni karcinom žučnjaka se u 80 % slučajeva pojavljuje u sluznici

uz displaziju, a istodobno je incidencija adenomatoznih lezija sluznice uz zonu karcinoma manja od 3 %. Adenomi žučnjaka identificiraju se također u svega 0,14 % kolecistektomija, što navodi na zaključak da su metaplazija i displazija, kao posljedica upale, glavni put nastanka karcinoma žučnjaka (15).

Potvrdu zaključka o mogućim različitim mehanizmima nastanka karcinoma žučnjaka pokazala su istraživanja molekularnih promjena uzrokovanih genskom alteracijom (15). Istraživanja ističu da je kod adenoma prisutna visoka učestalost mutacija u genu za  $\beta$ -katenin, dok je kod displazija i karcinoma u bolesnika s anomalijama bilijarnog trakta visoka pojavnost mutacija gena *KRAS* (16,17). U većini slučajeva invazivni karcinom žučnjaka se razvije u periodu od 5 do 15 godina od pojave metaplazije (18).

Kronična upala uzrokuje oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNA) u stanicama sluznice žučnog mjehura, pri čemu zbog pokušaja popravka dolazi do proliferacije stanica te posljedično otpuštanja citokina i čimbenika rasta, čime se stvaraju preduvjeti za onkogenu transformaciju stanica (19). Također, posljedica ovog procesa može biti difuzno odlaganje depozita kalcija u stijenkama žučnjaka što rezultira nastankom tzv. „porculanskog žučnjaka“ (20). Utvrđeno je da je incidencija karcinoma povezana sa specifičnim uzorkom kalcifikacije stijenke žučnjaka. Selektivna mukozna kalcifikacija je rizičnija za nastanak karcinoma od difuzne intramuralne kalcifikacije (21). Starije studije su povezivale ovo stanje s izrazito visokim malignitetom, međutim prema novijim studijama rizik nastanka neoplazije kod ovog stanja je tek 2 - 6 % (22,23).

Polipi žučnjaka su protruzije sluznice u lumen žučnjaka (24). Pojavljuju se kod 5 % globalne populacije, međutim, većina ovih lezija su pseudopolipi. Svega 5 % polipa žučnjaka su tzv. „pravi“ polipi (adenomi) s rizikom maligne alteracije (25). Ovaj rizik raste s veličinom polipa pa je danas arbitrarna granica za preporučenu kolecistektomiju ultrazvučno dijagnosticirani polip promjera 10 mm (26). Do danas niti jedna objavljena studija nije prikazala malignitet kod polipa manjih od 4,15 mm, ali je registriran značajan udio maligniteta polipa koji su dimenzijama bili ispod 10 mm u promjeru (27,28). Morfološki gledano, sesilne polipoidne tvorbe pokazuju veći maligni potencijal od pedunkularnih, zbog čega se kolecistektomija preporučuje i za sesilne lezije veličine između 6 i 9 mm (29,30). Dokazano je da je primarni sklerozirajući kolangitis čimbenik rizika za malignitet kod polipa žučnjaka, pa je iz tog razloga kolecistektomija indicirana bez obzira na veličinu polipa (31).

Abnormalni spoj koledokusa i Wirsungovog kanala smatra se čimbenikom rizika za nastanak karcinoma žučnjaka. U ovom stanju, lokacija spoja koledokusa i glavnog pankreatičnog voda pozicionirana je proksimalno, pa je zajednički kanal abnormalno dug. U kombinaciji sa spazmom Oddijevog sfinktera dolazi do refluksa pankreasnih egzokrinih sekreta u žučne vodove, čime raste rizik nastanka karcinoma bilijarnog stabla. Učestalost anomalija bilijarnog trakta statistički je viša u Azijata u odnosu na svjetski prosjek. Zamijećeno je da je pojavnost karcinoma žučnjaka u bolesnika s ovom anomalijom učestalija u mlađoj životnoj dobi s podjednakom raspodjelom ovisno o spolu, bez prisutstva kolelitijaze (32).

Pretilost uzrokovana prekomjernim unosom masti, rafiniranih šećera te konzumacijom crvenog mesa je značajan predisponirajući čimbenik karcinogeneze tkiva žučnjaka (6). Uz sedentarni životni stil, hiperkolesterolemiju i hiperinzulinemiju, pretile osobe imaju povećani rizik formiranja kolesterolskih žučnih kamenaca koji čine oko 80 % svih kamenaca žučnjaka (33,34). Mikrotraume stijenke žučnjaka uzrokovane kamencima dovode do kronične upale sluznice što je danas općeprihvaćen glavni mehanizam nastanka karcinoma žučnjaka.

Međutim, povezanost pretilosti i povišenog rizika nastanka karcinoma žučnjaka utvrđena je i kod osoba koje nemaju žučne kamence (35). Ovaj fenomen nastaje zbog činjenice da hiperinzulinemija uzrokovana prekomjernim unosom šećera dovodi do ekspresije „insulin like-growth factor“ receptora (IGFR-1). Potom IGFR-1 receptor može inducirati staničnu proliferaciju s karakterističnim malignim obilježjima poput rezistencije na apoptozu i intenziviranu neoangiogenezu kroz aktivaciju PI3K i MAPK intracelularnih signalnih puteva (36).

Indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) je vrijedan indikator u procjeni rizika karcinogeneze žučnjaka kod pretilih osoba (37). Recentno objavljena meta-analiza pokazala je da relativni rizik nastanka karcinoma žučnjaka kod osoba s prekomjernom težinom (BMI 25 - 30 kg/m<sup>2</sup>) iznosi 1,14 (95 % CI: 1,04-1,25), a kod pretilih osoba (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) iznosi 1,56 (95 % CI: 1,41-1,73) (38).

Zamijećena je i veća podložnost ženske populacije nastanku karcinoma žučnjaka (36). Ova razlika između spolova objašnjava se činjenicom da se zbog estrogena veća količina kolesterola deponira u žuč, čime se ostvaruju preduvjeti za nastanak žučnih kamenaca (3,4,39).

U Europskoj populaciji je razvidna povezanost viših koncentracija C - reaktivnog proteina (CRP) s nastankom karcinoma žučnjaka, što sugerira da je inflamatorni status ključan za karcinogenezu (40).

Postoje podaci o povezanosti bakterijske mikroflore s povećanim rizikom karcinoma žučnog mjehura. Jedan od nusprodukata metabolizma crijevnih bakterija jesu deoksiholati, sekundarne žučne kiseline. Njihova uloga kao endogenog karcinogena nije u potpunosti razjašnjena, međutim, u bolesnika s karcinomom žučnjaka utvrđene su povišene razine deoksiholata što ukazuje da imaju potencijalnu ulogu u procesu maligne alteracije (41).

Također, u područjima indijskog potkontinenta, 1-4 % bolesnika nakon akutne infekcije *Salmonellom typhi* (uzročnik trbušnog tifusa) postaju asimptomatske kliconoše (42). Niz publiciranih članaka kao i meta-analiza 17 kohortnih studija ukazuju na postojanje povezanosti između kroničnih nositelja/kliconoša *S. typhi* i pojavnosti karcinoma žučnjaka (43). Kronično kliconoštvo *S. typhi* je češće kod osoba s kolelitijazom, stoga se pretpostavlja da su žučni kamenci mjesto nidacije *S. typhi* i zato predstavljaju ishodište kronične infekcije ovom bakterijom. Pojedine studije ukazuju da kolonizacija sluznice žučnjaka bakterijom *Helicobacterom bilis* također može biti povezana s nastankom karcinoma žučnjaka. Imunohistokemijskim i molekularnim tehnikama detektirani su citokini i površinski proteini *H. bilis* u žuči bolesnika s kroničnimolecistitisom.

Izloženost kancerogenima u industriji proizvodnje ulja, papira, tekstila i celuloznog acetata povećava rizik nastanka karcinoma žučnjaka (3,4), kao i izloženost radonu kod rudara u rudnicima urana. Dokazana je povezanost između ingestije aflatoksina, a posebice izrazito kancerogenog aflatoksina B1, i nastanka karcinoma jetre i žučnjaka. Aflatoksini su mikotoksini koje izlučuje plijesan roda *Aspergillus*, a često su njime kontaminirani prehrambeni proizvodi kao što su mlijeko, kikiriki, kukuruz i soja (3,11,12).

Pušenje se također povezuje s povećanim rizikom nastanka karcinoma žučnjaka (3-5).

### **1.1.3. Klinička slika**

Vodeći klinički simptomi u većine bolesnika su bolovi u truhu, mučnina s povraćanjem, gubitak tjelesne težine i ikterus, a često se javljaju i kronični bolovi u epigastriju i nadutost, te osjećaj sitosti nakon konzumiranja manje količine hrane. Rijetko su prvi klinički simptomi posljedica intestinalne opstrukcije (44). Prilikom fizikalnog pregleda ponekad se pojavljuju bolovi lokalizirani u gornjem desnom kvadrantu abdomena; isto tako, pažljivom palpacijom katkad se identificira izrazito distendirani žučni mjehur.

Klinička prezentacija bolesti najčešće nastupa kada je bolest u uznapredovalom stadiju; u trenutku pojave kliničkih simptoma u oko 35 % bolesnika lokalni limfni čvorovi su već zahvaćeni tumorom, a u 40 % bolesnika prisutne su udaljene metastaze. Jedan od razloga kasne pojave simptoma jest činjenica da je u 90 % bolesnika najčešće predilekcijsko mjesto nastanka maligne lezije područje fundusa žučnjaka (45,46). Paradoksalno je da simptomi akutnog kolecistitisa, uzrokovani tumorskom opstrukcijom vrata žučnog mjehura, mogu dovesti do otkrivanja karcinoma žučnjaka u ranijim stadijima, uz napomenu da identičnu kliničku sliku akutnog kolecistitisa prikazuje i hilarni kolangiokarcinom. Iz svega navedenog razumljivo je da se prema većini studija korektna prijeoperativna dijagnoza karcinoma žučnjaka postavi u manje od 10 % slučajeva (47).

#### *1.1.3.1. Laboratorijske pretrage*

Laboratorijske pretrage ne pokazuju veća odstupanja, osim u slučaju opstruktivnog ikterusa, kada su značajno povišene vrijednosti bilirubina u krvi (48). Ikterus je izrazito loš prognostički znak, međutim nije kontraindikacija za operativni zahvat, posebno kod pažljivo selekcioniranih bolesnika (49). Tumorski biljezi CEA (karcinoembrionalni antigen) i CA19-9 (karbohidratni antigen 19-9) mogu biti povišeni kod oboljelih s karcinomom žučnjaka, ali niti su senzitivni niti specifični za ovu bolest, pa nemaju dijagnostičku vrijednost (50). S druge strane, značajno povišene razine CA 19-9 u serumu imaju prognostičku vrijednost, te upućuju na lošiju prognozu bolesti (51). U općoj populaciji oko 10% osoba pripada antigenski negativnoj Lewis krvnoj grupi (a-, b-), pa stoga uopće nije sposobno sintetizirati CA 19-9 te mogu imati lažno negativan rezultat (52).

#### *1.1.3.2. Slikovne metode dijagnostike*

Standardna dijagnostička slikovna pretraga za patologiju žučnjaka je transabdominalni ultrazvuk (TRUS), pod kojim se danas podrazumijeva konvencionalni ultrazvuk (CUS), ultrazvuk visoke rezolucije (HRUS), te trodimenzionalni i ultrazvuk s kontrastom (CEUS) (53). Konvencionalne i ultrazvučne pretrage visoke rezolucije su neinvazivne, jeftine i po

uporabi široko rasprostranjene tehnike, međutim, izrazito su ovisne o ispitivaču (54). Ultrazvučne pretrage imaju nisku preciznost kada se radi o razlikovanju adenomiomatoze i karcinoma žučnjaka, te se ponekad ne mogu identificirati anehogeni Rokitsansky-Aschoff sinusi i bljeskajući artefakt „repa komete“, tipični znakovi adenomiomatoze (55,56).

Endoskopski ultrazvuk (EUS) je invazivna pretraga, a istodobno ne donosi više relevantnih kliničkih informacija od drugih, neinvazivnih slikovnih modaliteta. Iz navedenog razloga rijetko se koristi, osim u kombinaciji s biopsijom (EUS-FNA), gdje daje izvrsne rezultate (57).

Kompjutorska tomografija (CT) je tehnika čija je primjena obvezna kod bolesnika kod kojih postoji sumnja na karcinom žučnjaka. Ovom tehnikom se može dobiti bolji uvid u zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, udaljenih i peritonealnih metastaza, te lokalne tumorske invazije u jetru odnosno područje porte hepatis (58).

Magnetska rezonanca (MR), posebice kolangiopankreatografija magnetskom rezonancom (MRCP) koristi se kada je potreban dodatni uvid o tumorskoj invaziji parenhima jetre i hepatoduodenalne regije. Invazivne tehnike kolangiografije kao što su endoskopska retrogradna kolangiopankreatografija (ERCP) i perkutana transhepatična kolangiografija (PTC) su napuštene u dijagnostičke svrhe, te se koriste kao palijativne terapijske metode (58,59).

Pozitronska emisijska tomografija (PET) je preciznija od CT i MRI u prikazivanju maligne infiltracije lokalnih limfnih čvorova i detekciji udaljenih metastaza zbog sklonosti vezanja radioaktivnog izotopa fluorodeoksiglukoze (FDG) na stanice karcinoma žučnjaka. Ograničenja metode su posljedica sklonosti vezanja fluorodeoksiglukoze u područja cijeljenja, pa se PET-CT ne koristi za veliki broj bolesnika kod kojih je sumnja na karcinom žučnjaka postavljena nakon kolecistektomije (60).

#### **1.1.4. Patohistologija karcinoma žučnog mjehura**

##### *1.1.4.1. Benigni epitelni tumori i prekursori karcinoma žučnog mjehura*

Adenom piloričnih žlijezda žučnjaka (engl. *pyloric gland adenoma of gallbladder*; PGA) je neinvazivna neoplazma žučnjaka, koja se sastoji od mucinoznih žlijezda organiziranih u tubularnoj formaciji. Ova vrsta benigne neoplazije se identificira u 0,2 - 0,5 % reseciranih



žučnjaka zbog kolelitijaze ili kroničnog kolecistitisa (61). Etiologija nastanka nije razjašnjena, ali je zamijećeno da je 50 – 65 % ovih lezija praćeno kolelitijazom (62) te se povremeno pojavljuju zajedno sa Peutz-Jeghers sindromom (63) kao i familijarnom adenomatoznom polipozom (61). Mutacije gena *TP53* i *CDKN2A*, tipične za invazivni karcinom žučnjaka, nisu pronađene u ovoj benignoj leziji (64) pa se smatra da iz tog razloga nema veliku ulogu u karcinogenezi invazivnog karcinoma žučnjaka. Prema TNM nomenklaturi, adenom piloričnih žlijezda žučnjaka s displazijom visokog stupnja označava se kao tumor „*in situ*“ - pTis (65).

Bilijarna intraepitelna neoplazija (BiIIN) građena je od mikroskopskih, ne-invazivnih, flat ili mikropapilarnih lezija koje se pojavljuju u sluznici žučnjaka. U zemljama s endemskim karcinomom žučnjaka pojavljuje se kao lezija niskog stupnja displazije u 15 % operativno odstranjenih žučnjaka s kolelitijazom, a u svega 1 - 3,5 % slučajeva kao lezija visokog stupnja displazije (66). Obično se uočava u sluznici uz invazivni karcinom žučnjaka, te se može pronaći u bolesnika kod kojih je prisutna kronična upala sluznice žučnjaka kao posljedica sklerozirajućeg kolangitisa (67), abnormalnog pankreatičnobilijarnog spoja i posljedičnog refluksa (68), bilijarnih cista (69) i familijarne adenomatozne polipoze (FAP) (59). Patogeneza bilijarne intraepitelne neoplazije je posljedica kronične upale (70). U približno 40 % slučajeva tijekom ovog procesa pojavljuju se (kao rani molekularni događaj) mutacije gena *KRAS*, a kao kasni molekularni događaj mutacije gena *TP53*, tipične za karcinom žučnjaka (71). Bilijarne intraepitelne neoplazije visokog stupnja displazije kategorizirane su kao pTis (72).

Intrakolecistična papilarna neoplazma (ICPN) je makroskopski vidljiva, ne-invazivna epitelna neoplazma koja prolifera iz sluznice i protrudira u lumen žučnjaka. Prisutna je u 0,4 % svih kolecistektomija, a oko 6 % karcinoma žučnjaka nastaje iz ove lezije (73). ICPN bez invazivnog karcinoma ima dobru prognozu nakon kolecistektomije. Petogodišnje preživljenje bolesnika s intrakolecističnom papilarnom neoplazmom i neinvazivnim karcinomom je 78 %, a s invazivnim karcinomom 60 % (73).

#### 1.1.4.2. Maligni tumori žučnog mjehura

Najčešći maligni epitelni tumor (karcinom) žučnjaka, u oko 85 % slučajeva (WHO) je adenokarcinom. Pojavljuje se u nekoliko histopatoloških oblika koje je potrebno razlikovati zbog različitog stupnja agresivnosti i načina širenja.

Prema histopatološkim karakteristikama najuobičajeniji je pankreatobilijarni tip adenokarcinoma, koji je po morfologiji i ponašanju sličan pankreatičnom duktalnom karcinomu. Ponekad su ovi tumori tako dobro diferencirani da ih je teško razlikovati od benignih lezija (74).

Intestinalni tip adenokarcinoma žučnjaka je prema patohistološkom izgledu vrlo sličan adenokarcinomu debelog crijeva, stoga je potrebna pažljiva analiza da bi se ove dvije lezije razlikovale.

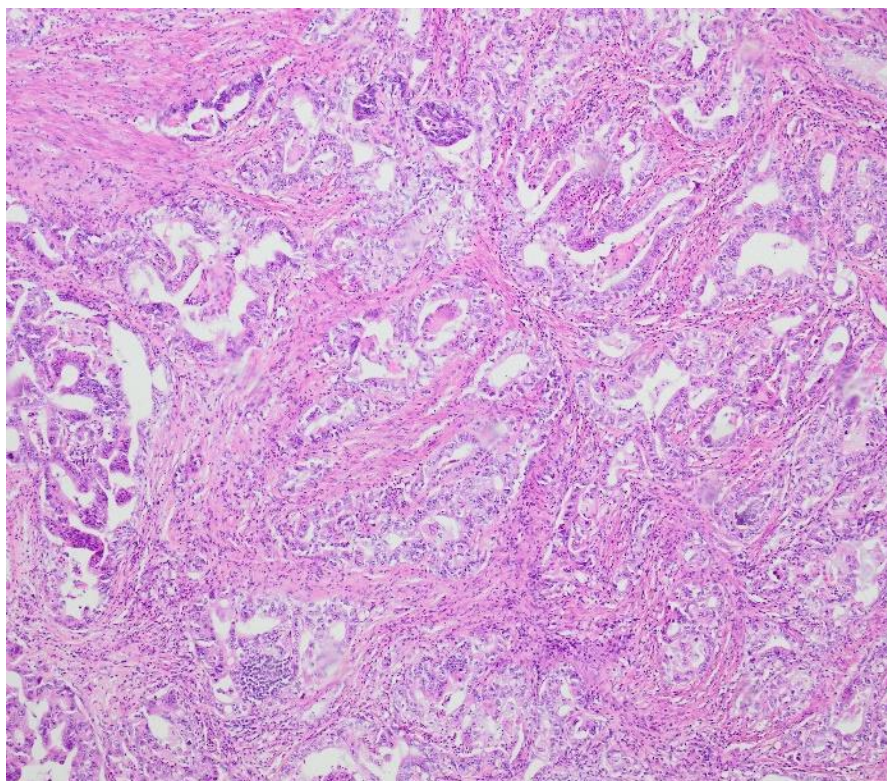
Mucinozni podtip adenokarcinoma žučnjaka je specifičan po nalazu koloidnog mucina u stanicama ovog karcinoma. U trenutku postavljanja dijagnoze obično ih se identificira kao velike tvorbe u uznapređovalom stadiju. Pokazuju agresivnije ponašanje od bilijarnog adenokarcinoma, ali istodobno su mikrosatelitski stabilne novotvorevine (75).

Hipernefroidni karcinom žučnjaka (eng. *clear cells carcinoma*) (76) i slabo kohezivni karcinom žučnjaka sa ili bez stanica prstena pečatnjaka (77) su iznimno rijetki i iznadprosječno agresivni tumori žučnjaka.

U 5 % karcinoma žučnjaka se nalaze zone fokalne skvamozne diferencijacije. Adenoskvamozni karcinom žučnjaka sastoji se od najmanje 25 % skvamoznih elemenata; s obzirom da glandularne i skvamozne komponente tumora imaju korespondirajući imunofenotip, ponekad je potrebna dodatna reevaluacija uzoraka (76).

Skvamozni karcinom žučnjaka je tipični primjer skvamoznog karcinoma s izraženom keratinizacijom; iznimno je rijedak, agresivniji od ostalih podtipova karcinoma žučnjaka i stoga se često dijagnosticira u uznapređovalom stadiju što implicira i lošiju prognozu (78).

Preostali rijetki histološki tipovi malignih tumora žučnjaka su sarkomi, neuroendokrini karcinomi, melanomi i limfomi.



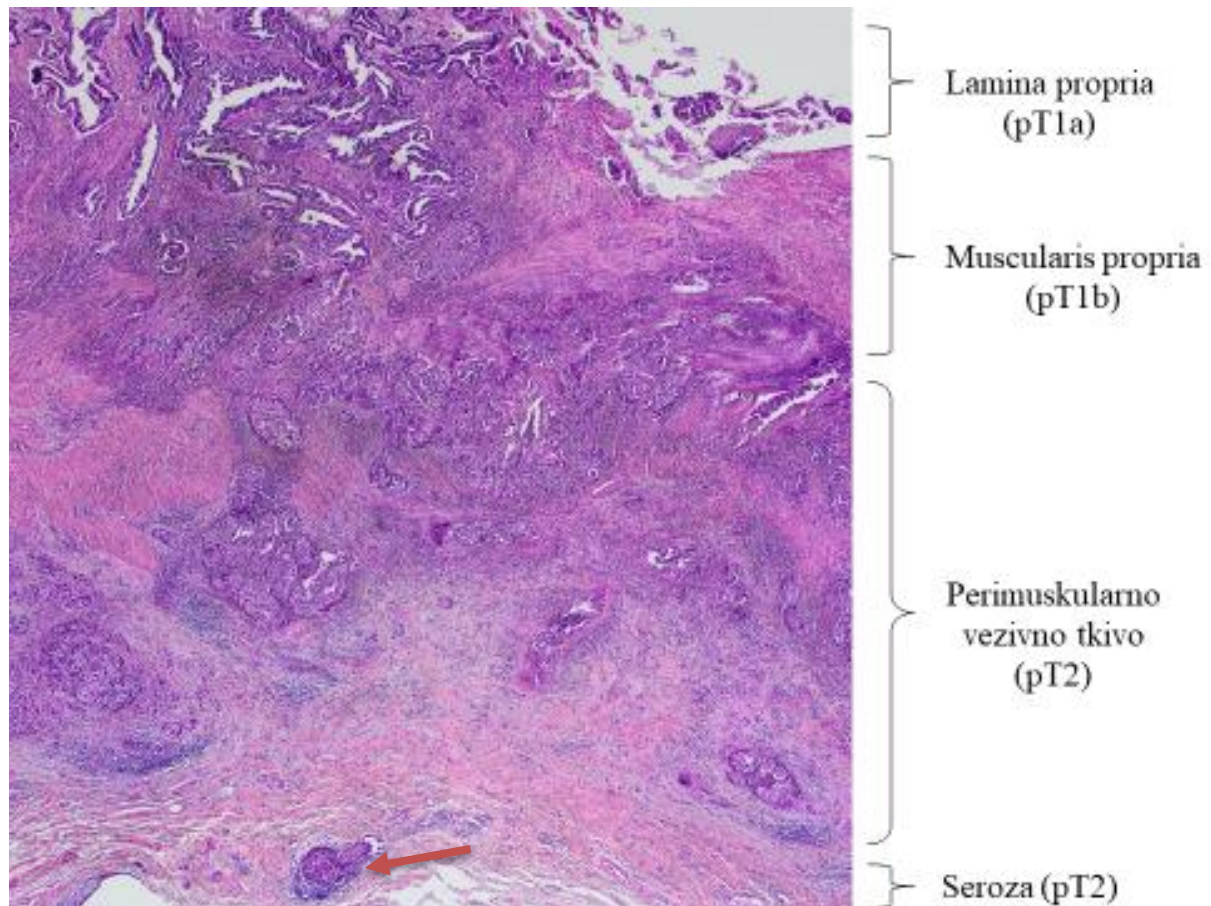
Slika 2. Histološki izgled adenokarcinoma žučnog mjehura, HE x100.

#### *1.1.4.3. Određivanje stadija bolesti*

Određivanje stadija karcinoma žučnjaka je od ključne važnosti za određivanje strategije liječenja oboljelih. Još 1976. godine, Nevin i skupina autora su u svojoj studiji prvi ukazali na uzajamni odnos stadija uznapređovalosti bolesti i kirurškog liječenja (79). Danas se za procjenu stadija uznapređovalosti bolesti najčešće koristi sistematizacija Američkog društva za rak (65), koja se u osnovi bazira na TNM klasifikaciji (72) procjene prodora tumora u stijenku žučnjaka, te zahvaćenosti lokalnih limfnih čvorova i prisutnosti udaljenih metastaza.

Stijenka žučnjaka se u osnovi sastoji od 5 slojeva: mukoznog epitela sastavljenog od jednog sloja cilindričnih stanica, lamine proprije, fibromuskularnog sloja, perimuskularnog subseroznog vezivnog sloja s limfnim i neurovaskularnim strukturama, te serozne ovojnice (Slika 3). Međutim, na hepatalnoj strani žučnog mjehura nedostaje serozna ovojnica, što ima implikacije na infiltrativno širenje karcinoma. Za razliku od ostatka gastrointestinalnog trakta, žučnjak nema submukozni i submukozni muskularni sloj (80,81). Iz ovog razloga kod tumora koji nisu infiltrirali fibromuskularni sloj postoji minimalni rizik nodularnog rasapa. Nažalost, samo mali udio zloćudnih tumora žučnjaka (10 - 25 %) se identificira u stadiju dok su još

lokalizirani u sluznici (6,81). Prema nekim autorima, prevencija je do sada manje istražena mogućnost smanjenja smrtnosti povezane s karcinomom žučnjaka dok je profilaktička kolecistektomija u visokorizičnim skupinama isplativa opcija (82).



Slika 3. Histološka građa stijenke žučnog mjehura. Prikazan adenokarcinom žučnog mjehura patološkog stadija pT2. Strelicom je označeno žarište karcinoma u subserozni. Lamina propria je područje ispod mukoznog epitela sačinjenog od jednog sloja cilindričnih stanica koje oblažu lumen mjehura. Serozna ovojnica oblaže mjehur s njegove vanjske strane i graniči prema peritoneumu. HE, povećanje x40.

Prilikom postavljanja patohistološke dijagnoze karcinoma žučnog mjehura procjenjuje se patološki TNM stadij bolesti koji uključuje određivanje dubine prodora stanica karcinoma u stjenku žučnog mjehura (T), status limfnih čvorova (N) i prisutnost metastaza (M).

Stoga se prema TNM klasifikaciji (WHO) karcinomi žučnog mjehura klasificiraju:

<b>pTis</b>	karcinom „ <i>in situ</i> “ je najraniji mogući stadij karcinoma žučnog mjehura. Sve stanice karcinoma nalaze se unutar sluznice žučnog mjehura. Karcinom se nije proširio nigdje drugdje u tijelu. Karcinom žučnog mjehura rijetko se otkrije tako rano, i to najčešće ako je žučni mjehur uklonjen iz drugih razloga, kao što je žučni kamenac.
<b>pT1</b>	karcinom infiltrira laminu propriju ili mišićni sloj stijenke žučnog mjehura
pT1a	proboj stanica karcinoma u laminu propriju
pT1b	proboj stanica karcinoma u mišićni sloj stijenke
<b>pT2</b>	karcinom infiltrira perimuskularno vezivno tkivo
T2a	karcinom infiltrira kroz mišićni sloj u vezivno tkivo na peritonealnoj strani žučnog mjehura koja nije blizu jetre
T2b	karcinom infiltrira kroz mišićni sloj u vezivno tkivo na strani blizu jetre. Nije se proširio na jetru.
<b>pT3</b>	karcinom probija serozu i/ili se direktno širi u jetru i/ili neki od okolnih organa
<b>pT4</b>	karcinom infiltrira u jednu od glavnih krvnih žila u jetri (jetrenu portalnu venu ili jetrenu arteriju) ili infiltrira u 2 ili više organa izvan jetre
<hr/>	
<b>pN0</b>	regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni
<b>pN1</b>	prisutne metastaze u 1-3 regionalna limfna čvora
<b>pN2</b>	prisutne metastaze u 4 i više regionalnih limfnih čvorova
<hr/>	
<b>M0</b>	nema dokaza udaljenih metastaza
<b>M1</b>	udaljene metastaze detektirane (uključujući metastaze u istostrane supraklavikularne limfne čvorove)

Više studija je ukazalo na povezanost lokalizacije metastaza karcinoma žučnjaka u jetrenom parenhimu s venskom drenažom žučnjaka, pa se iz tog razloga smatra da se karcinom žučnjaka širi i venskim putem (83,84). Glavnina venske krvi žučnjaka se ulijeva u intrahepatične portalne ogranke P4a i P5, hepatalne sinusoidne S4a i S5, te u 4b i 5 segment jetre (84).

### 1.1.5. Klinički stadiji bolesti

Određivanjem kliničkog stadija bolesti procjenjuje se stupanj proširenosti bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze. Prema podacima Američkog društva za rak, procijenjeno ukupno petogodišnje preživljenje bolesnika dijagnosticiranih s karcinomom žučnog mjehura je niže od 20 %. Međutim, ukoliko se bolest dijagnosticira u ranoj fazi (lokalizirana bolest) preživljenje je 69 %, kod regionalno proširene bolesti preživljenje pada na 28 %, a u slučaju udaljenih metastaza petogodišnje preživljenje je 3 % (65).

Slične podatke iznosi i Registar za rak Velike Britanije (85). Prema njihovim podacima nema razlike u preživljenju ovisno o spolu bolesnika unatoč tri puta češćoj incidenciji u žena. Također napominju da je petogodišnje preživljenje dulje kod mlađih bolesnika (oboljelih prije 54. godine) i iznosi 18,2 %, u odnosu na starije osobe (stariji od 75 godina) čije je ukupno preživljenje 6,7 %. Isti registar procjenjuje povećanje broja oboljelih od karcinoma žučnog mjehura za 47 % do 2040., no predviđa i dvopostotno smanjenje smrtnosti svakih 5 godina (85).

Tablica 1. Klinički stadiji karcinoma žučnog mjehura

<b>Stadij 0</b>	karcinom „in situ“ (CIS)	vrlo rani stadij karcinoma žučnog mjehura. Stanice karcinoma postoje samo u sloju sluznice žučnog mjehura. Vrlo mali rizik od širenja karcinoma. Rijetko se dijagnosticira u ovoj fazi.
<b>Stadij I</b>	T1 N0 M0	Stanice karcinoma se nalaze samo unutar slojeva tkiva koja oblažu žučni mjehur. Nije se proširio na obližnja tkiva, limfne čvorove ili druge organe. Najraniji stadij invazivnog karcinoma. Također se rijetko dijagnosticira u ovom stadiju.
<b>Stadij II</b>	T2 N0 M0	Stanice karcinoma prorasle kroz mišićni sloj stijenke žučnog mjehura i u vezivno tkivo ispod (seroza). Nije se proširio izvan žučnog mjehura.
<b>Stadij IIIa</b>	T3 N0 M0	Stanice karcinoma probile kroz stijenku žučnog mjehura, ali se tumor nije proširio na limfne čvorove.

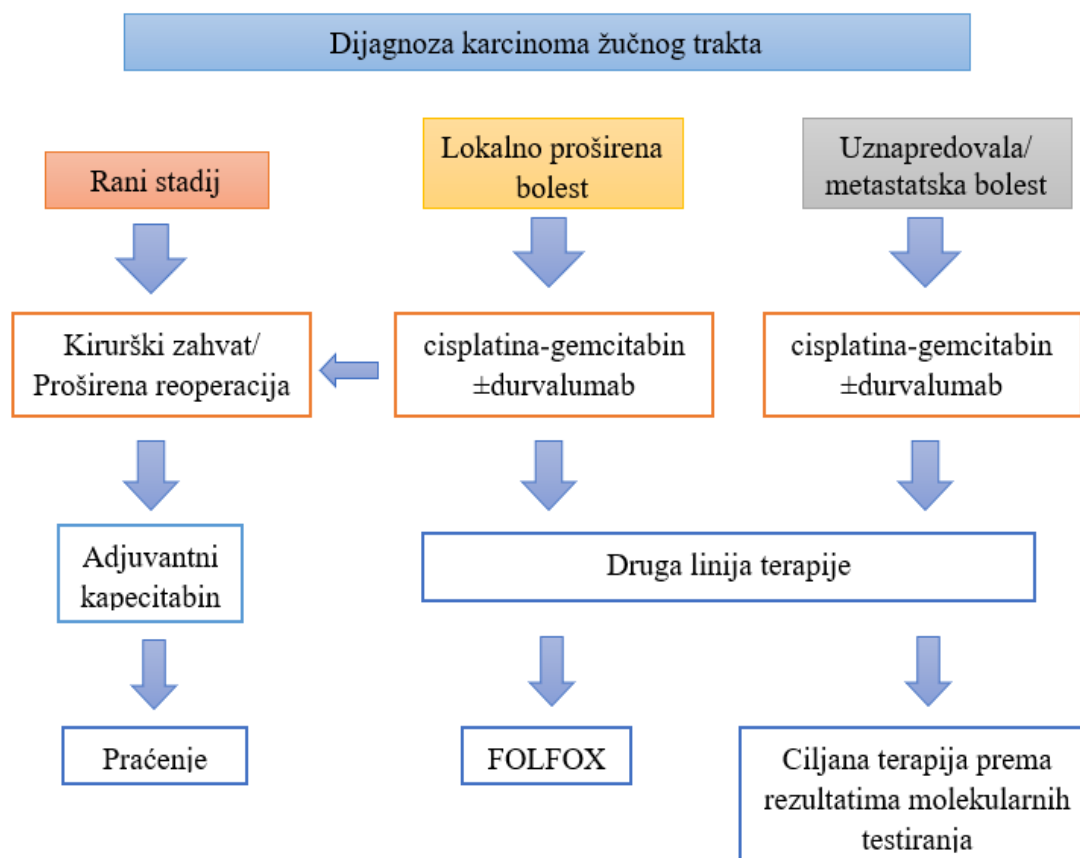
<b>Stadij IIIb</b>	T1/2/3 N1 M0	Stanice karcinoma su unutar stijenke žučnog mjehura ili je karcinom probio vanjsku ovojnicu i proširio se na obližnje limfne čvorove.
<b>Stadij IVa</b>	T4 Bilo koji N0/N1 M0	Karcinom infiltrira u jednu od glavnih krvnih žila koje vode u jetru ili u 2 ili više organa izvan jetre. Također se može proširiti u obližnje limfne čvorove, ali ne u udaljene organe.
<b>Stadij IVb</b>	Bilo koji T N2 M0/M1	Karcinom se proširio na limfne čvorove dalje od žučnog mjehura, ali se nije proširio na udaljene organe u tijelu ili se proširio na strukture ili organe daleko od žučnog mjehura.

### 1.1.6. Terapija karcinoma žučnog mjehura

Prilikom obrade bolesnika sa sumnjom na karcinom žučnog mjehura provode se slikovne metode i drugi testovi kojima se procjenjuje stadij bolesti. U liječenju karcinoma žučnog mjehura koriste se tri standardna terapijska postupka koji uključuju operativni zahvat, radioterapiju i kemoterapiju. Ovisno o kliničkom stadiju bolesti može se primijeniti odgovarajuća terapija.

Bolest u lokaliziranom stadiju, dok se karcinom nalazi unutar stijenke žučnog mjehura, može se potpuno ukloniti operativnim zahvatom. Međutim, bolest se češće dijagnosticira u višim kliničkim stadijima te je najčešće neoperabilna. Isto se odnosi i na recidive kao i na metastatski karcinom.

Nove ESMO smjernice iz 2023. godine daju algoritam pristupa dijagnozi i liječenju karcinoma žučnog trakta (Slika 4) (86). Praćenje tijeka uznapredovale bolesti (pomoću CT ili MR, Ca19-9 ili CEA) prilikom primjene terapije treba provoditi svakih 8 do 12 tjedana kako bi se procijenila učinkovitost ili komplikacije (86).



Slika 4. Shematski prikaz osnovne strategije kliničkog pristupa dijagnostici i liječenju karcinoma žučnog mjehura. ESMO smjernice. Preuzeto i modificirano iz Vogel i sur., 2023 (86).

#### 1.1.6.1. Kirurški zahvat

Strategija primjene modaliteta liječenja karcinoma žučnog mjehura prvenstveno ovisi o procijenjenom stadiju bolesti. Jedina terapija koja danas omogućuje potpuno izlječenje bolesti je adekvatna kirurška resekcija. O ekstenzivnosti zahvata odluku treba donijeti hepatobilijarni multidisciplinarni konzilij s osvrtom na stadij bolesti, ali i s osvrtom na prateće rizike poput općeg stanja bolesnika (engl. *patient's performance score*; PS), funkcijske testove jetre i konkomitantne bolesti (86).

Od presudnog značaja za određivanje terapije su rezultati radiološke obrade (CT, MR) posebice u slučaju nejasne citološke/patohistološke dijagnoze. Ukoliko je moguće, radiološku procjenu potrebno je obaviti prije postavljanja intervencija poput bilijarnih stentova, jer se na taj način



preciznije mogu utvrditi mjesta moguće opstrukcije bilijarnog stabla. CT abdomena, zdjelice i toraksa je referentna pretraga za procjenu proširenosti bolesti (87). PET CT može biti koristan za identifikaciju recidiva, distalnih metastaza i procjenu stupnja zahvaćenosti limfnih čvorova, međutim ne preporučuje se za postavljanje primarne dijagnoze (88).

Specifična situacija u kirurgiji žučnog mjehura nastaje kada se za vrijeme kolecistektomije dobije nalaz karcinoma žučnog mjehura na hitnoj intraoperativnoj biopsiji. Svaki tumor karcinoma žučnog mjehura stadija iznad T1a indikacija je za ekstenzivni operacijski zahvat. U takvim okolnostima, ukoliko je moguće, potrebno je nastaviti s proširenom kurativnom resekcijom jetre i eventualno žučnih vodova (89). Ukoliko ne postoje uvjeti za ekstenzivan operacijski zahvat, bolesnika se može uputiti na sekundarni operacijski zahvat u specijalizirani hepatobilijarni kirurški centar (90). Krajnji ishod oba postupka je podjednak, vjerojatno iz razloga što su većina ovako incidentalno pronađenih lezija tumori u vrlo ranom stadiju (91).

Karcinom žučnog mjehura notoran je zbog metastaziranja po peritoneumu te u područje laparoskopskih incizija kroz koje su bili postavljeni kirurški instrumenti tijekom laparoskopske kolecistektomije. Iz tog razloga preporučuje se ekscizija ožiljkastog tkiva stijenke abdomena na mjestima prethodnog operacijskog zahvata, posebno ukoliko žučni mjehur nije odstranjen u vrećici ili je došlo do prolijevanja žučnog sadržaja. Patohistološki dokazane stanice karcinoma žučnog mjehura u ekscidiranom tkivu ožiljaka znak su agresivnije bolesti i posljedično lošije prognoze bolesti (86).

Za sve stadije bolesti iznad T1a indiciran je radikalni kirurški zahvat koji za cilj ima R0 resekcijske rubove, te odgovarajuću limfadenektomiju. Uznapredovali T stadij nije kontraindikacija za kirurški zahvat. Prilikom planiranja zahvata puno je važnije procijeniti lokalnu infiltraciju i primarno tumorsko sjelo. Kod karcinoma fundusa žučnog mjehura uobičajena je resekcija 4b i 5 segmenta jetre s resekcijom limfnih čvorova porte hepatis, gastrohepatičnog ligamenta i retroduodenalnog prostora (svi limfni čvorovi skupine N1). Karcinom infundibuluma žučnog mjehura ima lošiju prognozu zbog sklonosti davanja ranih metastaza u interkavalne i retropankreatične limfne čvorove. U takvim okolnostima dodatno je indicirana i resekcija distalnog bilijarnog stabla, duodenuma i glave pankreasa s limfadenektomijom interkavalne i retropankreatične regije (86).

Uz pomoć bilijarne drenaže u bolesnika s bilijarnom opstrukcijom moguće je ublažiti simptome. Ukoliko endoskopsko postavljanje stenta nije moguće, preporuča se perkutana transhepatalna bilijarna drenaža (86).

### *1.1.6.2. Radioterapija/zračenje*

Prema novim ESMO smjernicama adjuvantna radioterapija (RT) kod karcinoma žučnog mjehura nije standardni terapijski pristup. No, RT nakon završetka adjuvantne terapije kapecitabinom može se razmotriti kod odabranih bolesnika (npr. R1 resekcija).

U liječenju karcinoma žučnog mjehura koristi se vanjska radioterapija (92). No, ESMO smjernice napominju da vanjska radioterapija ili kemoradioterapija primarnog tumora nikako ne bi smjele biti oblik liječenja lokalno uznapređovalog karcinoma (86). Fotodinamičku terapiju i intraduktalnu radiofrekvencijsku ablaciju treba primjenjivati samo unutar kliničkih ispitivanja (86).

### *1.1.6.3. Kemoterapija*

U liječenju karcinoma žučnog mjehura primjenjuje se kemoterapija lijekovima šireg nespecifičnog spektra (sistemska kemoterapija) koja svoj antineoplastički učinak postiže zaustavljanjem rasta stanica karcinoma, bilo ubijanjem stanica ili zaustavljanjem njihovog dijeljenja. Unatoč razlikama u patofiziologiji, karcinomi žučnog mjehura i kolangiokarcinomi (karcinomi žučnih vodova) često se klasificiraju zajedno i tretiraju na sličan način, posebno u uznapređovalim stadijima bolesti (93).

Obzirom da je trogodišnja stopa recidiva nakon kirurškog zahvata s kurativnom intencijom visoka i iznosi i do 80 % (86,94), kemoterapija nakon kirurškog zahvata (adjuvantna terapija) je postala standard u liječenju u većini slučajeva karcinoma žučnih vodova.

Adjuvantnu terapiju kapecitabinom stoga treba razmotriti nakon resekcije u odabranih bolesnika s karcinomom žučnog mjehura (npr. s R1 resekcijom), a potom je moguće razmotriti radioterapiju (86).

Prema rezultatima studije ABC-02 koju su 2010. godine objavili Valle i suradnici, dualna kemoterapija gemcitabinom i cisplatinom postala je standard prvolinijskog liječenja lokalno uznapređovalog i metastatskog karcinoma žučnog trakta (95). Dodatkom cisplatine gemcitabinu postignut je medijan ukupnog preživljenja bolesnika na 11,7 mjeseci u usporedbi s 8,1 mjesec u skupini koja je primala samo gemcitabin (HR 0,64; 95 % CI: 0,52-0,80). Učinak dodatka cisplatine bio je isti za karcinome žučnog mjehura kao i za kolangiokarcinome (95).

Unatoč poboljšanju vremena do progresije bolesti uvođenjem cisplatine u odnosu na monoterapiju gemcitabinom, medijan ukupnog preživljenja nije bio dulji od godinu dana. Vidimo da potreba za pronalaženjem učinkovitije terapije ostaje. Procjena adjuvantne kemoterapije u usporedbi s kirurškim zahvatom provedena je u nekoliko randomiziranih kontroliranih studija: PRODIGE-12 studija (procjena učinkovitosti gemcitabin-oksaliplatin), BCAT studija (procjena učinkovitosti gemcitabina) i BILCAP studija (procjena učinkovitosti kapecitabina) (96-98). Prema studijama nije uočeno značajno produljenje preživljenja u populaciji s namjerom liječenja (ITT), izuzev studije BILCAP u kojoj je preživljenje bolesnika s karcinomom žučnih vodova produljeno s kapecitabinom na 53 mjeseca u odnosu na 36 mjeseci (99). Također, u studiji SWOG S0809 uzorak od 79 ispitanika s ekstrahepatičnim kolangiokarcinomom ili karcinomom žučnog mjehura podvrgnut je radikalnoj resekciji, a pokazivali su patološki stadij T2-4 ili N1 ili pozitivne rubove resekcije. Nakon resekcije primili su gemcitabin-kapecitabin te kemoradioterapiju s kapecitabinom kao senzibilizatorom. Postignuta je stopa dvogodišnjeg preživljenja veća od 45 % (100).

Nedavno objavljeni rezultati kliničke studije TOPAZ-1 pokazali su da dodatak durvalumaba kombiniranoj cisplatina-gemcitabin terapiji uznapredovalog stadija karcinoma žučnih vodova dodatno poboljšava preživljenje bolesnika (101). Dodatkom durvalumaba medijan ukupnog preživljenja bolesnika produžen je na 12,9 mjeseci (HR 0,76; 95 % CI: 0,64-0,91), a dvogodišnja stopa ukupnog preživljenja je 23,6 %. Stoga, nove smjernice ESMO i NCCN iz 2023. godine preporučuju ovu kombinaciju kao prvu liniju liječenja uznapredovalog karcinoma (86,102). Durvalumab je monoklonsko protutijelo koje djeluje kao imunoterapija jer blokira interakciju PD-L1 s PD-1 te na taj način pojačava protutumorski imunološki odgovor aktivacijom T-limfocita. Također, preliminarni rezultati nove kliničke studije Keynote-966 prezentirani na ASCO-u 2024. godine, pokazuju da dodatak pembrolizumaba (imunoterapija monoklonskim protutijelom koje se veže na PD-1) terapiji gemcitabina i cisplatine (umjesto durvalumaba) poboljšava ishod liječenja te je postignut medijan ukupnog preživljenja od 12,7 mjeseci u uznapredovalom stadiju bolesti (103).

Neoadjuvantna kemoterapija nije standardna terapija karcinoma žučnog mjehura, iako pojedine studije prikazuju slučajeve s postignutim djelomičnim (104) ili potpunim (105) patološkim odgovorom neoadjuvantnom primjenom cisplatine i gemcitabina kod uznapredovalog neresektabilnog stadija bolesti.

Uspješne terapijske opcije pri progresiji bolesti nakon početnog liječenja (tzv. druga linija liječenja) su vrlo izazovne za bolesnike s karcinomom žučnog mjehura. Obzirom na brzo

pogoršanje kliničke slike i performansi bolesnika nakon prve linije liječenja, samo 15-25 % bolesnika ima uvjete za primanje druge linije terapije (9). Ovo naglašava potrebu za primjenom što učinkovitije terapije prve linije, ili dobar probir molekularnih karakteristika karcinoma za ciljanu terapiju u drugoj liniji. ESMO smjernice preporučuju FOLFOX protokol (5-fluorouracil-leucovorin-oxaliplatina) ili ciljanu terapiju ovisno o rezultatima molekularnih testiranja (86).

Kao što smo naglasili, karcinomi žučnog mjehura i kolangiokarcinomi često se tretiraju istim terapijskim protokolom. Međutim, gensko profiliranje tih tumora pokazuje određene razlike između entiteta, koji bi se i u traženju terapijskih opcija trebali promatrati zasebno. U novim ESMO smjernicama stoje preporuke molekularnog profiliranja karcinoma u uznapredovalom i metastatskom stadiju bolesti radi omogućavanja primjene ciljane terapije (86). Većina karcinoma žučnih vodova i žučnog mjehura su sporadični. Ipak, dio njih ima i nasljednu podlogu (zametne mutacije) te se u manje od 10 % slučajeva mogu detektirati patogene varijante u genima *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *ATM*, *PALB2* i drugima (102,106). No za sada ne postoji preporuka o testiranju na nasljedni panel gena u bolesnika s karcinomom žučnog mjehura (102).

Mutacije u stanicama karcinoma žučnih vodova (somatske) zabilježene su puno češće, a neke od njih mogu biti i kandidati za primjenu ciljane terapije. Ukupno se procjenjuje da oko 50 % karcinoma žučnog trakta ima neku od somatskih mutacija (86,107). Prema genskom profiliranju karcinoma žučnog mjehura najčešće je detektirana mutacija u genu *TP53* (oko 65-70 %) koja nema terapijsku opciju, a ostale mutacije češće su detektirane u genima *BRCA2* (1 %), *ATM* (5 %), *PALB2* (3 %), *CDKN2A* (6 %), *PIK3CA* (10 %), *KRAS* (8 %), *ERBB2/HER2* (8 %) i *ERBB3/HER3* (7 %) (93,106).

Iako se većina pojedinih mutacija ne nalazi u visokom postotku slučajeva, ESMO i NCCN smjernice preporučuju da se u slučaju uznapredovalog stadija bolesti molekularna testiranja provedu u svrhu određivanja molekularnog profila tumora već prije/tijekom prve linije terapije (86,102). Analiza tumorske DNA iz tekućinske biopsije također je opcija, dok izbor metode može ovisiti o analizi koja se provodi (IHC, ISH/FISH, NGS).

Nakon progresije bolesti na prvu liniju liječenja u sljedećem ciklusu terapije (druga linija) mogu se primijeniti ciljane terapijske opcije ovisno o rezultatima molekularnog profiliranja tumora. U slučaju karcinoma žučnog mjehura preporuča se dodatno testirati (86,102):

- 1) status receptora HER2 - prekomjerna izraženost receptora na membrani tumorskih stanica ili povećani broj kopija gena javlja se u oko 20 % slučajeva. Terapijska opcija ciljana anti-HER2 terapija primjenom trastuzumaba i pertuzumaba (107)
- 2) fuzije gena NTRK – javljaju se u manje od 1 % karcinoma žučnog trakta

- 3) fuzije i rearanžmani gena FGFR2 (receptor 2 za faktor rasta fibroblasta; engl. fibroblast growth factor receptor 2) – jako rijetko prisutni u karcinomima žučnog mjehura
- 4) mutacija gena BRAF – detekcija aktivacijske mutacije BRAFV600E; terapijska opcija ciljanim BRAF inhibitorima dabrafenibom ili trametinibom (108)
- 5) TMB – određivanje statusa opterećenja tumora mutacijama; visoki TMB (prosječno više od 10 mutacija po tumorskoj stanici) javlja se do 20 % slučajeva
- 6) MSI – status mikrosatelitne nestabilnosti; MMR deficijencija - određivanje statusa mikrosatelitne nestabilnosti. Visoki MSI javlja se u oko 1-3 % slučajeva. Moguće je detektirati mutaciju u genima MMR popravka ili odrediti gubitak izraženosti tih proteina u tumorskim stanicama te analizirati ponavljajuće sekvence DNA (108)

U slučaju detektiranih mutacija u genima BRCA1, BRCA2 i PALB2 bolesnici su kandidati za terapiju PARP inhibitorima, dok su pak u slučaju karcinoma s visokim TMB i MSI bolesnici kandidati za imunoterapiju (pembrolizumab) (86,102). Ciljana terapija za karcinome žučnog mjehura u slučaju drugih navedenih promjena za sada još nije odobrena od strane Europske agencije za lijekove (EMA).

Pregledni rad Zhou i suradnika (109) prikazuje i brojne kliničke studije koje istražuju terapijske opcije liječenja karcinoma žučnog mjehura, a uključuju različite kombinacije terapija gemcitabinom, cisplatinom, irinotekanom, kapecitabinom i drugim. Također je uključen pregled kliničkih studija koje prate učinke ciljane terapije na EGFR/HER1, HER2, HER3, VEGF-2, mTOR, PD1/PD-L1 kod karcinoma žučnih vodova, uključujući i žučni mjehur (109). U isti rad uključeno je i 30-ak kliničkih studija, većinom faze II, koje još uvijek regrutiraju nove bolesnike (109).

Trenutno dostupne terapijske opcije koje se primjenjuju su nespecifične i neselektivne te se i dalje traga za molekulama koje bi omogućile ciljanu terapiju karcinoma žučnog mjehura.

## 1.2. Biomarkeri i ciljana terapija

Uspješnije liječenje zloćudnih tumora postiže se u slučaju ranog otkrivanja bolesti. Nažalost, u slučaju karcinoma žučnog mjehura dijagnoza se postavlja uglavnom u uznapredovalom stadiju bolesti, jer u ranijim stadijima bolesti nema posebnih simptoma. Već u uvodnom tekstu navodimo da se do dijagnoze karcinoma žučnog mjehura često dolazi slučajno prilikom dijagnoze/operativnog zahvata provedenih zbog benignih i upalnih promjena. Stoga je pravovremena dijagnoza ove bolesti teška te se traže molekule koje bi kao biomarkeri ukazivale na rani stadij bolesti ili bi poslužile kao ciljana terapija.

Liječenje karcinoma doživjelo je revoluciju tijekom posljednjih nekoliko desetljeća primjenom imunoterapije. Intervencije temeljene na imunološkom sustavu pokazale su obećavajuće rezultate, pružajući novi način liječenja kod raznih vrsta karcinoma. Uspješnost liječenja imunoterapijom većinom je postignuta kod hematoloških maligniteta, dok primjena tog oblika terapije u karcinomima solidnih organa nudi još dosta izazova. Učinkovitu imunoterapiju kod tumora solidnih organa ometa kompleksno, dinamično mikro-okruženje tumora koje modulira opseg i fenotip odgovora antitumorskog imunološkog sustava. Nadalje, mnogi tumor-vezani antigeni nisu i tumor specifični već se mogu naći i u normalnim tkivima, što rezultira toksičnošću. Stoga su u tijeku napori da se identificiraju tumorski antigeni za ciljanu upotrebu te razviju različiti modaliteti liječenja koji se temelje na imunološkom sustavu.

Antigeni raka testisa (engl. *cancer-testis antigens*; CTA) su velika i heterogena skupina proteina čija je izraženost u zrelom tkivu gotovo isključivo ograničena na tkivo testisa (spermatociti) te jajnika i trofoblasta. Zbog visoke imunogenosti CTA-ovi se smatraju dobrim ciljevima imunoterapije jer ih karakterizira slaba izraženost u normalnim tkivima, a često su izraženi u karcinomima.

### 1.2.1. Imunološki odgovor na tumore (PD1/PD-L1)

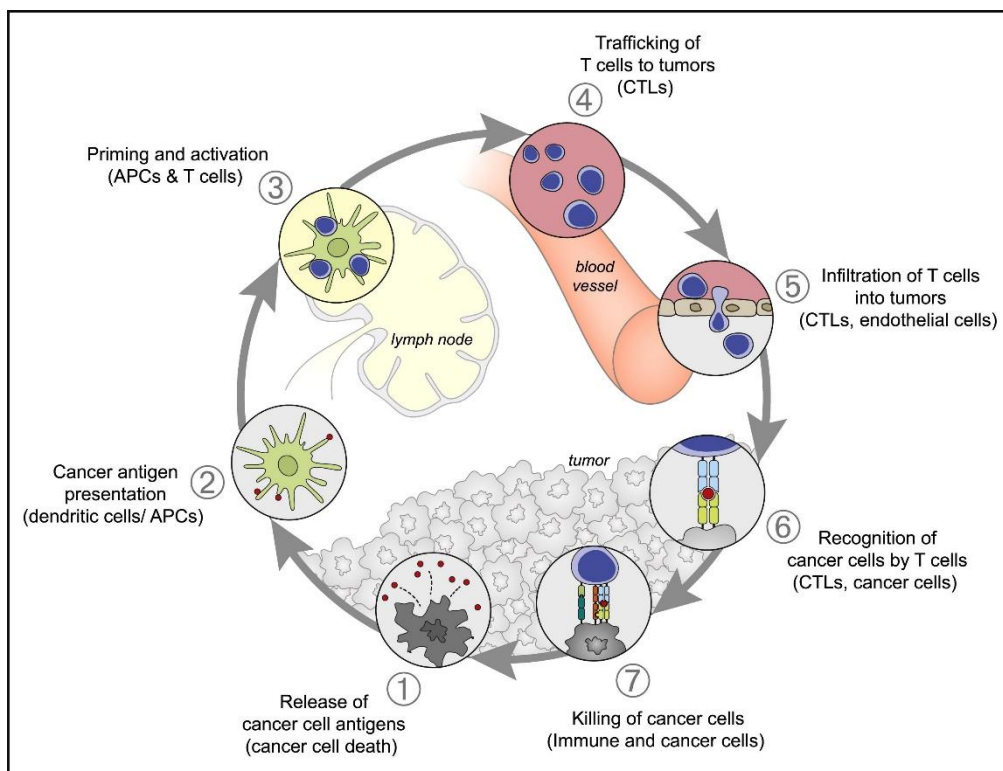
Prilikom maligne transformacije tumorske stanice stvaraju abnormalne ili nespecifične antigene na svojoj površini ili ih izlučuju u mikro-okoliš. U većini slučajeva imunološki sustav sposoban je prepoznati takve antigene kao strane i opasne za organizam te uništiti stanice s malignim potencijalom. Ovaj proces odvija se kontinuirano u organizmu i poznat je kao imunološki

nadzor, a predstavlja obrambeni mehanizam protiv tumora i u većini slučajeva eliminira takve stanice prije razvoja bolesti.

Imunološki odgovor se javlja na dva tipa tumorskih antigena i to: antigene jedinstvene za tumorske stanice ili tumor-specifične antigene (engl. *tumor specific antigens*) te antigene vezane s tumorom koji se mogu pojaviti i u normalnim stanicama (engl. *tumor-associated antigens*) (86). Antigene koji su specifični za tumor čine fragmenti malih peptida na površini tumorskih stanica uglavnom povezani s molekulama histokompatibilnog kompleksa klase I (MHC I). Ovi antigeni imaju veliki potencijal u imunoterapiji. Njih prepoznaju i eliminiraju T limfociti.

Antigeni povezani s tumorom koji se pojavljuju na tumorskim stanicama nisu strukturno različiti od onih na zdravim stanicama nego se najčešće mijenja njihova količina, zbog čega često završavaju u krvotoku te se mogu koristiti kao tumorski biljezi.

Mehanizam imunološkog odgovora prikazan na Slici 5 ima nekoliko koraka (110,111). Nakon oslobađanja tumorskih antigena (točka 1) dolazi do njihovog prezentiranja dendritičkim stanicama (točka 2), što uzrokuje aktivaciju T-staničnog odgovora unutar limfnog čvora (točka 3), a tako aktivirane T-efektorske stanice putuju cirkulacijom do tumora (točka 4) te se infiltriraju u područje tumora (točka 5). Ključno je prepoznavanje tumorskih stanica kao stranih (točka 6), čime dolazi do uništenja tumorske stanice (točka 7). Tim procesom oslobađaju se tumorski antigeni i ciklus se ponavlja (110).



Slika 5. Shematski prikaz mehanizma imunološkog odgovora. Oslobađanje tumorskih antigena (1) te njihov kontakt s dendritičkim stanicama (2) dovodi do aktivacije T-staničnog odgovora unutar limfnog čvora (3). Aktivirane T-efektorske stanice se infiltriraju u područje tumora (4,5) gdje prepoznavanjem tumorskih stanica (6) dolazi do njihovog uništavanja. Preuzeto i modificirano iz Chen i Mellman, 2013 (110).

Karcinomi koji pokazuju visoku imunogenost i infiltraciju T-limfocita smatraju se „vrućim“ te se mogu liječiti imunoterapijom za razliku od neimunogenih tumora koji se smatraju „hladnim“ (112). Većina karcinoma dojke, glioblastoma te raka prostate, jajnika i gušterače su tipično hladni tumori što predstavlja problem za primjenu imunoterapije. Mikro-okruženje hladnih tumora sadrži mijeloidne supresorske stanice (MDSC) i T- regulatorne stanice (T-regs) koje suzbijaju imunološki odgovor i inhibiraju T-efektorske stanice koje se pokušavaju infiltrirati u tumor (112).

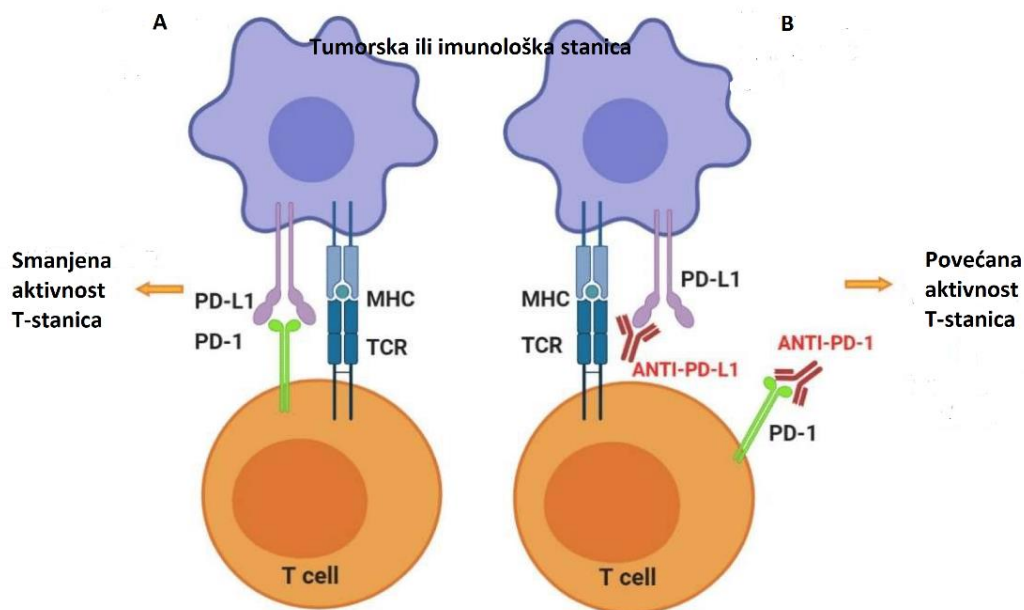


### 1.2.1.1. PD-1/PD-L1 mehanizam

Današnja istraživanja terapijskih opcija okrenuta su primjeni imunoterapije. Melanomi su prvi primjer malignih bolesti povezan s postojanjem tumor specifičnih antigena kod kojih je primijenjena imunoterapija. Osim toga, spontane regresije melanoma zabilježene kod pojedinaca upućuju na učinkovit imunološki odgovor. Istraživanja se također fokusiraju i na pretvaranja „hladnih“ tumora u „vruće“ čime bi povećali osjetljivost na imunoterapiju. Pri tome se razvijaju i brojni pristupi u imunoterapijskom liječenju kao što je terapija „*check-point*“ inhibitorima (npr. inhibitori PD-L1), ali i primjena specifičnog cjepiva kao i primjena imunoterapije aktiviranim T stanicama (113-115). Ovakvim oblicima terapije jača se prirodna sposobnost organizma u borbi protiv karcinoma, pa će njihova primjena u budućnosti biti vjerojatno češća uz manje nuspojava (113-116).

Jedan od ključnih koraka u mehanizmu imunološkog odgovora je aktivacija T limfocita (citotoksični T limfociti, CTL) koja se događa nakon što T stanice prepoznaju strane antigene, što rezultira apoptozom ciljne stanice. U cijelom procesu važnu ulogu ima protein odgovoran za programiranu smrt stanice (PD-1) (kodiran genom PDCD1). To je transmembranski glikoprotein iz obitelji receptora CD28/CTLA-4 koji su kontrolne točke imunološkog odgovora (engl. *immune checkpoint proteins*). PD-1 je monomer na koji se vežu njegovi ligandi PD-L1 (gen B7-H1; CD274) i PD-L2 (gen B7-DC; PDCD1LG2). Prisutan je na membrani T (CD8+) i B limfocita i makrofazima te negativno regulira imunološki odgovor i sprječava nastanak autoimunih bolesti (117).

Tumorske stanice koje pokazuju jaču izraženost liganda PD-L1 uspijevaju izbjeći imunološki odgovor vezanjem receptora PD-1 na limfocitima s PD-L1 na tumorskim stanicama čime dolazi do inhibicije citotoksične aktivnosti T-stanica (Slika 6) (117).



Slika 6. Mehanizam imunološkog odgovora i terapijske opcije inhibitora signalnog puta PD-1/PD-L1 u karcinomima. A, vezanjem liganda PD-L1 s tumorske stanice na PD-1 na T-limfocitima tumor izbjegava apoptozu. B, farmakološkom inhibicijom imunoloških kontrolnih točaka monoklonskim protutijelima (anti-PD-1/anti PD-L1) obnavlja se antitumorsko djelovanje T limfocita, čime tumorske stanice odlaze u apoptozu. TCR, T-cell receptor. Preuzeto i modificirano iz Alard i sur, 2020 (118).

U posljednje vrijeme je razvijeno nekoliko lijekova, koji kao monoklonska protutijela blokiraju interakcije PD-1 receptora s njegovim ligandima PD-L1 i PD-L2 čime se reaktivira antitumorski imunološki odgovor (117,119–122). Učinak ovog oblika terapije nije vezan na porijeklo tumora već ima šire antitumorsko djelovanje, zbog čega se koristi u primjeni kod različitih vrsta tumora (melanomi, karcinomi pluća, dojke, pankreasa, urotelni karcinomi i dr.) (123).

Nekoliko studija usredotočilo se na izraženost PD-L1 u karcinomima bilijarnog sustava, od kojih su neke uključivale i karcinome žučnog mjehura u kombinaciji s ili bez ispitivanja ekspresije PD-L1 na intratumoralnim limfocitima. Rezultati ovih studija upućuju na potencijalnu prognostičku važnost određivanja statusa PD-L1 u karcinomima žučnog mjehura (98-100). Inhibitori PD-1/PD-L1 primjenjuju se i u terapiji karcinoma žučnog mjehura uglavnom kod uznapredovalog neoperabilnog stadija bolesti.

PD-L1 izraženost je zabilježena u 12-23 % slučajeva karcinoma žučnog mjehura (124-126). Mody i sur. (125) su zabilježili izraženost PD-1 u 55 % slučajeva povezanih s genetskim aberacijama i tumorskim mutacijskim opterećenjem (TMB). Prema literaturi, povišene razine PD-L1/PD-1 u korelaciji su s lošim preživljenjem bolesnika oboljelih od karcinoma pluća nemalih stanica (NSCLC) (127), melanoma (128), karcinoma prostate (129), dojke (130), jetre (131), gušterače (132,133) i dr.

Ha i sur. (134) su zabilježili i serumske razine topivog PD-L1 (sPD-L1) kod uznapredovalog karcinoma žučnih vodova, a visoke razine sPD-L1 upućuju na značajno lošije ukupno preživljenje. Nekoliko studija ispitivalo je ekspresiju PD-L1 u karcinomima bilijarnog sustava, a njihovi rezultati upućuju na potencijalnu prognostičku važnost utvrđivanja statusa PD-L1 u karcinomu žučnjaka (133-137). Kim i sur. (135) primijetili su lošije ukupno preživljenje bolesnika s karcinomom žučnog mjehura te navode PD-L1 kao negativan prognostički biljeg dok Neyaz i sur. (124) nisu utvrdili takvu korelaciju.

### **1.2.2. Antigeni karcinoma testisa**

Antigeni karcinoma testisa (engl. *cancer-testis antigens*, CTA) čine obitelj antigena koji su kodirani s 276 gena, uključujući više od 70 obitelji gena (106). Otprilike 50 % svih CTA gena čine multigenske obitelji na X kromosomu i nazivaju se CT-X geni (138,139). Antigeni karcinoma testisa uglavnom su ograničeni na spolne stanice testisa, trofoblast i placentu bez izraženosti u somatskim stanicama (140,141).

Ipak, pregledom literature je moguće uočiti da kod različitih epitelnih karcinoma dolazi do ponovne izraženosti CTA. Tumori bogati CTA uključuju melanom, tumore jajnika, pluća i mjehura; u skupinu karcinoma koji umjereno izražavaju CTA pripadaju karcinom dojke, mjehura i prostate, dok karcinom bubrežnih stanica, kolorektalni karcinom i limfom/leukemija slabo izražavaju CTA (141,142). Zabilježene su i razlike u tipovima CTA češće izraženim kod nekih tipova tumora. Tako je npr. MAGEA1–4 izražen u 70 % metastatskih melanoma, ACRBP u 70 % tumora jajnika i NY-ESO-1 u 46 % tumora dojke (143). Veća izraženost češće je povezana i s višim kliničkim stadijem bolesti.

Najvjerojatniji mehanizam koji dovodi do ponovne izraženosti CTA je visoka razina demetilacije DNA (hipometilacija) i histonska posttranslacijska modifikacija u stanicama

karcinoma kao i regulacija posredovana mikro RNA (miRNA) (139). U nekim eksperimentima pokušalo se inducirati izraženost pojedinih CTA kako bi se stvorio potencijal za ciljanu terapiju. Zanimljivo je da je upotrebom kemikalije za demetilaciju, kao što je 5-aza-2-deoksicitidin, inducirana ponovna izraženost određenih CTA specifično samo u tumorskim stanicama, ali ne i normalnim epitelnim stanicama (144).

Obzirom na značajnu funkciju u embrionalno doba, uloga CTA još uvijek nije potpuno jasna. CTA su uključeni u metabolizam stanica, dinamiku citoskeleta, popravak dvolančanog prekida, održavanje genomskog integriteta i regulaciju izraženosti mRNA tijekom spermatogeneze (143). Zbog svoje sveobuhvatne funkcije i u tumorskoj stanici vjerojatno imaju ulogu u regulaciji epitelno-mezenhimalne tranzicije kao i preživljenju tumorskih stanica (145).

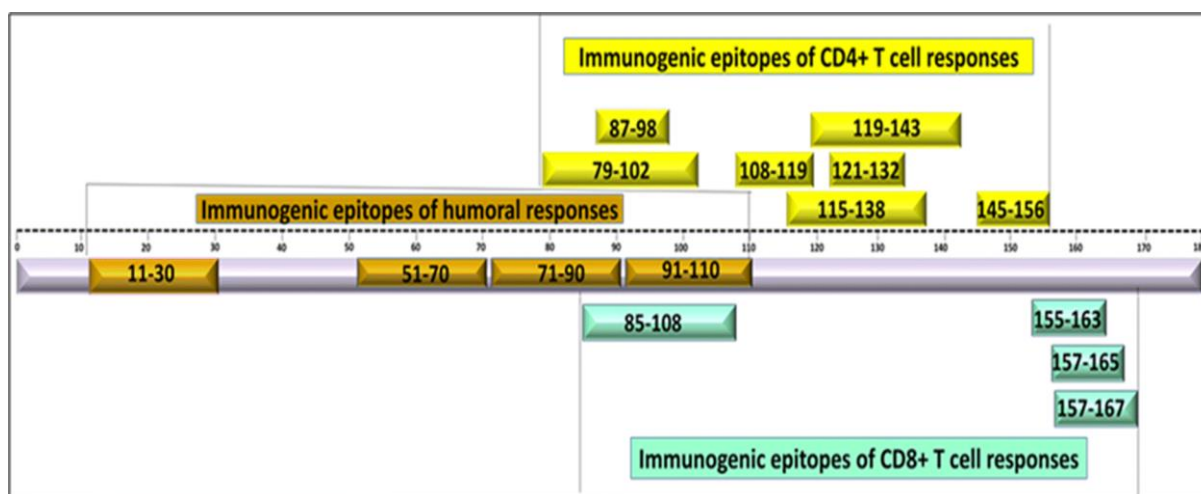
S obzirom na njihovu uvelike ograničenu izraženost u odraslim somatskim tkivima i njihov imunogeni potencijal, CTA su potencijalne mete za imunoterapiju. Do sada je NY-ESO1 najperspektivniji CTA jer je njegova ekspresija u tumorima jasno povezana s indukcijom imunološkog odgovora u širokom rasponu zloćudnih bolesti (139).

#### *1.2.2.1. NY-ESO1*

NY-ESO1 (engl. *New York esophageal squamous cell cancer-1*) pripada skupini CTA (engl. *cancer/testis antigen 1A; CTAG1A*). Gen koji kodira protein također se nalazi na kromosomu X, uz prisutne dvije kopije istog gena (*CTAG1A i 1B*). NY-ESO1, antigen karcinoma testisa 1 je protein kodiran genom *CTAG1B*, također poznat kao *LAGE2* ili *LAGE2B* (145-148). Kao i kod drugih CTA, njegova izraženost je ograničena na testis, ovarije, trofoblast i placentu. U testisima je snažno izražen u spermatogoniji i primarnim spermatoцитima odraslih testisa, ali ne i u postmejotičkim stanicama ili somatskim stanicama testisa (149).

NY-ESO1 je polipeptid od 180 aminokiselina (Slika 7), izražen u ljudskom fetalnom testisu tijekom embrionalnog razvoja od 18. tjedna do rođenja. Točna funkcija još uvijek nije razjašnjena, a ovisno o drugim partnerima prilikom stvaranja kompleksa, NY-ESO1 ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i apoptozi. Najvažniju funkciju obavlja u regulaciji samoobnavljanja ili diferencijaciji muških zametnih stanica, podržanu nuklearnom lokalizacijom *CTAG1A* u mezenhimalnim matičnim stanicama za razliku od njegove

citoplazmatske izraženosti u stanicama raka (150).



Slika 7. Građa proteina NY-ESO1. Shematski prikaz aminokiselina koje predstavljaju imunogene epitope za anti-NY-ESO1 protutijela, odgovor CD4+ (žuto) i CD8+ (zeleno) T stanica. Prirodna anti-NY-ESO1 protutijela uglavnom se preslikavaju na područje N-kraja (narančasto), dok se stanični odgovori stvaraju na području C-kraja. Preuzeto iz Raza i sur., 2020. (151)

NY-ESO1 nije izražen u normalnim (somatskim) stanicama dok je značajna izraženost zabilježena u različitim tipovima tumora, ali u širokom rasponu izraženosti. Rezultati izraženosti variraju zbog primjene različitih metoda detekcije (na razini mRNA ili proteina, u serumu, itd.), stoga je teško odrediti postotak izraženosti u pojedinom tipu tumora. No, prosječno je najveća izraženost zabilježena u neuroblastomu (82 %) i sinovijalnom sarkomu (60 - 80 %), potom melanomu (32 % - 64 %), raku jajnika (40 %), prostate (10 - 35 %), mokraćnog mjehura (35 %), jednjaka (20 % - 40 %), karcinomima glave i vrata (4 - 14 %), karcinomu pluća nemalih stanica (11 % - 25 %), dojke (7 % - 15 %) i hepatocelularnom raku (10 - 15 %) (152). Vrlo slaba izraženost zabilježena je kod raka debelog crijeva (0 % - 8 %). Svega par studija bilježi izraženost NY-ESO1 u karcinomu žučnog mjehura pa tako Reiner i sur. pokazuju njegovu izraženost u 3 % (153).

NY-ESO1 se smatra jednim od najimunogenijih CTA koji izaziva jak, integrirani imunološki odgovor u velikom postotku bolesnika čiji tumori izražavaju NY-ESO1 (154,155). Njegova

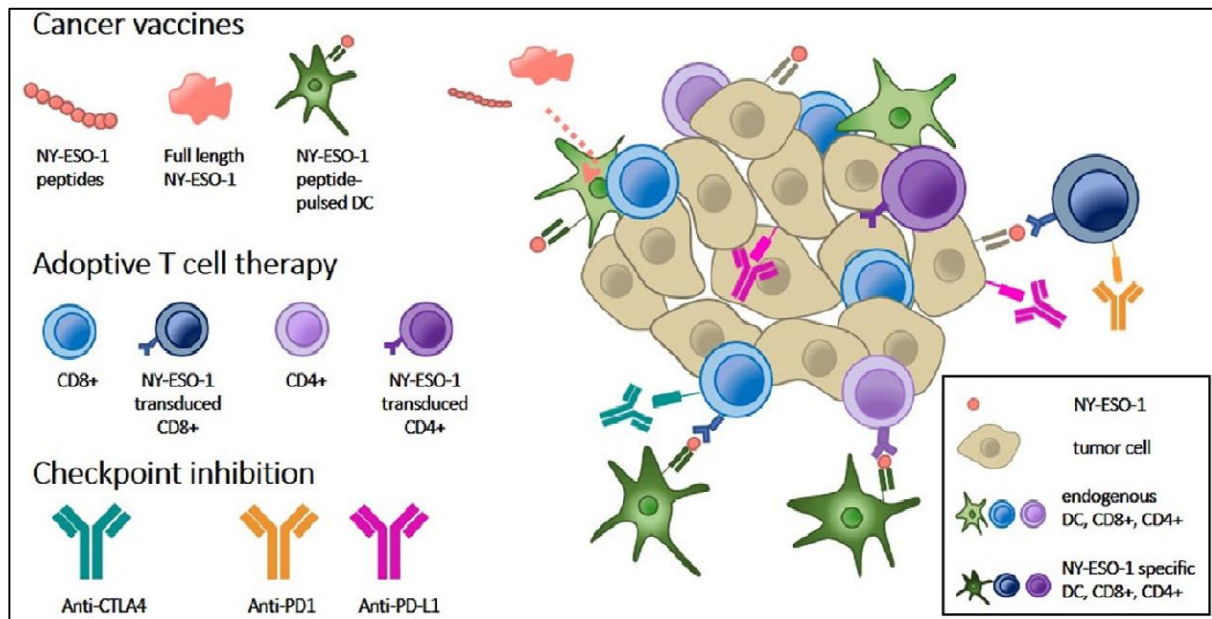
sposobnost da izazove spontane humoralne i stanične imunološke odgovore (Slika 7), zajedno s njegovom ograničenom izraženošću, učinili su ga potencijalno dobrom metom za imunoterapiju karcinoma, međutim, njegova korisnost kao prognostičkog biomarkera nije još jasno određena.

#### *1.2.2.2. Terapijske opcije usmjerene na NY-ESO1*

Istraživanja su pokazala da mnogi članovi CTA obitelji, uključujući i NY-ESO1, induciraju spontane stanične i humoralne imunološke odgovore u bolesnika s tumorima u uznapredovalom stadiju. Molekularna osnova antitumorske imunosti posredovane T stanicama razjašnjena je identifikacijom niza tumorskih antigena koje prepoznaju CD8+ T stanice. Prvi takav prijavljeni istovremeni humoralni i stanični odgovor na NY-ESO1 bio je od bolesnika s metastatskim melanomom (155). NY-ESO1 sadrži 3 HLA-A2 epitopa koje prepoznaju CD8+ citotoksični T limfociti (151,155). Integrirani humoralni imunološki odgovori protiv NY-ESO1 otkriveni su kod bolesnika s multiplim mijelomom (156), karcinomom dojke (157), nemalostaničnim karcinomom pluća (158) i rakom jajnika (159,160).

Vjeruje se da je NY-ESO1 obećavajuća meta za imunoterapiju raka zbog njegove selektivne ekspresije u normalnim tkivima i ponovne ekspresije u tumorskim stanicama, kao i njegove visoke imunogenosti. Obzirom da NY-ESO1 nije izražen u somatskim stanicama već je selektivno ponovno izražen samo u tumorskim stanicama, stavlja NY-ESO1 u idealnu poziciju ne-ciljane imunoterapije karcinoma niske toksičnosti.

Do svibnja 2018. godine registrirano je 12 kliničkih ispitivanja s NY-ESO1 cjepivom protiv karcinoma, 23 s modificiranim T stanicama (CAR terapija) i 13 s kombiniranom imunoterapijom (152).



Slika 8. Terapijske opcije imunoterapije usmjerene na NY-ESO1: cijepljenje peptidima NY-ESO1 (engl. *cancer vaccines*); adoptivna terapija aktiviranim T stanicama (engl. *adoptive T-cell therapy*); primjena inhibitora kontrolnih točaka imunološkog odgovora (engl. *checkpoint inhibition*). Preuzeto iz Thomas i sur., 2018. (152)

Na shematskom prikazu Thomas i sur. (Slika 8) prikazane su terapijske opcije (u razvoju i/ili kliničkim ispitivanjima) usmjerene na tumore koji izražavaju NY-ESO1 protein aktivacijom imunološkog odgovora putem sljedeća tri pristupa (152):

**(1) cijepljenje protiv karcinoma koji izražava NY-ESO1.** Cjepiva se sastoje od peptida izvedenih iz NY-ESO1 (fragmenti veličine 81 do 111 aminokiselina) ili proteina pune duljine. U ovom procesu ključna je aktivacija dendritične stanice (DC) koja nastaje pod utjecajem kontakta proteina NY-ESO1 sa samim dendritičnim stanicama koje ih potom prezentiraju tumorskom imunološkom mikro-okruženju. Tako aktivirane DC izravno stimuliraju T stanice. Do danas je u NY-ESO1 identificiran 21 različit epitop ograničen na najmanje pet različitih alela HLA klase II. Pokazalo se da su peptidi NY-ESO1<sub>80-109</sub> i NY-ESO1<sub>157-165</sub>, povezani s odgovorom CD4+ i CD8+ T stanica, najimunogeniji (Slika 7). Što cjepivo sadrži duži fragment NY-ESO1, imunološki odgovor je jači, a učinak bolji i dugotrajniji.

Sada su već u kliničkim ispitivanjima i kombinirana cjepiva koja bi olakšala dendritičnim stanicama prepoznavanje NY-ESO1 i tako ubrzala proces. Isto tako, kombinacija proteinskog cjepiva NY-ESO1 s kemoterapijskim lijekom doksorubicinom inkapsuliranim u liposome i

agensom za demetilaciju decitabinom pojačala je specifične humoralne i CD8+ imunološke odgovore kod 67 i 50 % bolesnika s recidivom epitelnog karcinoma jajnika (160).

**(2) Adoptivna T-stanična terapija.** Ovakav tip terapije može imati više oblika. U jednostavnijem modelu izoliraju se tumor-infiltrirani limfociti koji su senzibilizirani na tumorske markere, aktiviraju se u laboratorijskim uvjetima te vrata u organizam bolesnika. Drugi modeli uglavnom podrazumijevaju modificiranje T stanica u kulturi kao što su terapija reprogramiranim T-staničnim receptorom (engl. *engineered T cell receptor therapy*; TCR) i terapija genetički modificiranim T stanicama koje imaju posebno dizajnirane receptore za lakše prepoznavanje tumorskih stanica (engl. *chimeric antigen receptor*; CAR). Potom se tako transducirane CD8+ ili CD4+ T-stanice s NY-ESO1 T-staničnim receptorima umnažaju u kulturi i vraćaju u bolesnikov organizam.

Adoptivna terapija T stanicama s HLA-A2 ograničenim NY-ESO1/LAGE-1 transduciranim CD8+ T stanicama poboljšala je stope kliničkog odgovora i ukupno preživljenje bolesnika s melanomom i sarkomom sinovijalnih stanica otpornim na dotadašnja liječenja. Otprilike polovica bolesnika s metastatskim melanomom ili sarkomom sinovijalnih stanica koji su primili NY-ESO1 transducirane CD8+ T stanice i IL-2 pokazala je dobar klinički odgovor (161).

**(3) Inhibitori kontrolnih točaka.** Imunološki odgovor prirodno kontroliraju molekule imunološke kontrolne točke [citotoksični protein povezan s T-limfocitima 4 (CTLA-4), protein programirane stanične smrti 1 (PD-1) i njegovi ligandi (PD-L1 i PD-L2)] kako bi se spriječila pretjerana aktivacija imunološkog odgovora koja rezultira autoimunom bolešću. Dok put PD-1 inhibira aktivaciju T stanica tijekom faze efektor, put CTLA-4 igra važnu ulogu u aktivaciji naivnih T stanica tijekom faze „priminga“ (162). Vežanje PD-1 na njegove ligande na T stanicama inhibira proliferaciju i aktivaciju T stanica te smanjuje preživljenje T stanica.

Međutim, stanice karcinoma mogu preoteti regulacijske putove T stanica kako bi ublažile antitumorski odgovor. Jedan pristup u imunoterapiji karcinoma je oslobađanje prirodnog imunološkog odgovora inhibicijom ovih molekula kontrolnih točaka pomoću specifičnih inhibitora. U terapiji se koriste inhibitori imunoloških kontrolnih točaka koji blokiraju inhibitorne signale između DC i T stanica (anti-CTLA-4) i između T stanica i tumorskih stanica (anti-PD1 i anti-PD-L1). Inhibitori kontrolnih točaka imunološkog odgovora mogu se koristiti u kombiniranoj terapiji s cijepljenjem ili nekim od oblika adoptivne terapije.



Obzirom da karcinomi žučnog mjehura, iako niske učestalosti u populaciji, imaju visoku smrtnost, traganje za ciljanom i učinkovitom terapijom je svakako u fokusu istraživanja. Stoga je potrebna identifikacija ciljanih molekula, kao prediktivnih ili prognostičkih biomarkera, pa je s tim ciljem provedeno i ovo istraživanje izraženosti PD-L1 i NY-ESO1.

## **2. HIPOTEZA**

Postoji pozitivna povezanost između imunohistokemijske izraženosti PD-L1 i NY-ESO1 i prognoze u oboljelih od karcinoma žučnog mjehura.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

#### **Opći cilj**

Odrediti imunohistokemijsku izraženost PD-L1 i NY-ESO1 u karcinomima žučnog mjehura.

#### **Specifični ciljevi**

1. Usporediti izraženost PD-L1 i NY-ESO1 u karcinomima žučnog mjehura
2. Usporediti izraženost PD-L1 s kliničko-patološkim parametrima (dob, spol, veličina tumora, histološki tip, perineuralna invazija, limfokapilarna invazija, klinički stadij bolesti, doživljenje, tip operacije)
3. Usporediti izraženost NY-ESO1 s kliničko-patološkim parametrima (dob, spol, veličina tumora, histološki tip, perineuralna invazija, limfokapilarna invazija, klinički stadij bolesti, doživljenje, tip operacije)

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Bolesnici**

Provedeno je presječno istraživanje s retrospektivno prikupljenim materijalom i podacima u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju te u Klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Istraživanje uključuje 57 bolesnika s dijagnozom karcinoma žučnog mjehura u Klinici za kirurgiju KBC Sestre milosrdnice u razdoblju između 01. siječnja 2003. godine i 31. prosinca 2018. godine. Svi relevantni klinički podaci o bolesnicima preuzeti su iz medicinske dokumentacije i arhive Klinike za kirurgiju (dob, spol, stadij, doživljenje). Svaki bolesnik dobio je jedinstveni identifikacijski broj, a pravi identitet ispitanika, radi zaštite osobnih podataka bolesnika, poznat je samo glavnom istraživaču.

Za analizu izraženosti istraživanih proteina, PD-L1 i NY-ESO1, korišten je arhivski materijal karcinoma žučnog mjehura uklopljen u parafinske blokove koji je pohranjen na Zavodu za patologiju i citologiju KBC-a Sestre milosrdnice.

U istraživanju je praćeno doživljenje bolesnika do progresije bolesti ili smrtnog ishoda. Obzirom da su do kraja istraživanja svi bolesnici umrli, podaci o ukupnom doživljenju bolesnika dobiveni su iz baze podataka Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“, odnosno iz Registra za rak pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo. Zadnja provjera učinjena je 31. prosinca 2021. godine.

### **4.2. Metode**

Pregledom baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju izdvojen je popis bolesnika koji zadovoljavaju kriterije istraživanja. Za svakog bolesnika analizirani su svi histološki preparati bojeni hemalaun-eozinom kako bi se odabrao reprezentativan parafinski blok za dodatnu imunohistokemijsku analizu te je odabrano 57 uzoraka.

Od svakog odabranog parafinskog bloka izrezana su po dva reza debljine 3-5  $\mu\text{m}$ , po jedan za dodatnu imunohistokemijsku analizu na PD-L1 i NY-ESO1.

Postupak deparafiniranja tkiva i demaskiranja antigena te imunohistokemijskog bojenja na oba

istraživana proteina provedeni su u potpuno automatiziranom uređaju za imunohistokemijsko bojenje Ventana BenchMark<sup>®</sup>.

Za dokazivanje izraženosti proteina PD-L1 korišteno je zečje monoklonsko primarno protutijelo na PD-L1 (klon SP142; Ventana, Mannheim, Germany), razrijeđeno od proizvođača (engl. *ready to use*), a kao pozitivnu kontrolu koristili smo tkivo tonzile, prema preporuci proizvođača.

Za dokazivanje izraženosti proteina NY-ESO1 korišteno je mišje monoklonsko protutijelo na NY-ESO1 (cat. no. 356200; Thermo Fisher Scientific, Inc; razrjeđenje 1:200). Kao pozitivna kontrola korišteno je tkivo testisa, prema preporuci proizvođača.

Nakon imunohistokemijskog bojenja sva su stakla pregledana pod povećanjem od 40x te je određena izraženost istraživanih proteina, nakon koje su uzorci svrstani u dvije skupine:

1. Negativna reakcija
2. Pozitivna reakcija

Za kategorizaciju u skupinu negativna/pozitivna imunohistokemijska reakcija korišteni su sljedeći kriteriji:

- a) Pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom na PD-L1 u imunološkim stanicama smatrana je prisutna citoplazmatska reakcija bilo kojeg intenziteta u  $\geq 1$  % imunoloških stanica infiltriranih u području tumora ili smještenih u peritumorskoj zoni (22).
- b) Pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom na PD-L1 u tumorskim stanicama smatrana je prisutna citoplazmatska ili membranska reakcija bilo kojeg intenziteta u  $\geq 5$  % tumorskih stanica (22).
- c) Pozitivnom reakcijom na NY-ESO1 smatrano je svako citoplazmatsko ili nuklearno bojenje bilo kojeg intenziteta prisutno u  $\geq 50$  % tumorskih stanica (31,32).

### **4.3. Statistička analiza**

Analizom snage testa za  $\chi^2$  test s pretpostavljenim učinkom veličine od 0,5 razinom značajnosti od 0,05 te jednim stupnjem slobode, za snagu testa od 95 % bilo je potrebno najmanje 52 bolesnika. Analiza je provedena programom G\*Power for Windows, verzija 3.1.3 (<http://www.psych.uniduesseldorf.de/aap/projects/gpower/>).

Inicijalno je učinjena opisna statistika, a podaci su prikazani tablično i grafički. Normalnost distribucije numeričkih varijabli analizirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Većina numeričkih varijabli nije pratila normalnu distribuciju te su kontinuirane varijable izražene medijanom i interkvartilnim rasponom (25 % - 75 %), a uspoređene su Mann-Whitney, odnosno Kruskal-Wallisovim testom. Kategoričke varijable su uspoređene hi-kvadrat testom uz Yatesovu korekciju te Fisherovim egzaktnim testom.

Krivulje doživljenja su kreirane po Kaplan-Meieru, a razlike između pojedinih skupina su uspoređene Log-Rank testom.

Povezanost pojedinih parametara utvrđena je Spearmanovom analizom korelacija. Snaga korelacije određena je koeficijentom korelacije  $r_s$ , pri čemu je korelacija umjerene snage u rasponu koeficijenta od 0,20 do 0,50 a jake snage za sve  $r_s$  vrijednosti veće od 0,5.

Analiza povezanosti pojedinih parametara s doživljenjem učinjena je Coxovom regresijom. Višestruka regresija je korištena u svim oblicima regresijske analize kako bi se utvrdilo postoji li neovisna povezanost s ishodom, odnosno kako bi se učinila korekcija za ometajuće čimbenike. Prilikom izvođenja višestruke regresije korišten je model postepene retrogradno uvjetovane regresije (eng. *backward stepwise conditional regression*).

Dobiveni podaci statistički su obrađeni upotrebom statističkog programa Statistika 13, StatSoft (Tulsa, USA), Ver. 13.5.0.17 licenca AHN903D046305CNET5-B s razinom statističke značajnosti od  $P < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

Iz dokumentacije dostupne u arhivi Klinike za kirurgiju KBC „Sestre milosrdnice“ uzeti su klinički i patohistološki podaci 57 bolesnika s karcinomom žučnog mjehura koji su operirani u istoj ustanovi (Tablica 2).

Kliničkim pregledom u 43,9 % bolesnika postavljena je dijagnoza karcinoma dok je više od polovine bolesnika (56,1 %) hospitalizirano i kirurški liječeno zbog simptoma kolecistitisa i kolelitijaze. U 17 bolesnika provedena je endokolecistektomija, u 23 bolesnika klasična kolecistektomija dok je 17 bolesnika imalo složeniju operaciju s anastomozama, resekcijom jetre ili Whipple operacijom. Uočili smo da su bolesnici kirurški liječeni zbog akutnog kolecistitisa češće dijagnosticirani u ranijem kliničkom stadiju karcinoma žučnog mjehura. Prema kliničkom stadiju bolesti više od polovine bolesnika (56,1 %) bilo je u stadiju III i IV.

Gotovo svi karcinomi bili su pankreatobilijarnog histološkog tipa dok je po jedan bio intestinalnog i slabo kohezivnog tipa. Najzastupljeniji je histološki gradus II (59,7 %) s medijanom veličine tumora od 25 mm (u rasponu od 10 mm do 105 mm) (Tablica 2). Kod 28 bolesnika nepoznat je patološki stadij zahvaćenosti limfnih čvorova (pN) tako da je zapravo u 22/29 slučajeva N stadij bio pozitivan.

Medijan dobi bolesnika uključenih u istraživanje je 72 godine, a pretežno su bile žene (70,2 %) koje su bile i nešto starije od muškaraca (medijan 75 vs. 68,5 godina). U trenutku završetka istraživanja svi su bolesnici preminuli, a 67,2 % bolesnika je preminulo unutar 12 mjeseci od postavljanja dijagnoze (Tablica 2).

Tablica 2. Kliničko-patološke karakteristike 57 bolesnika s karcinomom žučnog mjehura

<b>Karakteristika</b>	<b>Broj slučajeva (%)</b>	
Dob (godine)	medijan 72 (46-92)	
Spol	Muškarci	17 (29,8)
	Žene	40 (70,2)
Klinička dijagnoza	Kolelitijaza	12 (21,0)
	Akutni kolecistitis	13 (22,8)
	Kronični kolecistitis	7 (12,3)
	Karcinom	25 (43,9)
Klinički stadij	I	7 (12,3)
	IIA	15 (26,3)
	IIB	3 (5,3)
	IIIA	7 (12,3)
	IIIB	8 (14,0)
	IV	17 (29,8)
Veličina tumora (n=38)	≤ 20 mm	19 (50)
	> 20 mm	19 (50)
	nepoznato	19
Histološki tip	Pankreatobilijarni	55 (96,6)
	Intestinalni	1 (1,7)
	Slabo kohezivni	1 (1,7)
Histološki gradus	I	8 (14,0)
	II	34 (59,7)
	III	15 (26,3)
Patološki T stadij	1	7 (12,3)
	2	25 (43,9)
	3	24 (42,1)
	4	1 (1,7)
Patološki N stadij (n=29)	0	7 (24,1)
	1	22 (75,9)
	nepoznato	28
Perineuralna invazija	Ne	16 (28,1)
	Da	41 (71,9)
Limfovaskularna invazija	Ne	32 (56,21)
	Da	25 (43,9)



Spearmanova analiza korelacije kliničko-patoloških karakteristika karcinoma žučnog mjehura prikazana u Tablici 3 pokazuje da su karcinomi dubljeg prodora (viši pT) češći kod starijih bolesnika ( $r_s = 0,342$ ;  $P = 0,009$ ) te su u korelaciji s višim kliničkim stadijem bolesti ( $r_s = 0,480$ ;  $P < 0,001$ ). Primjećujemo također da su karcinomi dijagnosticirani u žena bili nešto veći nego u muškaraca (medijan 30 mm vs. 20 mm) ( $r_s = 0,271$ ;  $P = 0,045$ ).

Status zahvaćenosti limfnih čvorova poznat je u 29 bolesnika, od čega je pozitivan u 22 bolesnika. Spearmanovom analizom utvrdili smo korelaciju zahvaćenosti limfnih čvorova i prisutne perineuralne invazije u tumoru ( $r_s = 0,421$ ;  $P = 0,029$ ) te tendenciju ka statistički značajnoj korelaciji s kliničkim stadijem bolesti ( $r_s = 0,335$ ;  $P = 0,076$ ).

U konačnici, klinički stadij bolesti u korelaciji je s histološkim gradusom karcinoma ( $r_s = 0,420$ ;  $P = 0,001$ ) te prisutnom perineuralnom ( $r_s = 0,491$ ;  $P < 0,001$ ) i limfovaskularnom invazijom ( $r_s = 0,272$ ;  $P = 0,049$ ).

Tablica 3. Spearmanova analiza međusobnih korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma žučnog mjehura

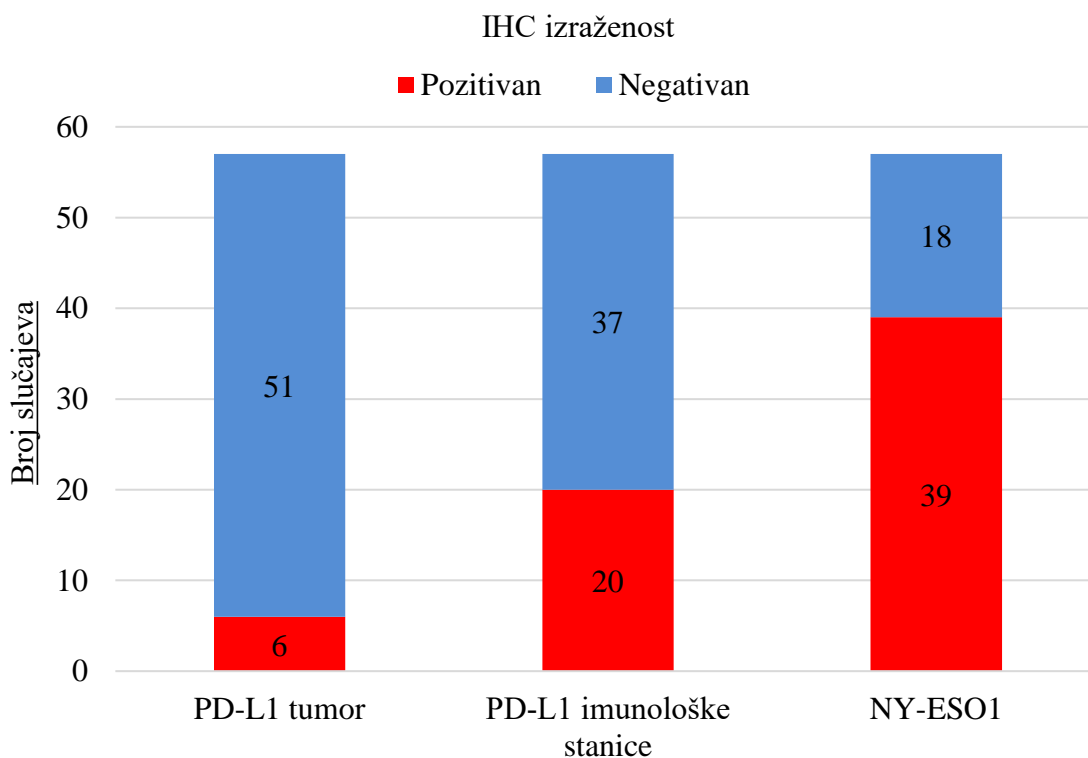
Karakteristika	Spol	Veličina tumora	pT	pN	Histološki gradus	Perineuralna invazija	Limfokapilarna invazija	Klinički stadij	
<b>Dob bolesnika</b>	$r_s$	- 0,161	- 0,017	<b>0,342</b>	0,128	- 0,156	0,054	0,149	0,127
	P	0,228	0,922	<b>0,009</b>	0,517	0,250	0,694	0,278	0,351
<b>Spol bolesnika</b>	$r_s$		- 0,298	- 0,01	- 0,012	0,177	0,033	<b>- 0,271</b>	- 0,107
	P		0,082	0,943	0,949	0,188	0,813	<b>0,045</b>	0,430
<b>Veličina tumora</b>	$r_s$			- 0,061	- 0,133	0,078	0,158	0,326	0,065
	P			0,730	0,599	0,658	0,366	0,056	0,715
<b>pT</b>	$r_s$				0,052	0,05	0,102	- 0,091	<b>0,480</b>
	P				0,789	0,71	0,460	0,509	<b>&lt; 0,001</b>
<b>pN</b>	$r_s$					0,254	<b>0,421</b>	0,019	0,335
	P					0,193	<b>0,029</b>	0,925	0,076
<b>Histološki gradus</b>	$r_s$						0,22	- 0,074	<b>0,420</b>
	P						0,107	0,589	<b>0,001</b>
<b>Perineuralna invazija</b>	$r_s$							<b>0,543</b>	<b>0,491</b>
	P							<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Limfovaskularna Invazija</b>	$r_s$								<b>0,272</b>
	P								<b>0,049</b>

$r_s$ , koeficijent korelacije; P, p-vrijednost; pT – patološki T stadij – odnosi se na dubinu prodora karcinoma; pN, patološki N stadij - odnosi se na zahvaćenost limfnih čvorova

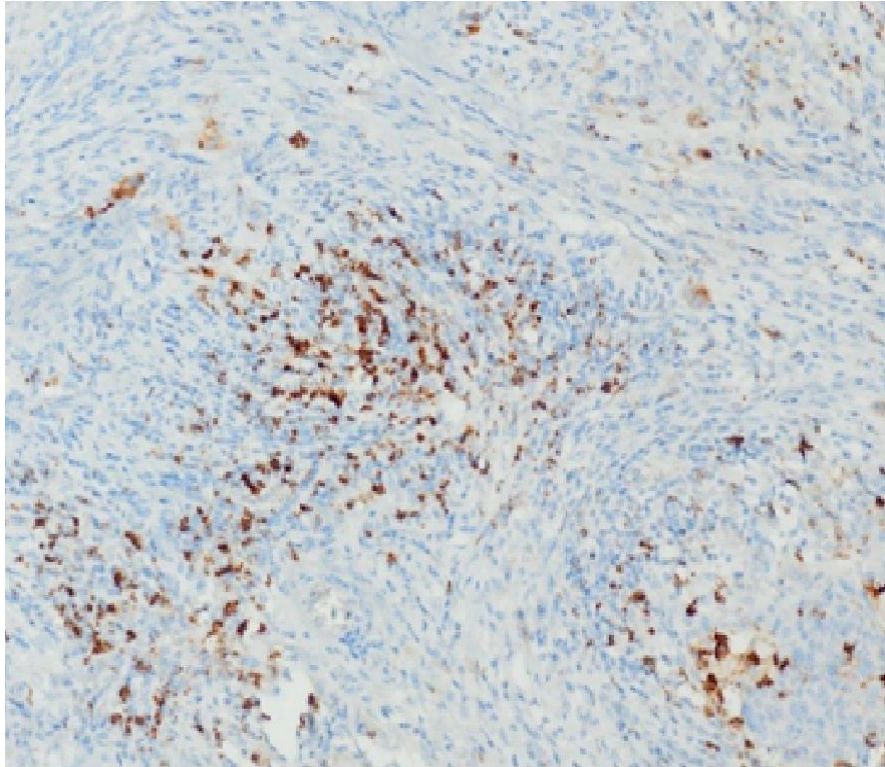
## 5.1. Imunohistokemijska izraženost PD-L1 i NY-ESO1

Imunohistokemijska izraženost PD-L1 u imunološkim stanicama koje infiltriraju područje karcinoma zabilježena je u 20 slučajeva (35,1 %) dok je izraženost PD-L1 u samim tumorskim stanicama zabilježena u 6 slučajeva (10,5 %) (Slika 9). Ukupno je PD-L1 izražen u 26 slučajeva (45,6 %) karcinoma žučnog mjehura.

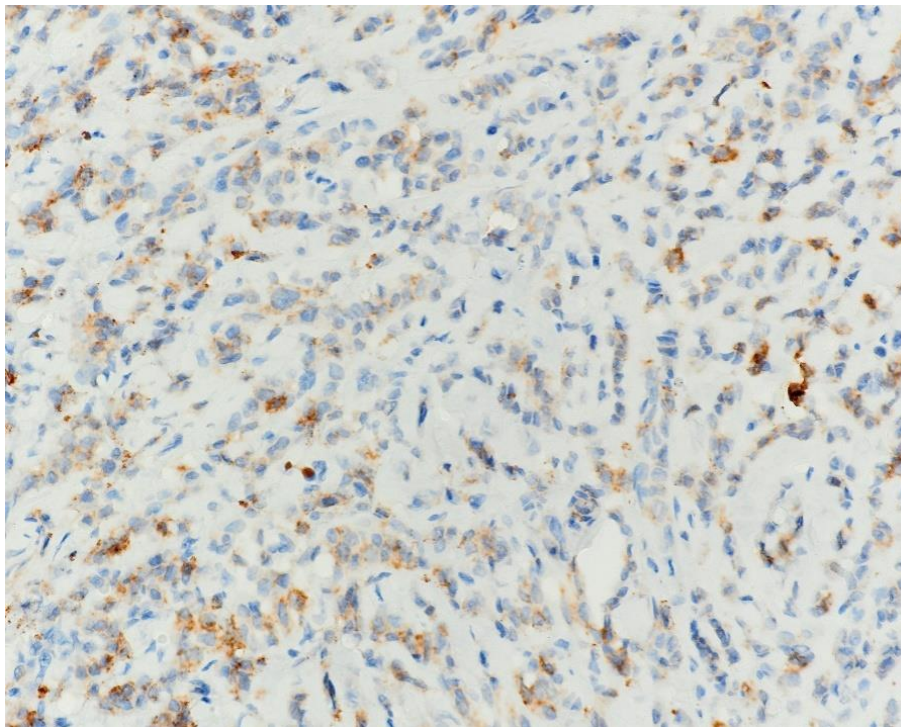
Izraženost NY-ESO1 u tumorskim stanicama zabilježena je u 39 slučajeva (68,4 %) (Slika 9). Na Slikama 10, 11 i 12 vidljivi su primjeri imunohistokemijske izraženosti istraživanih proteina.



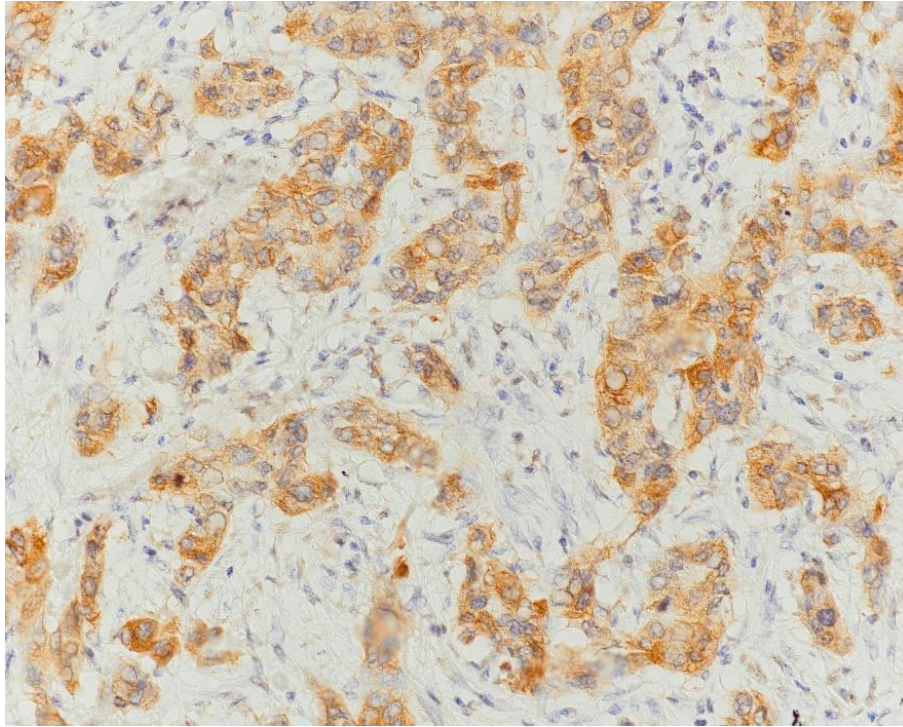
Slika 9. Prikaz imunohistokemijske izraženosti (IHC) PD-L1 u tumorskim i imunološkim stanicama karcinoma žučnog mjehura te NY-ESO1 u tumorskim stanicama.



Slika 10. Imunohistokemijska izraženost PD-L1 u imunološkim stanicama infiltriranim u područje tumora, x200.



Slika 11. Imunohistokemijska izraženost PD-L1 u tumorskim stanicama, x400.



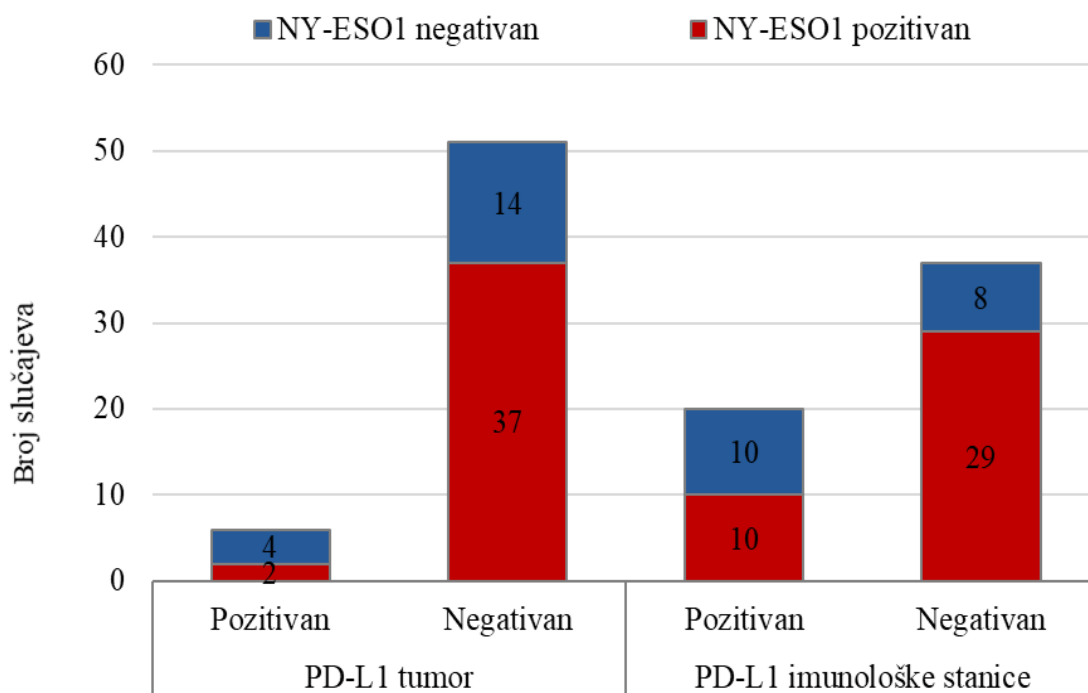
Slika 12. Imunohistokemijska izraženost NY-ESO1 u tumorskim stanicama, x400.

Istovremena izraženost NY-ESO1 i PD-L1 zabilježena je u 12 slučajeva (21,1 %). Od 39 slučajeva u kojima tumorske stanice izražavaju NY-ESO1, istovremena ekspresija PD-L1 u imunološkim stanicama zabilježena je u 10 slučajeva (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,038$ ), a u tumorskim stanicama samo u 2 slučaja (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,072$ ) (Slika 13).

S druge strane, kod NY-ESO1-negativnih karcinoma, PD-L1 je bio izražen u tumorskim stanicama u 4 slučaja i u imunološkim stanicama u 10 slučajeva.

Samo šest karcinoma (10,4 %) ne izražava niti jedan od proteina dok jedan karcinom izražava sva tri proteina. U 27 slučajeva (47,4 %) karcinomi izražavaju samo NY-ESO1.

Spearmanova analiza korelacija pokazala je statistički značajnu negativnu korelaciju izraženosti NY-ESO1 i PD-L1 u imunološkim stanicama ( $r_s = - 0,313$ ;  $P = 0,021$ ), te u tumorskim stanicama ( $r_s = - 0,271$ ;  $P = 0,045$ ).



Slika 13. Raspodjela imunohistokemijske izraženosti PD-L1 u tumorskim i imunološkim stanicama u odnosu na izraženost NY-ESO1 (negativan/pozitivan) u tumoru. Statistički značajna razlika izraženosti NY-ESO1 ovisno o statusu PD-L1 u imunološkim stanicama (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,038$ )

### 5.1.1. PD-L1 i NY-ESO1 i kliničko-patološke karakteristike

Odnos izraženosti PD-L1 u imunološkim stanicama infiltriranim u područje tumora prema kliničkim i patohistološkim karakteristikama bolesnika s karcinomom žučnog mjehura prikazan je u Tablici 4. Pozitivan status PD-L1 statistički značajno češće je zabilježen u slučaju prisutne perineuralne invazije ( $P = 0,005$ ). Iako bez statističke značajnosti ( $P = 0,067$ ) PD-L1 je češće pozitivan u slučaju kliničkog stadija IV (45 %) nego kliničkih stadija II i III (30 % i 25 %), a uopće nije pozitivan u karcinomima kliničkog stadija I. Pozitivan PD-L1 je češće izražen u karcinomima višeg histološkog gradus III ( $P = 0,063$ ) i s pozitivnim limfnim čvorovima ( $P = 0,093$ ), ali također bez statističke značajnosti.

Prilikom postavljanja dijagnoze nema statistički značajne razlike u izraženosti PD-L1 između benignih i malignih stanja ( $P = 0,387$ ), a PD-L1 ne pokazuje statistički značajnu razliku izraženosti niti prema ostalim kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma.

Tablica 4. Status izraženosti proteina PD-L1 u imunološkim stanicama infiltriranim u područje tumora prema kliničkim i patološkim karakteristikama bolesnika s karcinomom žučnog mjehura

Karakteristika		PD-L1 pozitivan N (%)	PD-L1 negativan N (%)	(P)
Spol	Muškarci	6 (30,0)	10 (27,0)	$X^2 = 0,01$ $P = 0,944$
	Žene	14 (70,0)	27 (73,0)	
Klinička dijagnoza	Kolelitijaza	5 (25,0)	7 (18,9)	$P = 0,387^*$
	Akutni kolecist.	2 (10,0)	11 (8,9)	
	Kronični kolecist.	3 (15,0)	4 (10,8)	
	Karcinom	10 (50,0)	15 (40,5)	
Klinički stadij	I	0 (0)	7 (18,9)	$P = 0,067^*$
	IIA/B	6 (30,0)	13 (35,2)	
	IIIA/B	5 (25,0)	10 (27,0)	
	IV	9 (45,0)	7 (18,9)	
Veličina tumora (n = 38)	$\leq 20$ mm	9 (60,0)	10 (43,5)	$X^2 = 0,79$ $P = 0,374$
	$> 20$ mm	6 (40,0)	13 (56,5)	
Histološki gradus	I	0 (0)	8 (21,6)	$P = 0,063^*$
	II	13 (65,0)	21 (56,8)	
	III	7 (35,0)	8 (21,6)	
Patološki T stadij	1	0 (0)	6 (16,2)	$P = 0,182^*$
	2	10 (50,0)	17 (46,0)	
	3/4	10 (50,0)	14 (37,8)	
Patološki N stadij (n = 29)	0	1 (8,3)	6 (37,5)	$P = 0,093^*$
	1	12 (92,3)	10 (62,5)	
Perineuralna invazija	Ne	1 (10,0)	15 (43,2)	<b><math>P = 0,005^*</math></b>
	Da	19 (90,0)	22 (56,8)	
Limfovaskularna invazija	Ne	11 (60,0)	21 (59,5)	$X^2 = 0,02$ $P = 0,898$
	Da	9 (40,0)	16 (40,5)	

$X^2$ , hi-kvadrat test; P, p-vrijednost; \* Fisherov egzaktni test; pT – patološki T stadij dubine prodora karcinoma; pN, patološki N stadij zahvaćenosti limfnih čvorova

Izraženost NY-ESO1 u tumorskim stanicama ne pokazuje statistički značajnu razliku ovisno o kliničkim i patološkim karakteristikama karcinoma žučnog mjehura (Tablica 5). Nije primijećena razlika izraženosti NY-ESO1 niti po dobi oboljenja (medijan dobi bolesnika s NY-ESO1 pozitivnim karcinomima je 72 godine, a s NY-ESO1 negativnim je 72,5 godine).

Tablica 5. Status izraženosti proteina NY-ESO1 prema kliničkim i patološkim karakteristikama bolesnika s karcinomom žučnog mjehura

<b>Karakteristika</b>		<b>NY-ESO1 pozitivan N (%)</b>	<b>NY-ESO1 negativan N (%)</b>	<b>P</b>
Spol	Muškarci	12 (30,8)	5 (27,8)	$X^2 = 0,01$ P = 0,935
	Žene	27 (69,2)	13 (72,2)	
Klinička dijagnoza	Kolelitijaza	9 (23,1)	4 (22,2)	P = 0,792*
	Akutni kolecist.	8 (20,5)	4 (22,2)	
	Kronični kolecist.	6 (15,4)	1 (5,6)	
	Karcinom	16 (41,0)	9 (50,0)	
Klinički stadij	I	4 (10,3)	3 (16,7)	P = 0,645*
	IIA/B	15 (39,5)	4 (22,2)	
	IIIA/B	10 (25,6)	5 (27,8)	
	IV	10 (25,6)	6 (33,3)	
Veličina tumora (n = 38)	≤ 20 mm	12 (46,2)	6 (50,0)	$X^2 = 0,05$ P = 0,825
	> 20 mm	14 (53,8)	6 (50,0)	
Histološki gradus	I	6 (15,4)	2 (11,1)	P = 0,993*
	II	23 (59,0)	11 (61,1)	
	III	10 (25,6)	5 (27,8)	
Patološki T stadij	1	3 (7,8)	3 (16,7)	P = 0,151*
	2	21 (53,8)	5 (27,8)	
	3/4	15 (38,4)	10 (55,5)	
Patološki N stadij (n = 29)	0	4 (22,2)	3 (27,3)	$X^2 = 0,02$ P = 0,889
	1	14 (77,8)	8 (72,7)	
Perineuralna invazija	Ne	11 (28,2)	5 (27,8)	$X^2 = 0,01$ P = 0,97
	Da	29 (74,3)	13 (72,2)	
Limfovaskularna invazija	Ne	20 (51,3)	12 (66,7)	$X^2 = 0,641$ P = 0,423
	Da	19 (48,7)	6 (33,3)	

$X^2$ , hi-kvadrat test; P, p-vrijednost; \* Fisherov egzaktni test; pT – patološki T stadij dubine prodora karcinoma; pN, patološki N stadij zahvaćenosti limfnih čvorova



U većini analiziranih kliničko-patoloških značajki karcinoma žučnog mjehura nema statistički značajne razlike istraživanih proteina te je učinjena dodatna Spearmanova analiza korelacija (koeficijent korelacije  $r_s$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Analiza korelacija izraženosti proteina PD-L1 i NY-ESO1 s kliničkim i patološkim karakteristikama karcinoma žučnog mjehura

Karakteristika		PD-L1 Imunološke stanice	PD-L1 Tumorske stanice	NY-ESO1
Dob bolesnika	$r_s$	0,099	0,043	-0,094
	P	0,472	0,759	0,493
Spol bolesnika	$r_s$	0,046	0,047	0,056
	P	0,737	0,729	0,683
Veličina tumora	$r_s$	-0,229	-0,027	0,077
	P	0,185	0,877	0,658
pT	$r_s$	0,066	-0,236	<b>0,267</b>
	P	0,629	0,082	<b>0,049</b>
pN	$r_s$	0,359	-0,156	0,025
	P	0,066	0,445	0,899
Histološki gradus	$r_s$	0,24	<b>0,303</b>	-0,034
	P	0,077	<b>0,024</b>	0,805
Perineuralna invazija	$r_s$	<b>0,318</b>	-0,033	-0,082
	P	<b>0,018</b>	0,812	0,552
Limfovaskularna invazija	$r_s$	-0,028	-0,061	0,168
	P	0,839	0,662	0,219
Klinički stadij	$r_s$	<b>0,339</b>	-0,088	0,124
	P	<b>0,013</b>	0,529	0,375

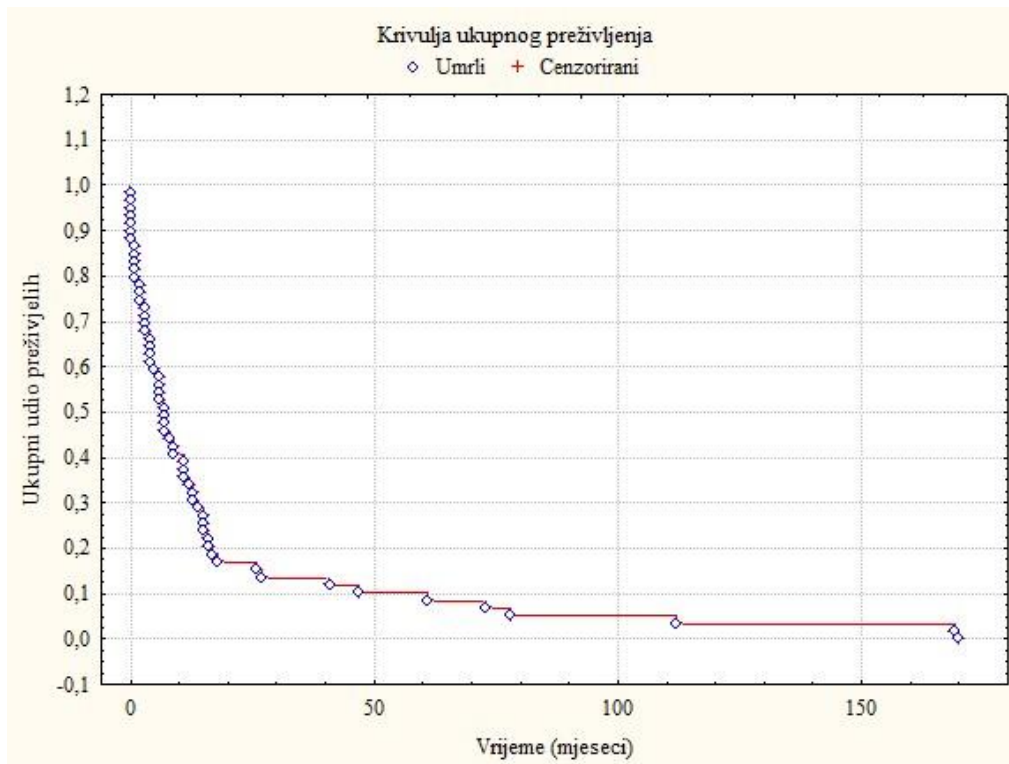
$r_s$ , koeficijent korelacije; P, p-vrijednost

Spearmanovom analizom korelacija utvrdili smo statistički značajnu korelaciju izraženost PD-L1 u imunološkim stanicama s višim kliničkim stadijem bolesti ( $r_s = 0,339$ ;  $P = 0,013$ ). Izraženost PD-L1 u imunološkim stanicama značajno je korelirala s perineuralnom invazijom ( $r_s = 0,318$ ;  $P = 0,018$ ), dok korelacija s pozitivnim limfnim čvorovima nije statistički značajna ( $r_s = 0,359$ ;  $P = 0,066$ ). Također je utvrđena značajna korelacija višeg histološkog gradusa s izraženošću PD-L1 u tumorskim stanicama ( $r_s = 0,303$ ;  $P = 0,024$ ), ali ne i s izraženošću PD-L1 u imunološkim stanicama ( $r_s = 0,240$ ;  $P = 0,077$ ).

Istom analizom nije utvrđena statistički značajna korelacija NY-ESO1 s drugim kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma žučnog mjehura, osim dubine prodora (pT) ( $r_s = 0,267$ ;  $P = 0,049$ ). Karcinomi koji ne izražavaju NY-ESO1 plice infiltriraju u stijenku žučnog mjehura. Tako karcinomi koji infiltriraju do mišićnog sloja stijenke žučnog mjehura (pT1) izražavaju protein NY-ESO1 u 50 % slučajeva dok karcinomi dubljeg prodora izražavaju NY-ESO1 u prosječno 70 % slučajeva (80 % pT2 i 60 % pT 3/4) (Fisherov egzaktni test  $P = 0,151$ ).

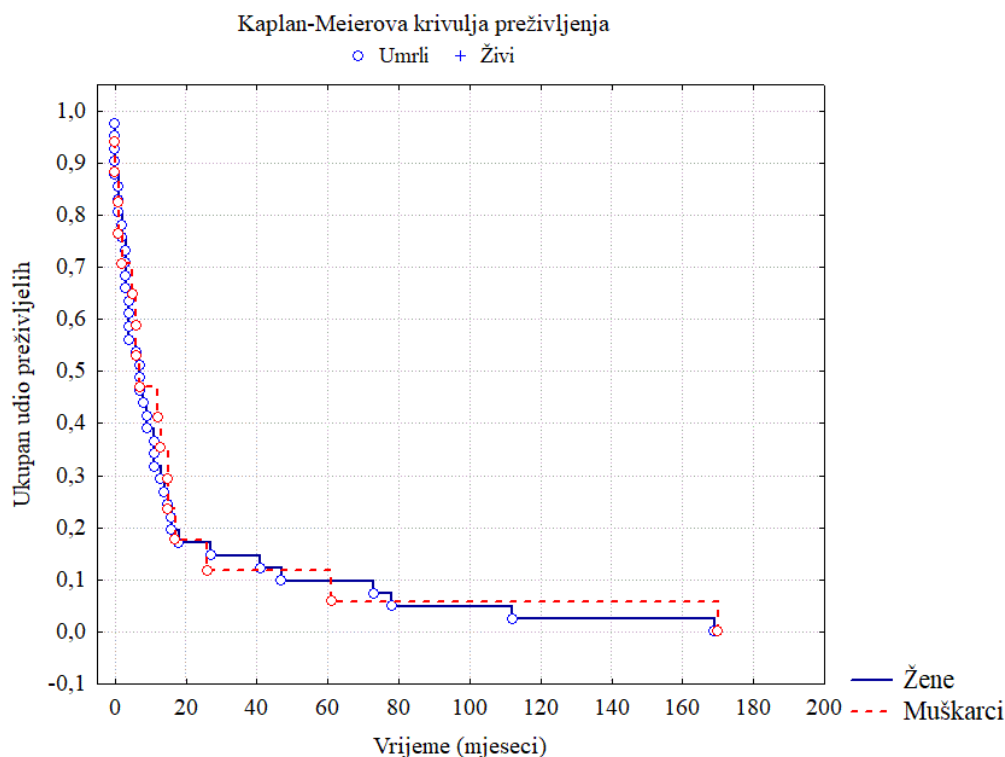
## 5.2. Doživljenje bolesnika

U trenutku završetka istraživanja svi su bolesnici preminuli. Prosječno vrijeme ukupnog doživljenja (engl. *overall survival*; OS) bilo je  $19 \pm 35,4$  mjeseca, ali je medijan bio 7 mjeseci te je 53,4 % bolesnika umrlo tijekom tog razdoblja (Slika 14). Unutar godinu dana od trenutka postavljanja dijagnoze umrlo je 65,5 % bolesnika. Stoga je petogodišnje doživljenje bolesnika dijagnosticiranih s karcinomom žučnog mjehura 10 %.



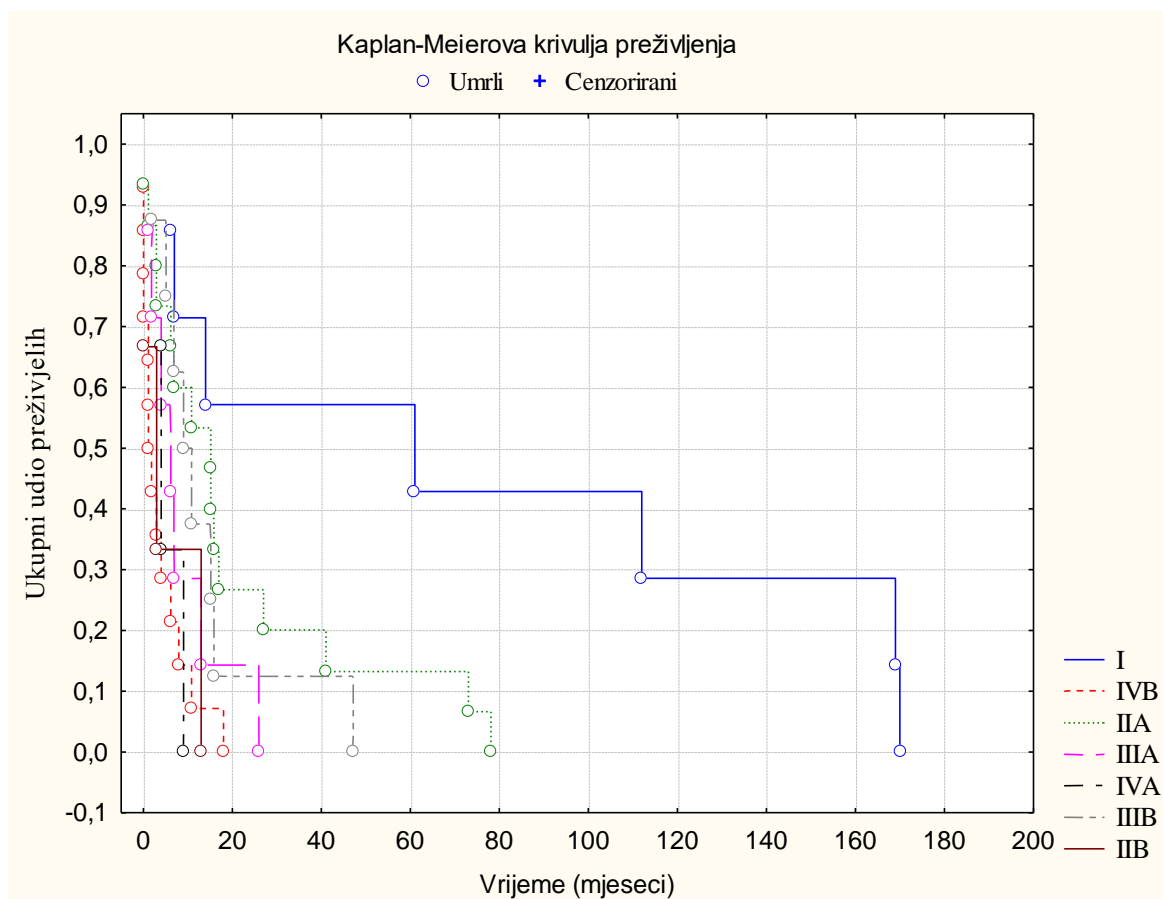
Slika 14. Kaplan-Meierova krivulja ukupnog doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura. Petogodišnje doživljenje iznosi 10 %, a većina bolesnika umrla je unutar 12 mjeseci od dijagnoze (medijan 7 mjeseci)

Iako su 70,2 % bolesnica bile žene, nije primjećena statistički značajna razlika u vremenu ukupnog doživljenja između žena i muškaraca (Log-Rank =0,44; P = 0,661) (Slika 15).



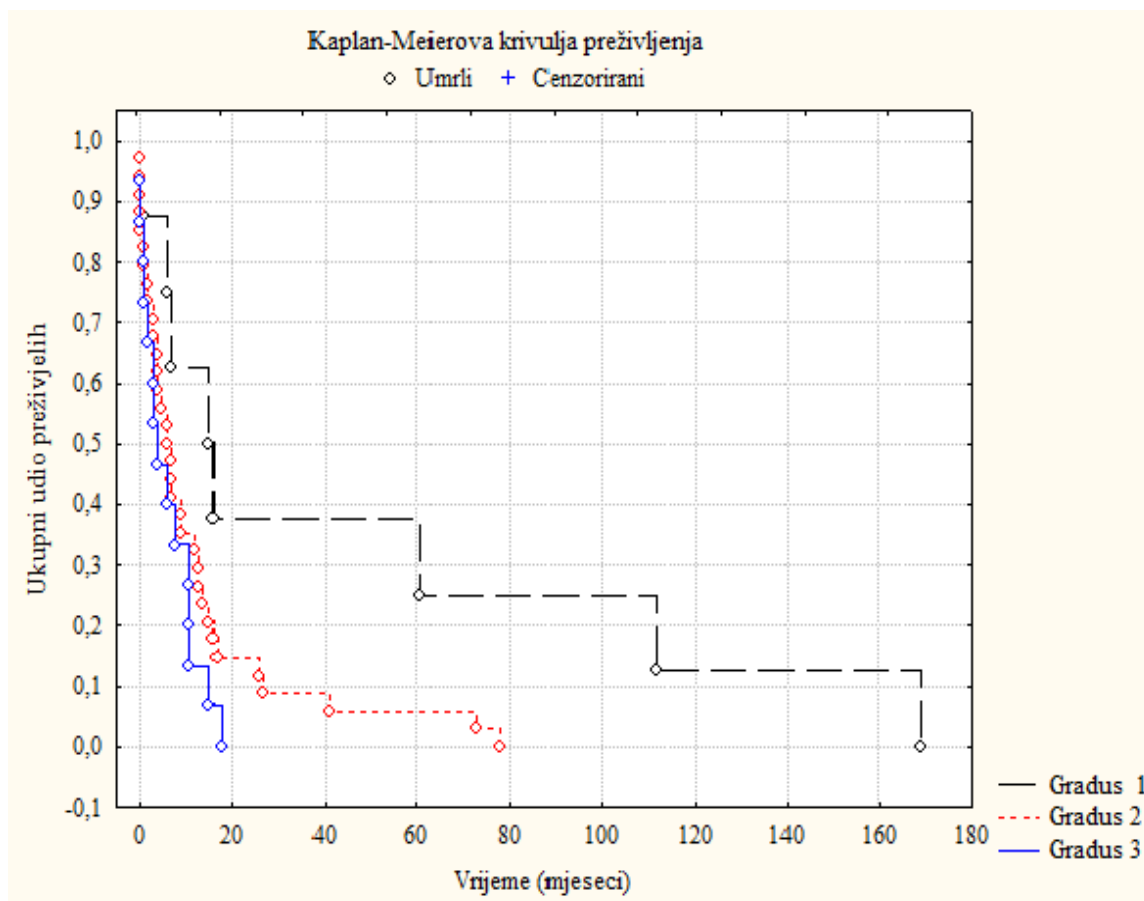
Slika 15. Kaplan-Meierova krivulja doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura prema spolu. Iako je bolesnica bilo 2 puta više nego bolesnika nije utvrđena razlika u ukupnom doživljenju ovisno o spolu (Log Rank 0,44; P = 0,661).

Prema kliničkom stadiju bolesti doživljenje je duže kod bolesnika dijagnosticiranih u nižim kliničkim stadijima bolesti (Log-Rank = 18,19; P = 0,006). Međutim, značajnije duže doživljenje zabilježeno je jedino u kliničkom stadiju I, kod svega 7 bolesnika (12,2 %) s medijanom ukupnog doživljenja od 61 mjesec i petogodišnjim doživljenjem od 42 % (Slika 16). Iako je u kliničkom stadiju IIA medijan doživljenja 15 mjeseci, ukupno petogodišnje doživljenje ostaje 10 %.



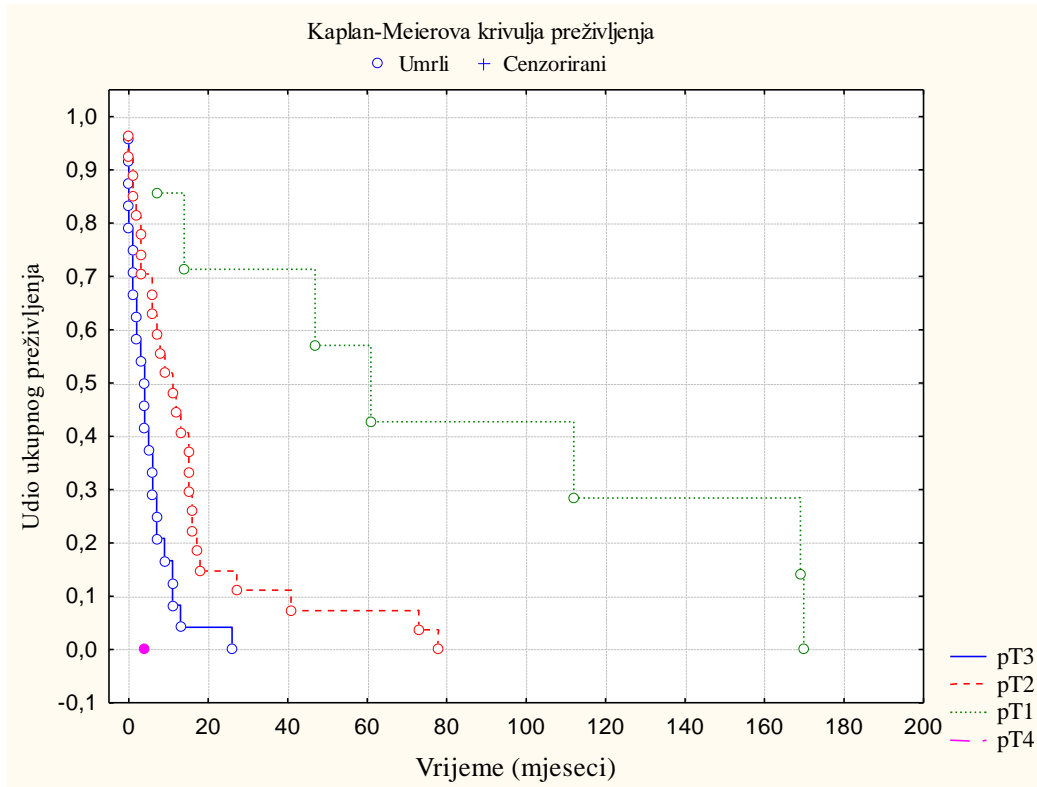
Slika 16. Kaplan-Meierova krivulja doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura prema kliničkom stadiju bolesti (Log-Rank =18,19; P = 0,006). Primjećujemo značajno bolje doživljenje bolesnika dijagnosticiranih u kliničkom stadiju I

Prema histološkom gradusu, ukupno doživljenje je nešto duže samo kod bolesnika dijagnosticiranih s karcinomima histološkog gradusa I čiji je medijan ukupnog preživljenja 15,5 mjeseci. Međutim, kako je riječ o samo osam bolesnika (sedam su žene) od kojih su tri preminula unutar 7 mjeseci od dijagnoze korelacija nije statistički značajna (Log-Rank = 5,15; P = 0,076) (Slika 17).



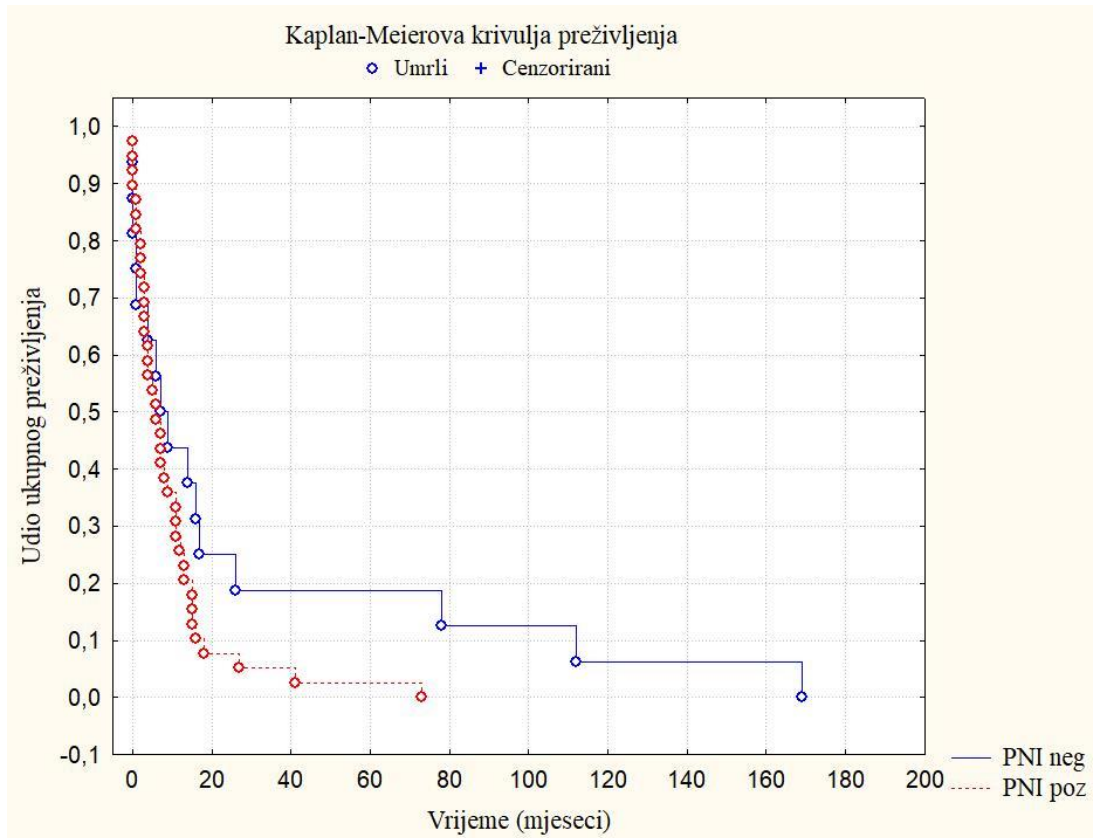
Slika 17. Kaplan-Meierova krivulja doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura prema histološkom gradusu tumora (Log-Rank = 5,15; P = 0,076). Bolesnici s karcinomom gradusa III nisu dostigli petogodišnje preživljenje.

Promatrajući dubinu prodora karcinoma u stijenku žučnog mjehura također bilježimo da samo u slučaju stadija pT1 bolesnici imaju bolje doživljenje. Kod tih bolesnika medijan doživljenja je 61 mjesec (Log-Rank = 18,28; P <0,001), a ukupno petogodišnje doživljenje je 42 % (Slika 18).



Slika 18. Kaplan-Meierova krivulja doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura prema patološkom T stadiju (dubina prodora tumora) (Log-Rank = 18,28;  $P < 0,001$ )

Statistički značajno bolje doživljenje nije postignuto u slučaju negativne perineuralne invazije (Log-Rank = 1,79;  $P = 0,073$ ) (Slika 19) kao niti negativne limfovaskularne invazije (Log-Rank = 0,998;  $P = 0,318$ ) (nije prikazano). Tako je medijan ukupnog doživljenja bolesnika bez detektirane perineuralne invazije bio 8 mjeseci, a u slučaju prisutne perineuralne invazije 7 mjeseci. U slučaju prisutne limfovaskularne invazije medijan ukupnog doživljenja bolesnika bio je 7 mjeseci, dok je u slučaju bez prisutne limfovaskularne invazije medijan doživljenja bio 7,5 mjeseci.



Slika 19. Kaplan-Meierova krivulja doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura prema statusu perineuralne invazije (Log-Rank = 1,79; P = 0,073).

Univarijatna Coxova regresijska analiza potvrđuje da su patološki stadij pT1 (P = 0,001), histološki gradus I (P = 0,021) i klinički stadij I (P = 0,005) povezani s duljim doživljenjem, no nakon multivarijatne analize niti jedna od uključenih patohistoloških karakteristika nije utvrđena kao neovisan prognostički čimbenik (Tablica 7).



Tablica 7. Analiza procjene neovisnih prognostičkih čimbenika lošijeg doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura (COXova regresija)

Karakteristika	Univarijatna					Multivarijatna				
	B	SE	Wald	Exp(B)	P	B	SE	Wald	Exp(B)	P
Dob	0,133	0,278	0,228	1,142	0,633					
SPOL	0,097	0,290	0,112	1,102	0,737					
pT	1,727	0,540	10,215	5,621	<b>0,001</b>	1,637	1,270	1,661	5,138	0,197
pN	0,646	0,469	1,895	1,908	0,169					
Gradus	1,027	0,445	5,336	2,792	<b>0,021</b>	0,288	0,538	0,287	1,334	0,592
Perineuralna inv.	0,541	0,328	2,712	1,717	0,100					
Limfokapilarna inv.	0,272	0,280	0,946	1,313	0,331					
Klinički stadij	1,522	0,540	7,955	4,581	<b>0,005</b>	-0,333	1,021	0,106	0,717	0,744

B, koeficijent regresije; SE, standardna pogreška koeficijenta; Wald, Wald test; Exp (B), omjer izgleda/rizika; P, p-vrijednost

### 5.1.2. Doživljenje bolesnika ovisno o izraženosti PD-L1 i NY-ESO1

Iako je prosječno vrijeme doživljenja bolesnika čiji karcinomi ne izražavaju PD-L1 u imunološkim stanicama bilo bolje od bolesnika čiji karcinomi izražavaju PD-L1 u imunološkim stanicama ( $17,5 \pm 34,1$  vs.  $11,2 \pm 15,8$ ) medijan doživljenja u obje skupine je 7 mjeseci.

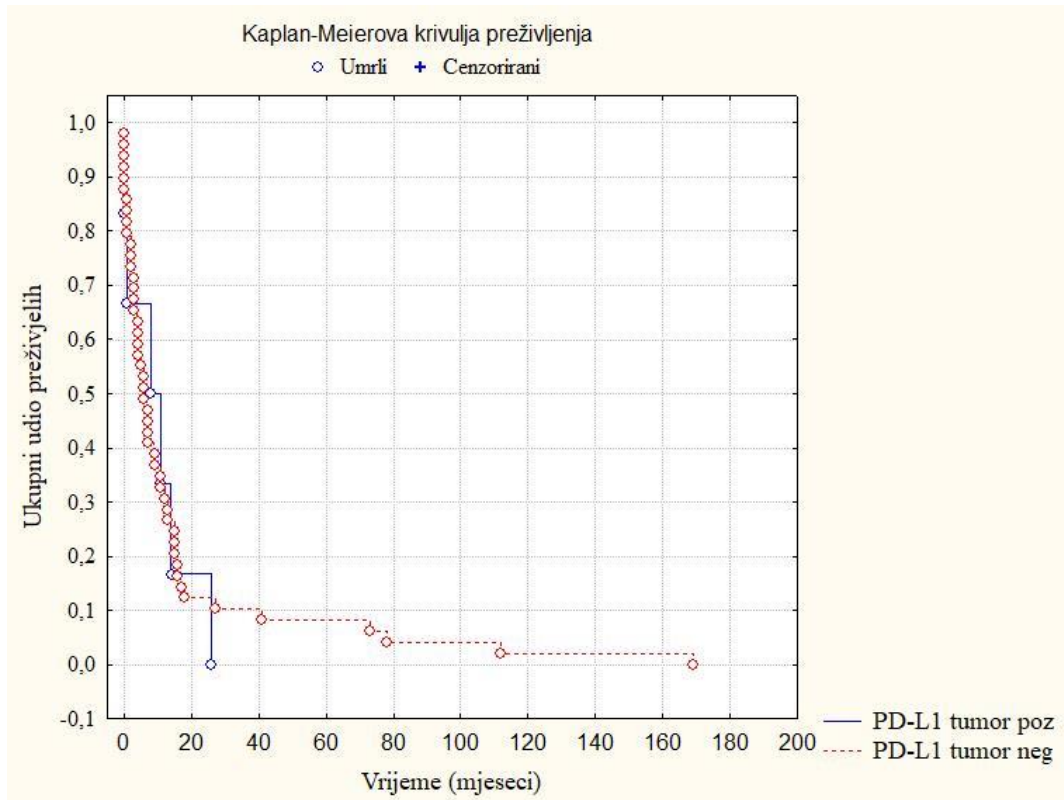
Isto tako, iako je prosječno vrijeme doživljenja bilo nešto bolje za bolesnike čiji karcinomi ne izražavaju protein NY-ESO1 od onih bolesnika čiji karcinomi izražavaju NY-ESO1 ( $18,3 \pm 38,4$  vs.  $13,9 \pm 23,5$ ) medijan vremena od dijagnoze do smrti u obje skupine bio je 7 mjeseci.

Promatrajući pojavnost smrti unutar 12 mjeseci od postavljanja dijagnoze u odnosu na izraženost PD-L1 u imunološkim i tumorskim stanicama kao i izraženost NY-ESO1 nismo utvrdili statistički značajnu razliku (Tablica 8).

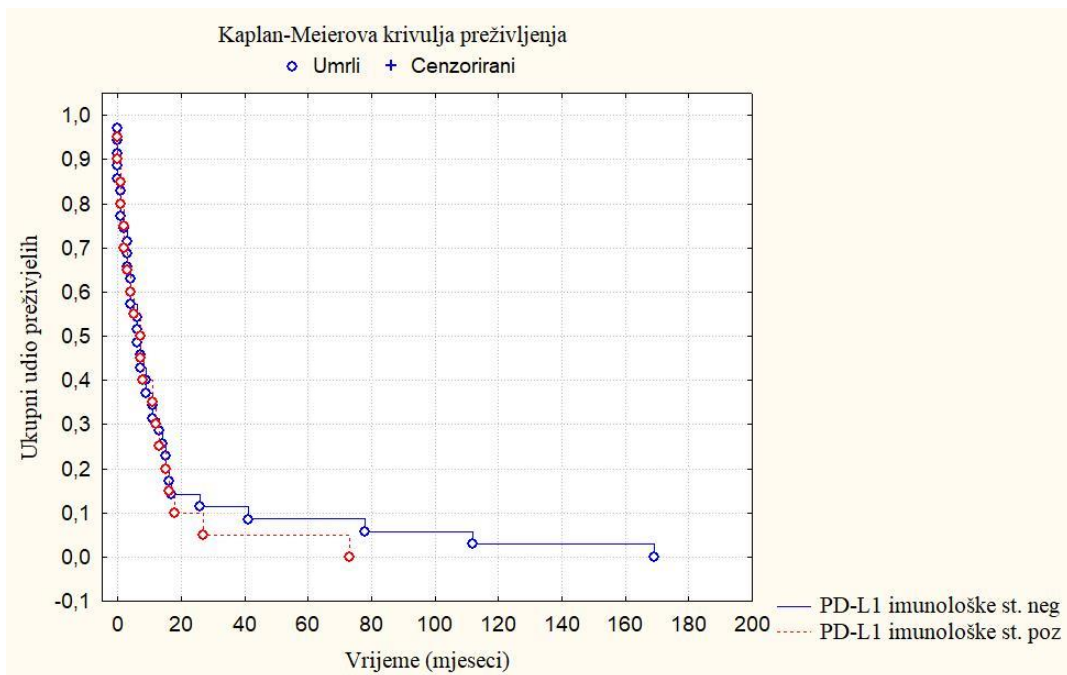
Tablica 8. Doživljenje bolesnika s karcinomom žučnog mjehura ovisno o izraženosti PD-L1 i NY-ESO1

<b>Protein</b>	<b>IHC status</b>	<b>Smrt unutar 12 mjeseci</b> N (%)	<b>Smrt nakon 12 mjeseci</b> N (%)	<b>X<sup>2</sup></b> <b>P</b>
PD-L1 imunološke stanice	Negativan	24 (64,9)	13 (35,1)	X <sup>2</sup> = 0,01 P = 0,922
	Pozitivan	14 (70,0)	6 (30,0)	
PD-L1 tumorske stanice	Negativan	34 (64,7)	18 (35,3)	X <sup>2</sup> = 0,13 P = 0,721
	Pozitivan	4 (66,7)	2 (33,3)	
NY-ESO1	Negativan	13 (72,2)	5 (27,8)	X <sup>2</sup> = 0,09 P = 0,762
	Pozitivan	25 (64,1)	14 (35,9)	

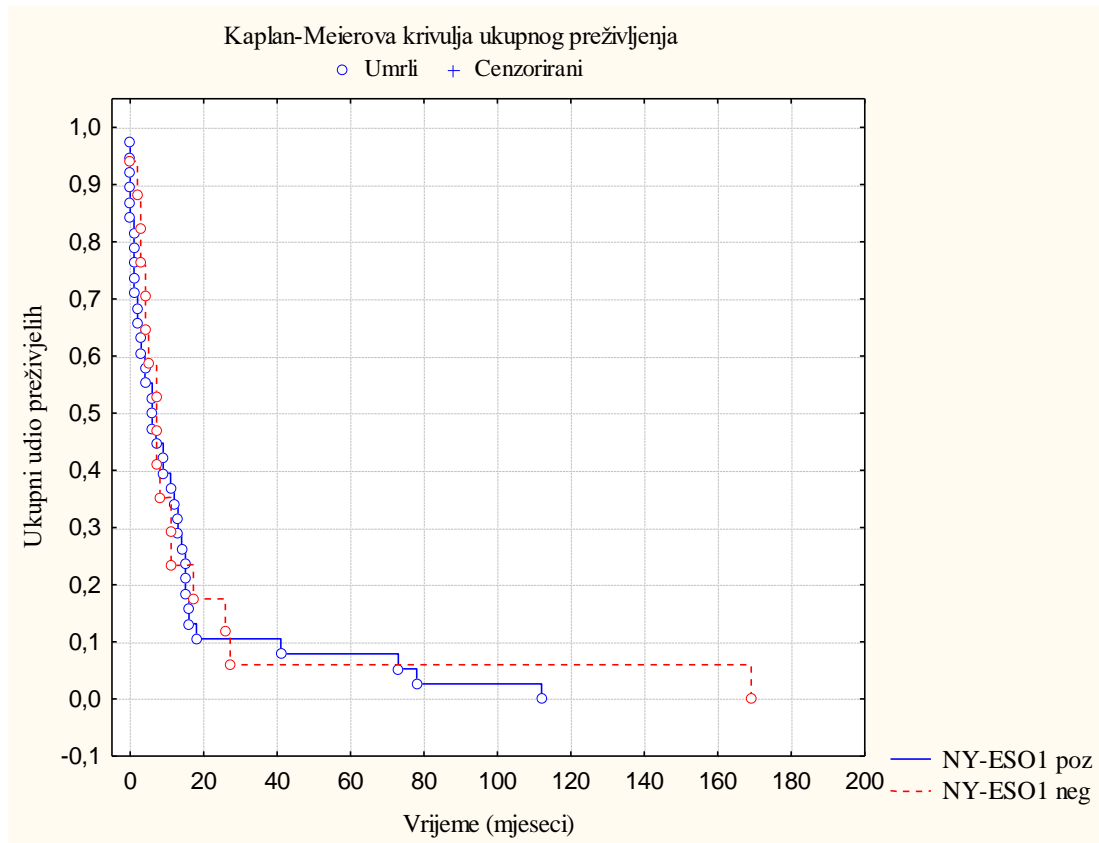
Kaplan-Meierove krivulje doživljenja ovisno o imunohistokemijskoj izraženosti istraživanih proteina PD-L1 i NY-ESO1 prikazane su na Slikama 20, 21 i 22. Nije utvrđeno statistički značajno bolje doživljenje u odnosu na izraženost istraživanih proteina.



Slika 20. Kaplan-Meierova krivulja ukupnog doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura ovisno o izraženosti PD-L1 u tumorskim stanicama (Log Rank 0,19; P = 0,854)



Slika 21. Kaplan-Meierova krivulja ukupnog doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura ovisno o izraženosti PD-L1 u imunološkim stanicama (Log Rank - 0,42; P = 0,676)



Slika 22. Kaplan-Meierova krivulja ukupnog doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura ovisno o izraženosti NY-ESO1 u tumorskim stanicama (Log Rank - 0,54; P = 0,592)

Coxova regresijska analiza također nije pokazala značajnu razliku u ukupnom doživljenju ovisno o izraženosti PD-L1 u tumorskim ili imunološkim stanicama i izraženosti NY-ESO1 (Tablica 9). Univarijatnom analizom niti jedan istraživani parametar nije pokazao statističku značajnost, stoga multivarijatna analiza nije provedena.

Tablica 9. Analiza procjene izraženosti istraživanih proteina kao neovisnih prognostičkih čimbenika doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura (COXova regresija)

	Univarijatna analiza				
	<b>B</b>	<b>SE</b>	<b>Wald</b>	<b>Exp(B)</b>	<b>P</b>
PD-L1 (tumor)	0,078	0,437	0,032	1,081	0,858
PD-L1 (imune st.)	0,115	0,286	0,162	1,122	0,687
NY-ESO1	0,150	0,300	0,249	1,161	0,618

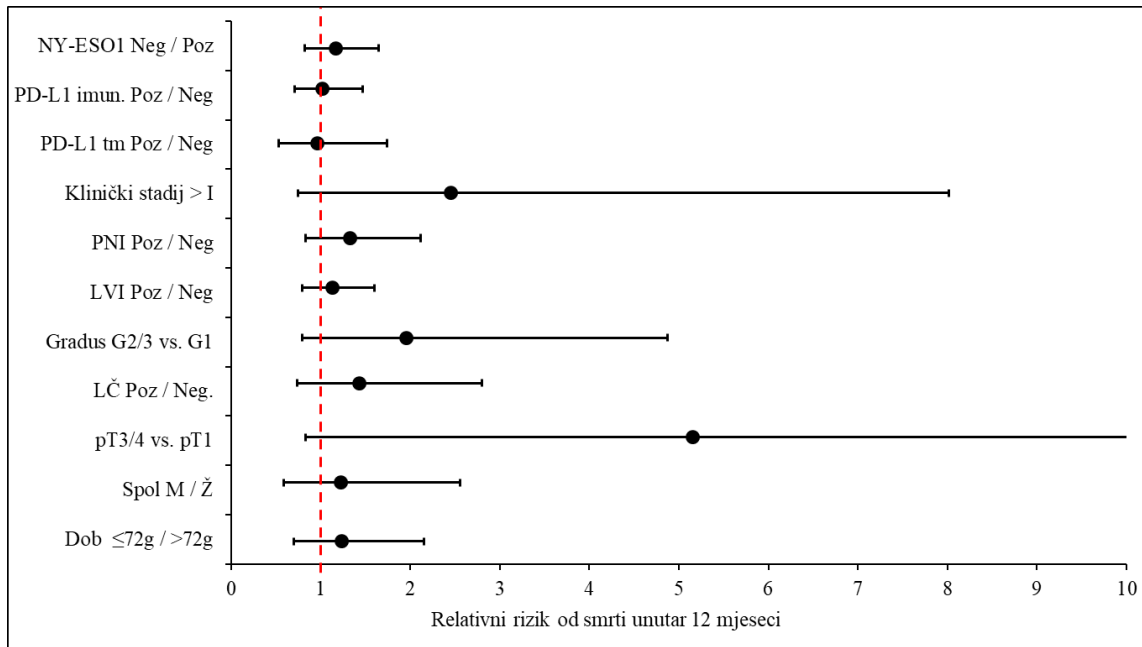
B, koeficijent regresije; SE, standardna pogreška koeficijenta; Wald, Wald test; Exp (B), omjer izgleda/rizika; P, p-vrijednost

Prema našim rezultatima više od polovine bolesnika (65,5 %) umrlo je unutar 12 mjeseci od postavljanja dijagnoze. Istraživani proteini PD-L1 i NY-ESO1 nisu pokazali statistički značajnu razliku izraženosti u odnosu na incidenciju smrti unutar 12 mjeseci od postavljanja dijagnoze. Stoga smo učinili procjenu relativnog rizika od smrti unutar 12 mjeseci za sve patohistološke parametre karcinoma i izraženosti istraživanih proteina, a rezultati su prikazani u Tablici 10 i na Slici 23.

Kao što se može vidjeti (Slika 23), među standardnim kliničkim i patohistološkim parametrima, veća dubina invazije tumora (pT 3/4) bila je povezana s 5,15 puta većim rizikom smrti unutar 12 mjeseci od pT1 (P = 0,078). Rizik je također bio gotovo dvostruko veći za histološki gradus II/III, te 2,45 puta veći ako je bolest dijagnosticirana u kliničkim stadijima višim od stadija I. U našem istraživanju samo je malom broju bolesnika dijagnosticiran karcinom u ranom stadiju. Relativni rizik smrti unutar 12 mjeseci od dijagnoze nije ovisio o imunohistokemijskoj izraženosti istraživanih proteina.

Tablica 10. Čimbenici relativnog rizika smrti unutar 12 mjeseci od postavljanja dijagnoze

	Relativni rizik	95% CI	P
Dob $\leq 72g / > 72g$	1,23	0,699-2,155	0,474
Spol M / Ž	1,23	0,589-2,552	0,585
pT3/4 vs. pT1	5,15	0,833-31,847	0,078
LČ Poz / Neg.	1,43	0,732-2,801	0,295
Gradus G2/3 vs. G1	1,96	0,788-4,868	0,148
LVI Poz / Neg	1,12	0,794-1,596	0,504
PNI Poz / Neg	1,32	0,826-2,114	0,244
Klinički stadij $> I$	2,45	0,748-8,015	0,138
PD-L1 tm Poz / Neg	0,96	0,529-1,743	0,895
PD-L1 imun. Poz / Neg	1,02	0,709-1,469	0,911
NY-ESO1 Neg / Poz	1,16	0,819-1,648	0,399



Slika 23. Relativni rizik (RR) smrti unutar 12 mjeseci od dijagnoze karcinoma žučnog mjehura, prema podacima iz naše studije kod 57 bolesnika. Rizik je 5,15 puta veći kod karcinoma s većom dubinom invazije tumora (pT 2/3), a 2,45 puta veći ako se bolest dijagnosticira u kliničkim stadijima višim od stadija I. Rizik je gotovo dvostruko veći u slučaju karcinoma histološkog gradusa višeg od G1.

## 6. RASPRAVA

Naše istraživanje provedeno je na 57 bolesnika s karcinomom žučnog mjehura dijagnosticiranim tijekom razdoblja od 19 godina. Bolesnici su bili starije životne dobi (medijan dobi 72 godine), a većina ih je upućena na operaciju zbog dijagnoze kolelitijaze s upalom ili bez nje. Prema literaturnim podacima operacija je zlatni standard liječenja. Prema Muszynska i sur. (163) intraoperativni pregled žučnog mjehura poboljšao je otkrivanje karcinoma. Ako se tijekom operacije pronađe karcinom, prijelaz na radikalnu R0 operaciju je relativno lak. Međutim, ako se karcinom žučnjaka dijagnosticira nakon operacije, reoperacija je ključna. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je bolesnicima koji su kirurški liječeni zbog akutne kolelitijaze dijagnoza karcinoma žučnog mjehura postavljena u ranijem kliničkom stadiju bolesti. Postoje i preporuke o preventivnom uklanjanju žučnog mjehura kod visoko rizičnih bolesnika.

Žene su u našem istraživanju dvostruko češće oboljevale od karcinoma žučnjaka i bile su u prosjeku šest godina starije od muškaraca. Literatura također potvrđuje veći kumulativni rizik obolijevanja od karcinoma žučnog mjehura za žene nego za muškarce (2).

Sveukupno doživljenje bolesnika u ovom istraživanju bilo je vrlo loše (medijan 7 mjeseci) i ovisilo je o kliničkom stadiju bolesti. Relativni rizik (RR) smrti unutar 12 mjeseci od postavljanja dijagnoze bio je 2,5 puta veći za više kliničke stadije nego za stadij I. Samo deset bolesnika (17,5 %) živjelo je dulje od 18 mjeseci, tako da je stopa petogodišnjeg preživljenja bila svega 10 %. Na temelju rezultata Rawla i sur. (164) prosječna stopa petogodišnjeg preživljenja u SAD-u je 18 %. Međutim, doživljenje se značajno smanjuje s višim kliničkim stadijem kod postavljanja dijagnoze. Tako je petogodišnje doživljenje 60 % u kliničkom stadiju I, a ako su limfni čvorovi pozitivni, doživljenje je 25 %, dok je ukupno doživljenje ispod 2 % u slučaju udaljenih metastaza pri dijagnozi (164).

Molekularnim profiliranjem, karcinome žučnog mjehura karakterizira nedostatak popravka homologne rekombinacije (19,1 %), pojačana izraženost HER2 (14,4 %) i TOP2A (78,3 %), te mutacija *BRAF* gena (98,138,139). S druge strane, karcinomi žučnog mjehura nisu karakterizirani velikim opterećenjem tumora mutacijama ili visokom mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI-high) (10,6,165).

Iako su neki od ovih markera već terapijska opcija za druge vrste karcinoma, selektivniji

markeri koji ciljaju samo tumorske stanice u fokusu su brojnih istraživanja. Stoga je cilj naše retrospektivne studije bio procijeniti i potencijalni prognostički ili prediktivni klinički značaj izraženosti NY-ESO1 i PD-L1 u karcinomima žučnog mjehura.

U našem istraživanju, protein NY-ESO1 bio je izražen u dvije trećine karcinoma žučnog mjehura (68,4 %). Gotovo polovina karcinoma izražavala je samo NY-ESO (47,4 %), a samo u 12 slučajeva (21 %) zabilježena je istovremena izraženost i NY-ESO1 i PD-L1. Zanimljivo, izraženost NY-ESO1 nije pokazala korelaciju niti s jednim kliničko-patološkim parametrom. Također, nismo utvrdili statistički značajnu korelaciju izraženosti NY-ESO1 s ukupnim doživljenjem bolesnika u ovom istraživanju, iako je relativni rizik od smrti unutar 12 mjeseci od dijagnoze bio nešto veći u slučaju negativnog statusa NY-ESO1 (RR 1,16).

NY-ESO1 pripada skupini antigena karcinoma testisa (engl. *cancer-testis antigens*; CTA) izraženog u različitim vrstama karcinoma, s pozitivnošću u rasponu od 4,3 % do 63,6 % (166). To je visoko imunogeni protein koji inducira spontani humoralni i stanični imunološki odgovor rezultiran infiltracijom imunoloških stanica ("vrući tumori"). Osim toga, činjenica da NY-ESO1 nije izražen u zrelim stanicama, ali je ponovno izražen u stanicama karcinoma, čini ga dobrom metom za imunoterapiju (152).

Meta-analiza koju su proveli Wang i sur. (167), utemeljena na 23 studije, sugerira kraće ukupno preživljenje u slučaju pozitivnog NY-ESO1, s razlikama između različitih tipova karcinoma kao što su serozni karcinomi jajnika, melanomi, karcinom pluća nemalih stanica (NSCLC), karcinom glave i vrata te jednjaka, karcinomi dojke, urotelni karcinomi i drugi. Pozitivan status NY-ESO1 nosio je rizik lošijeg ukupnog preživljenja od negativnog statusa. Tako je temeljem podataka svih studija uključenih u meta-analizu izračunati prosječni procijenjeni omjer rizika (HR OS) ukupnog preživljenja bio 1,41 (95 % CI: 1,24–1,61) u slučaju pozitivnog NY-ESO1. Međutim, podaci su još uvijek nedosljedni, pa u nekim studijama pozitivan NY-ESO1 status u trostruko-negativnom karcinomu dojke (TNBC) ima povoljan, a u drugima nepovoljan klinički značaj (167). Obzirom da su uključene studije starijeg datuma, možemo pretpostaviti da u liječenju nije korištena imunoterapija pa je preživljenje loše.

Jedna trećina (35,1 %) bolesnika u našem istraživanju pokazala je izraženost PD-L1 u imunološkim stanicama, što je bilo u korelaciji s višim kliničkim stadijem bolesti. Ovaj je rezultat viši od onih već objavljenih u literaturi, koji su pokazali izraženost PD-L1 u 8 % do 16,7 % slučajeva karcinoma žučnjaka (106,165). Zanimljivo je da nismo pronašli korelaciju PD-L1 s pozitivnim statusom limfnih čvorova ( $P = 0,066$ ). Studije karcinoma debelog crijeva,



želuca i žučnog mjehura također nisu pokazale korelaciju ekspresije PD-L1 s histopatološkim značajkama kao što su dob, spol, veličina tumora, stadij pT i pN (135,168,169,172). U većini slučajeva PD-L1 je bio u korelaciji sa slabijom diferencijacijom tumora ili višim kliničkim stadijem bolesti. Nedosljednosti u imunohistokemijskim rezultatima u literaturi ovise o postavljenoj graničnoj vrijednosti, upotrijebljenom klonu protutijela i evaluaciji PD-L1 u limfocitima ili tumorskim stanicama koje infiltriraju tumor (124,172). Također, još uvijek postoji određena nedosljednost u literaturi u vezi s korelacijom PD-L1 i ukupnim preživljenjem bolesnika s karcinomom žučnog mjehura. Kim i sur. (135) kao i Rawal i sur. (169) navode nepovoljnu prognozu bolesnika u slučaju pozitivnog nalaza PD-L1, dok Xu i sur. (170) u metaanalizi dolaze do sličnog zaključka, no bez statistički značajne korelacije u kolangiokarcinomima. Broj slučajeva između navedenih istraživanja se uvelike razlikuje (Rawal i sur. - 29 uzoraka; Kim i sur. - 101 uzorak, Xu i sur. - 1066 uzoraka), kao i metode određivanja statusa PD-L1 u uzorcima što navodi i na potrebu jasnijih kriterija određivanja pozitivnog statusa prije kliničke primjene za karcinome žučnog mjehura (135,169,170).

U našem istraživanju same tumorske stanice su rijetko izražavale PD-L1 (10,9 %), uglavnom u slučajevima višeg histološkog gradusa ( $P = 0,024$ ). Međutim, nismo pronašli korelaciju s ukupnim preživljenjem u našem uzorku ovisno o izraženosti PD-L1 u imunološkim ili tumorskim stanicama.

Receptor programirane stanične smrti 1 (PD-1) je receptor imunološke kontrolne točke izražen uglavnom na T-stanicama koji ograničava efektorske funkcije T-stanica unutar tumora. Tumorske stanice mogu dodatno blokirati antitumorski imunološki odgovor pojačanom ekspresijom PD-1 liganda (PD-L1). Pokazalo se da imunoterapija usmjerena na PD-1/PD-L1 pojačava antitumorski imunitet posredovan T-stanicama. Kong i sur. izvijestili su o slučaju bolesnika s rekurentnim metastatskim karcinomom žučnog mjehura s izraženim PD-L1 koji je postigao značajan odgovor na liječenje kombinirajući radioterapiju s nivolumabom (137). Sličan slučaj opisali su Merhi i sur. (166) gdje su povezali klinički odgovor na liječenje anti-PD-1 imunoterapijom (nivolumab) s padom izraženosti PD-1 (ograničena na populaciju CD8+ T stanica) koja je smanjena do 15 puta nakon imunoterapije u bolesnika s rekurentnim pločastim karcinomom glave i vrata.

Naši rezultati pokazuju da je izraženost proteina NY-ESO1 u negativnoj korelaciji s izraženošću PD-L1 u imunološkim i tumorskim stanicama, a njihova istovremena izraženost zabilježena je u 20,7 % slučajeva. To je u skladu s mehanizmom djelovanja PD-L1, koji stupa

u interakciju s PD-1 i rezultira bijegom tumora. Blokada puta PD-1/PD-L1 može djelomično obnoviti NY-ESO1 specifične CD8+ T stanice (168). NY-ESO1 pokazuje sposobnost induciranja snažnog prirodnog anti-NY-ESO1 antitijela, putem odgovora CD4+ i CD8+ T-stanica.

Međutim, terapijsko ciljanje tumora koji izražavaju NY-ESO1 može biti ugroženo snažnim međudjelovanjem inhibitornih molekula imunoloških kontrolnih točaka kao što su PD-1 i PDL-1, te citotoksičnim T limfocitima povezanim s proteinom 4 (CTLA-4) i drugim stanicama. U tim slučajevima uočeni visoki titri anti-NY-ESO1 protutijela su neučinkoviti i dovode do ograničenog objektivnog kliničkog odgovora (135).

NY-ESO1 ima nekoliko kliničkih potencijala kao što su određivanje serumskog NY-ESO1, cijepljenje i terapija T staničnih receptora (TCR terapija). Protutijela (Ab) protiv NY-ESO1 uočena su u krvi bolesnika čiji tumori izražavaju NY-ESO1, ali ne i u zdravih osoba (124,169). Oshima i sur. pokazali su mjerljive razine NY-ESO1 Ab u serumu bolesnika s različitim vrstama karcinoma, koje su bile usporedive s do sada korištenim tumorskim markerima (171). Jung i sur. otkrili su da je izraženost NY-ESO1 povezana s povoljnom prognozom kod bolesnika s uznapredovalim karcinomom pluća nemalih stanica koji primaju imunoterapiju nivolumabom ili pembrolizumabom (172). Zaključili su da bi NY-ESO1 mogao biti surogat marker za učinkovitost primjene imunoterapije kojom inhibiramo vezanje PD-L1 na PD-1. To je podržano činjenicom da izraženost PD-L1 ne jamči odgovor na inhibitore PD-1/PD-L1, a tumori s niskom izraženošću PD-L1 također reagiraju na takvo liječenje. Nekoliko drugih studija također izvještava o značajnim korelacijama između serumskih razina protutijela NY-ESO1 (Ab) i stopa odgovora tumora na anti-PD-1 terapiju (166,169,170,173). Camisaschi i sur. su pokazali da bi cijepljenje s TAA peptidom, NY-ESO-1157-167(V) moglo inducirati specifičan odgovor NY-ESO1 antigena i funkcionalno aktivnih T stanica (174). Druga mogućnost je terapija specifičnim T-staničnim receptorom (TCR) za NY-ESO1. Aferizirane T-stanice bolesnika transducirane su lentivirusnim vektorom koji sadrži NY-ESO1 TCR (stanice TAEST16001), ekspandirane *in vitro* i dane bolesniku nakon kemoterapije kao stanična infuzija (175). Sličnu metodu liječenja koristili su Kawamoto i sur. koji su infuzijom stanica ubojica (engl. *natural killer*; NK) aktiviranih citokinima produljili preživljenje bolesnika s karcinomom žučnog mjehura na devet godina (176).

Antigen raka testisa NY-ESO1 smatra se biomarkerom u bolesnika s karcinomom pločastih stanica glave i vrata i može inducirati i specifična NY-ESO1 protutijela i odgovore T stanica.

Pokazalo se da imunoterapija usmjerena na PD-1/PD-L1 pojačava antitumorski imunitet posredovan T-stanicama. Merhi i sur. (166) prikazuju slučaj u kojem su povezali klinički odgovor na liječenje anti-PD-1 (nivolumabom) s razinom antitijela na NY-ESO1 u bolesnika s rekurentnim karcinomom pločastih stanica glave i vrata. S ciklusima aplicirane imunoterapije nivolumabom dolazi do smanjene ekspresija PD-1 u bolesnikovim T stanicama te smanjenja razine antitijela NY-ESO1 u krvi. U slučaju progresije bolesti NY-ESO1 pozitivnog karcinoma dolazi do povišenja NY-ESO1 antitijela u krvi. Merhi i sur. naglašavaju da se povišena razina antitijela NY-ESO1 podudarala s izraženošću NY-ESO1 u karcinomima te se na ovakav način ne može pratiti učinak imunoterapije ili progresija bolesti u slučaju kad karcinomi ne izražavaju NY-ESO1 (166).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da velik udio karcinoma žučnog mjehura pokazuje izraženost NY-ESO1. Time bi možda NY-ESO1 mogao poslužiti pri dijagnostičkoj obradi kao marker u razlučivanju upalnih stanja od karcinoma ili bi se mogao koristiti u svrhu praćenja dinamike bolesti. U tom smjeru je svakako potrebno provesti dodatna istraživanja njegove izraženosti u serumu bolesnika.

Naše istraživanje ima neka ograničenja koja je važno istaknuti. Broj uzoraka je relativno mali zbog niske učestalosti karcinoma žučnog mjehura. Osim toga, većini bolesnika bolest je dijagnosticirana u uznapredovalom kliničkom stadiju. Zbog slučajnog nalaza karcinoma žučnog mjehura nedostaje dio patohistoloških podataka koji bi mogli pokazati korelacije (npr. veličina tumora ili status limfnih čvorova). Također, svi bolesnici su umrli unutar kratkog vremena od postavljanja dijagnoze, tako da ispitivani markeri nisu pokazali značajan učinak na sveukupno doživljenje.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Gotovo polovina karcinoma žučnog mjehura u našoj kohorti izražava PD-L1 (45,6 %); većinom u imunološkim stanicama infiltriranim u područje tumora.
2. Dvije trećine (68,4 %) karcinoma žučnog mjehura izražava NY-ESO1
3. Izraženosti proteina PD-L1 i NY-ESO1 su u statistički značajnoj negativnoj korelaciji
4. Ukupno petogodišnje doživljenje bolesnika s karcinomom žučnog mjehura je 10 %
5. Petogodišnje doživljenje od 42 % postignuto je jedino u bolesnika s karcinomom kliničkog stadija I
6. Izraženosti PD-L1 u korelaciji je s lošijim kliničkim stadijem bolesti i prisutnom perineuralnom invazijom
7. Nije utvrđena povezanost izraženosti PD-L1 s doživljenjem
8. Nije utvrđena povezanost izraženosti NY-ESO1 s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma žučnog mjehura
9. Nije utvrđena povezanost izraženosti NY-ESO1 s doživljenjem
10. Rizik od smrti unutar 12 mjeseci je 5,15 puta veći u slučaju veće dubine invazije tumora (pT 3/4); 2,45 puta veći rizik za bolest dijagnosticiranu u kliničkim stadijima višim od stadija I te dvostruko veći rizik u slučaju višeg histološkog gradusa (II/III) tumora
11. Relativni rizik smrti unutar 12 mjeseci nije povezan s imunohistokemijskom izraženosti istraživanih proteina

U ovom istraživanju nije dokazana povezanost izraženosti proteina PD-L1 i NY-ESO1 s prognozom karcinoma žučnog mjehura. Međutim, značajan postotak karcinoma izražava istraživane proteine te bi stoga, prema dosadašnjim spoznajama iz drugih studija, mogli biti mete za imunoterapiju. U tom smjeru svakako su potrebna dodatna istraživanja na većem broju uzoraka karcinoma žučnog mjehura.

## 8. SAŽETAK

**Cilj.** Karcinom žučnog mjehura je rijetka zloćudna bolest s vrlo visokom smrtnošću, obično zbog dijagnosticiranja u uznapredovalom stadiju bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti izraženost NY-ESO1 i PD-L1 i njihov utjecaj na prognozu bolesnika s karcinomom žučnog mjehura.

**Materijali i metode.** Imunohistokemijskim bojenjem odredili smo izraženost NY-ESO1 u tumoru i PD-L1 u tumorskim i intratumorskim imunološkim stanicama u 57 bolesnika s karcinomom žučnog mjehura.

**Rezultati.** Karcinomi žučnog mjehura izražavaju NY-ESO1 u 68,4 % slučajeva. PD-L1 je izražen u 45,6 % slučajeva, većinom u intratumorskim imunološkim stanicama (35,1%) a rjeđe u tumorskim stanicama (10,5 %). Izraženost NY-ESO1 je u negativnoj korelaciji s izraženošću PD-L1 u imunološkim stanicama ( $r_s = -0,313$ ;  $p = 0,021$ ). NY-ESO1 nije pokazao povezanost s bilo kojim kliničko-patološkim parametrom ili ukupnim doživljenjem. Izraženost PD-L1 u imunološkim stanicama bila je značajno viša u tumorima s perineuralnom invazijom ( $r_s = 0,318$ ;  $p = 0,018$ ) i višim kliničkim stadijem bolesti ( $r_s = 0,339$ ;  $p = 0,013$ ), ali nije pokazala povezanost s ukupnim doživljenjem. U našem istraživanju, medijan ukupnog doživljenja bolesnika s karcinomom žučnog mjehura je 7 mjeseci, sa stopom petogodišnjeg doživljenja od 10 %. Petogodišnje doživljenje od 42 % postignuto je jedino u bolesnika s karcinomom kliničkog stadija I. Rizik od smrti unutar 12 mjeseci je 5,15 puta veći u slučaju veće dubine invazije tumora (pT 3/4). Također je rizik 2,5 puta veći za bolest dijagnosticiranu u kliničkim stadijima višim od stadija I te dvostuko veći u slučaju višeg histološkog gradusa tumora.

**Zaključak.** Ovim istraživanjem nije dokazana povezanost PD-L1 i NY-ESO1 s prognozom bolesti. Značajan postotak karcinoma imao je izražene istraživane proteine, stoga bi, prema dosadašnjim spoznajama iz drugih studija, mogli biti mete za ciljanu imunoterapiju. U tom smjeru svakako su potrebna dodatna istraživanja na većem broju uzoraka karcinoma žučnog mjehura.

**Ključne riječi:** doživljenje, karcinom žučnog mjehura, NY-ESO1, PD-L1, prognoza

## 9. SUMMARY

### EXPRESSION AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF PD-L1 AND NY-ESO1 IN GALLBLADDER CARCINOMAS

Amir Ibukić, 2024.

**Aim.** Gallbladder cancer is a rare malignancy with a very high mortality, usually due to diagnosis in an advanced stage of the disease. Therefore, the aim of this study was to evaluate the clinical significance of NY-ESO1 and PD-L1 and their impact on the prognosis of patients with gallbladder cancers.

**Materials and methods.** Using immunohistochemical staining, we determined the expression of NY-ESO1 in tumor and PD-L1 in both tumor and intratumoral immune cells in 57 patients with gallbladder cancer.

**Results.** Gallbladder cancers express NY-ESO1 in 68.4 % of cases. PD-L1 was expressed in 45.6 % of cases, mostly in intratumoral immune cells (35 %) and less often in tumor cells (10.5 %). The expression of NY-ESO1 is negatively correlated with the expression of PD-L1 in immune cells ( $r_s = -0.313$ ;  $p = 0.021$ ). NY-ESO1 did not show association with any clinicopathological parameters or overall survival. PD-L1 expression in immune cells was significantly higher in tumors with perineural invasion ( $r_s = 0.318$ ;  $p = 0.018$ ) and higher clinical stage of disease ( $r_s = 0.339$ ;  $p = 0.013$ ), but did not show an association with overall survival. In our study, the median overall survival of patients with gallbladder cancer was 7 months, with a 5-year survival rate of 10 %. Five-year survival of 42% was achieved only for patients with clinical stage I cancer. The risk of death within 12 months is 5.15 times higher in case of deeper tumor invasion (pT 3/4); 2.5 times higher for the disease diagnosed in clinical stages higher than stage I and twice higher in the case of a higher histological tumor grade.

**Conclusion.** This study did not prove a correlation between PD-L1 and NY-ESO1 with the prognosis of gallbladder cancer. A significant percentage of cancers expressed investigated proteins, which, according to previous findings from other studies, could be candidates for targeted immunotherapy. In this direction, additional research on gallbladder cancer is needed.

**Keywords:** Gallbladder cancer, NY-ESO1, PD-L1, overall survival, prognosis

## 10. LITERATURA

1. Abou-Alfa GK, Jarnagin W, El Dika I. Liver and Bile Duct Cancer. U: *Abeloff's Clinical Oncology* [Internet]. Elsevier; 2020 [pristupljeno 21. ožujak 2022.]. str. 1373–96. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323476744000773>
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
3. Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Muñoz N, Herrero R, Ferrecio C, Wistuba II, i sur. Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer. *CA Cancer J Clin.* 2001;51(6):349–64.
4. Pandey M, Shukla VK. Lifestyle, parity, menstrual and reproductive factors and risk of gallbladder cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2003;12(4):269-72.
5. Randi G, Franceschi S, La Vecchia C. Gallbladder cancer worldwide: Geographical distribution and risk factors. *Int J Cancer.* 2006;118(7):1591–602.
6. Shaffer E, Hundal R. Gallbladder cancer: epidemiology and outcome. *Clin Epidemiol.* 2014;6:99-109.
7. Schmidt MA, Marcano-Bonilla L, Roberts LR. Gallbladder cancer: epidemiology and genetic risk associations. *Chin Clin Oncol.* 2019;8(4):31–2.
8. Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Lončar J, Čukelj P, Glibo M, i sur. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019. *Bilten 44, Zagreb.* 2021;(44):37.
9. Ganeshan D, Kambadakone A, Nikolaidis P, Subbiah V, Subbiah IM, Devine C. Current update on gallbladder carcinoma. *Abdom Radiol.* 2021;46(6):2474–89.
10. Pedonomou M. Gallbladder and liver surgery. [Internet]. Pristupljeno: 13.12.2023. Dostupno na: <https://www.drpedonomou.com/en/surgical-procedures/gallbladder-and-liver-surgery/>
11. Gupta S, Kori C, Kumar V, Misra S, Akhtar N. Epidemiological Study of Gallbladder Cancer Patients from North Indian Gangetic Planes: A High-Volume Centre's Experience. *J Gastrointest Cancer.* 2016;47(1):27–35.
12. Stinton LM, Shaffer EA. Epidemiology of gallbladder disease: cholelithiasis and cancer. *Gut Liver.* 2012;6(2):172–87.

13. Muszynska C, Lundgren L, Lindell G, Andersson R, Nilsson J, Sandström P, i sur. Predictors of incidental gallbladder cancer in patients undergoing cholecystectomy for benign gallbladder disease: Results from a population-based gallstone surgery registry. *Surgery*. 2017;162(2):256–63.
14. Mlinarić-Vrbica S, Vrbica Z. Correlation between cholelithiasis and gallbladder carcinoma in surgical and autopsy specimens. *Coll Antropol*. 2009;33(2):533–7.
15. Roa I, de Aretxabala X, Araya JC, Roa J. Preneoplastic lesions in gallbladder cancer. *J Surg Oncol*. 2006;93(8):615–23.
16. Ross JS, Wang K, Catenacci DVT, Chmielecki J, Ali SM, Elvin JA, i sur. Comprehensive genomic profiling of biliary tract cancers to reveal tumor-specific differences and genomic alterations. *J Clin Oncol*. 2015;33(3):231.
17. Hezel AF, Deshpande V, Zhu AX. Genetics of Biliary Tract Cancers and Emerging Targeted Therapies. *J Clin Oncol*. 2010;28(21):3531–40.
18. Zhu AX, Hong TS, Hezel AF, Kooby DA. Current management of gallbladder carcinoma. *The Oncologist*. 2010;15(2):168–81.
19. Rashid A, Ueki T, Gao YT, Houlihan PS, Wallace C, Wang BS, i sur. K-ras mutation, p53 overexpression, and microsatellite instability in biliary tract cancers: a population-based study in China. *Clin Cancer Res JAMA*. 2002;8(10):3156–63.
20. Berk RN, Armbuster TG, Saltzstein SL. Carcinoma in the porcelain gallbladder. *Radiology*. 1973;106(1):29–31.
21. Stephen AE, Berger DL. Carcinoma in the porcelain gallbladder: a relationship revisited. *Surgery*. 2001;129(6):699–703.
22. Schnelldorfer T. Porcelain gallbladder: a benign process or concern for malignancy? *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. 2013;17(6):1161–8.
23. Khan ZS, Livingston EH, Huerta S. Reassessing the need for prophylactic surgery in patients with porcelain gallbladder: case series and systematic review of the literature. *Arch Surg Chic Ill 1960*. 2011;146(10):1143–7.
24. Andrén-Sandberg A. Diagnosis and management of gallbladder polyps. *North Am J Med Sci*. 2012;4(5):203–11.
25. Lin WR, Lin DY, Tai DI, Hsieh SY, Lin CY, Sheen IS, i sur. Prevalence of and risk factors for gallbladder polyps detected by ultrasonography among healthy Chinese: analysis of 34 669 cases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(6):965–9.
26. Wiles R, Thoeni RF, Barbu ST, Vashist YK, Rafaelsen SR, Dewhurst C, i sur. Management and follow-up of gallbladder polyps: Joint guidelines between the European



- Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR), European Association for Endoscopic Surgery and other Interventional Techniques (EAES), International Society of Digestive Surgery - European Federation (EFISDS) and European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE). *Eur Radiol.* 2017;27(9):3856–66.
27. Bhatt NR, Gillis A, Smoothery CO, Awan FN, Ridgway PF. Evidence based management of polyps of the gall bladder: A systematic review of the risk factors of malignancy. *Surg J R Coll Surg Edinb Irel.* 2016;14(5):278–86.
  28. Babu BI, Dennison AR, Garcea G. Management and diagnosis of gallbladder polyps: a systematic review. *Langenbecks Arch Surg.* 2015;400(4):455–62.
  29. Pedersen MRV, Dam C, Rafaelsen SR. Ultrasound follow-up for gallbladder polyps less than 6 mm may not be necessary. *Dan Med J.* 2012;59(10):A4503.
  30. Corwin MT, Siewert B, Sheiman RG, Kane RA. Incidentally detected gallbladder polyps: is follow-up necessary? Long-term clinical and US analysis of 346 patients. *Radiology.* 2011;258(1):277–82.
  31. European Association for the Study of the Liver; EASL. Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol.* 2009;51(2):237–67.
  32. Elnemr A, Ohta T, Kayahara M, Kitagawa H, Yoshimoto K, Tani T, i sur. Anomalous pancreaticobiliary ductal junction without bile duct dilatation in gallbladder cancer. *Hepatogastroenterology.* 2001;48(38):382–6.
  33. Van Erpecum KJ. Pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones: an update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011;35(4):281–7.
  34. Ryu S, Chang Y, Yun KE, Jung HS, Shin JH, Shin H. Gallstones and the Risk of Gallbladder Cancer Mortality: A Cohort Study. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(10):1476–87.
  35. Larsson SC, Wolk A. Obesity and the risk of gallbladder cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2007;96(9):1457–61.
  36. Arcidiacono B, Iiritano S, Nocera A, Possidente K, Nevolo MT, Ventura V, i sur. Insulin resistance and cancer risk: an overview of the pathogenetic mechanisms. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:789174.
  37. Hsing AW, Sakoda LC, Rashid A, Chen J, Shen MC, Han TQ, i sur. Body size and the risk of biliary tract cancer: a population-based study in China. *Br J Cancer.* 2008;99(5):811–5.

38. Tan W, Gao M, Liu N, Zhang G, Xu T, Cui W. Body mass index and risk of gallbladder cancer: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutrients*. 2015;7(10):8321–34.
39. Everson GT, McKinley C, Kern F. Mechanisms of gallstone formation in women. Effects of exogenous estrogen (Premarin) and dietary cholesterol on hepatic lipid metabolism. *J Clin Invest*. 1991;87(1):237–46.
40. Barahona Ponce C, Scherer D, Brinster R, Boekstegers F, Marcelain K, Gárate-Calderón V, i sur. Gallstones, Body Mass Index, C-Reactive Protein, and Gallbladder Cancer: Mendelian Randomization Analysis of Chilean and European Genotype Data. *Hepatology*. 2021;73(5):1783–96.
41. Shukla VK, Tiwari SC, Roy SK. Biliary bile acids in cholelithiasis and carcinoma of the gall bladder: *Eur J Cancer Prev*. 1993;2(2):155–60.
42. Dutta U, Tandon RK. Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for Carcinoma of the gallbladder. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(3):784-7.
43. Nagaraja V, Eslick GD. Systematic review with meta-analysis: the relationship between chronic Salmonella typhi carrier status and gall-bladder cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39(8):745–50.
44. Halaseh SA, Halaseh S, Shakman R. A Review of the Etiology and Epidemiology of Gallbladder Cancer: What You Need to Know. *Cureus*. 2022;14(8):e28260. doi: 10.7759/cureus.28260.
45. Duffy A, Capanu M, Abou-Alfa GK, Huitzil D, Jarnagin W, Fong Y, i sur. Gallbladder cancer (GBC): 10-year experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre (MSKCC): GBC: 10-Year Experience at MSKCC. *J Surg Oncol*. 2008.;98(7):485–9.
46. Townsend CM, ur. *Sabiston textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice*. 21. izdanje. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2022. str. 2147.
47. Silk YN, Douglass HO, Nava HR, Driscoll DL, Tartarian G. Carcinoma of the Gallbladder: The Roswell Park Experience. *Ann Surg*. 1989;210(6):751–7.
48. Regimbeau JM, Fuks D, Bachellier P, Le Treut YP, Pruvot FR, Navarro F, i sur. Prognostic value of jaundice in patients with gallbladder cancer by the AFC-GBC-2009 study group. *Eur J Surg Oncol EJSO*. 2011;37(6):505–12.
49. Tran TB, Norton JA, Ethun CG, Pawlik TM, Buettner S, Schmidt C, i sur. Gallbladder Cancer Presenting with Jaundice: Uniformly Fatal or Still Potentially Curable? *J Gastrointest Surg*. 2017;21(8):1245–53.

50. Feig BW, Ching CD. The M.D. Anderson surgical oncology handbook. 5. izd. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
51. Uenishi T, Yamazaki O, Tanaka H, Takemura S, Yamamoto T, Tanaka S, Nishiguchi S, Kubo S. Serum cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1) as a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(2):583-9.
52. Gundín-Menéndez S, Santos VM, Parra-Robert M, Pla XF, Fradera JMA, Porto RM. Serum CA 19.9 Levels in Patients With Benign and Malignant Disease: Correlation With the Serum Protein Electrophoretic Pattern. *Anticancer Res*. 2019;39(2):1079-83.
53. McCain RS, Diamond A, Jones C, Coleman HG. Current practices and future prospects for the management of gallbladder polyps: A topical review. *World J Gastroenterol*. 2018;24(26):2844–52.
54. Gallahan WC, Conway JD. Diagnosis and management of gallbladder polyps. *Gastroenterol Clin North Am*. 2010;39(2):359–67.
55. Pang L, Zhang Y, Wang Y, Kong J. Pathogenesis of gallbladder adenomyomatosis and its relationship with early-stage gallbladder carcinoma: an overview. *Braz J Med Biol Res*. 2018;51(6):e7411.
56. Stunell H, Buckley O, Geoghegan T, O'Brien J, Ward E, Torreggiani W. Imaging of adenomyomatosis of the gallbladder. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2008;52(2):109–17.
57. Hijioka S, Nagashio Y, Ohba A, Maruki Y, Okusaka T. The Role of EUS and EUS-FNA in Differentiating Benign and Malignant Gallbladder Lesions. *Diagn Basel Switz*. 2021;11(9):1586.
58. Bang SH, Lee JY, Woo H, Joo I, Lee ES, Han JK, i ostali. Differentiating between Adenomyomatosis and Gallbladder Cancer: Revisiting a Comparative Study of High-Resolution Ultrasound, Multidetector CT, and MR Imaging. *Korean J Radiol*. 2014;15(2):226-34.
59. Schwartz LH, Black J, Fong Y, Jarnagin W, Blumgart L, Gruen D, i sur. Gallbladder Carcinoma: Findings at MR Imaging With MR Cholangiopancreatography: *J Comput Assist Tomogr*. 2002;26(3):405–10.
60. Lee SW, Kim HJ, Park JH, Park DI, Cho YK, Sohn CI, i sur. Clinical usefulness of 18F-FDG PET-CT for patients with gallbladder cancer and cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol*. 2010;45(5):560–6.
61. Cross S. Tumors of the Gallbladder, Extrahepatic Biliary Ducts, and Ampulla of Vater. *J Albores-Saavedra, Henson DE, Klimstra DS. Third Series of the Atlas of Tumour*

- Pathology. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 2000, 365 pp., 85, 628 colour illustrations, ISBN 1-881041-58-1. *Histopathology*. 2001;39(4):432–432.
62. Albores-Saavedra J, Chablé-Montero F, González-Romo MA, Ramírez Jaramillo M, Henson DE. Adenomas of the gallbladder. Morphologic features, expression of gastric and intestinal mucins, and incidence of high-grade dysplasia/carcinoma in situ and invasive carcinoma. *Hum Pathol*. 2012;43(9):1506–13.
  63. Foster DR, Foster DB. Gall-bladder polyps in Peutz-Jeghers syndrome. *Postgrad Med J*. 1980;56(655):373–6.
  64. Wistuba II, Miquel JF, Gazdar AF, Albores-Saavedra J. Gallbladder adenomas have molecular abnormalities different from those present in gallbladder carcinomas. *Hum Pathol*. 1999;30(1):21–5.
  65. American Cancer Society. Gallbladder Cancer. [Internet]. Pristupljeno 11.04.2024. Dostupno na: <https://www.cancer.org/cancer/types/gallbladder-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>
  66. Katabi N. Neoplasia of gallbladder and biliary epithelium. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(11):1621–7.
  67. Lewis JT, Talwalkar JA, Rosen CB, Smyrk TC, Abraham SC. Precancerous bile duct pathology in end-stage primary sclerosing cholangitis, with and without cholangiocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(1):27–34.
  68. Mills SE, Greenson JK, Hornick JL, Longacre TA, Reuter VE, ur. Sternberg's diagnostic surgical pathology. Vol. 2. 6. izd. Sv. 2. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015. str. 1375.
  69. Lee SE, Jang JY, Lee YJ, Choi DW, Lee WJ, Cho BH, i sur. Choledochal cyst and associated malignant tumors in adults: a multicenter survey in South Korea. *Arch Surg Chic Ill 1960*. 2011;146(10):1178–84.
  70. Aishima S, Iguchi T, Fujita N, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyoshi M, i sur. Histological and immunohistological findings in biliary intraepithelial neoplasia arising from a background of chronic biliary disease compared with liver cirrhosis of non-biliary etiology. *Histopathology*. 2011;59(5):867–75.
  71. Nakanishi Y, Zen Y, Kondo S, Itoh T, Itatsu K, Nakanuma Y. Expression of cell cycle-related molecules in biliary premalignant lesions: biliary intraepithelial neoplasia and biliary intraductal papillary neoplasm. *Hum Pathol*. 2008;39(8):1153–61.
  72. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, urednici. TNM classification of malignant tumours. 8. izd. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Inc; 2017.

73. Adsay V, Jang KT, Ohike N, Bagci P, Cheng JD, Goodman M. Intracholecystic Papillary-Tubular Neoplasms (ICPN) of the Gallbladder (Neoplastic Polyps, Adenomas, and Papillary Neoplasms That Are  $\geq 1.0$  cm). *Am J Surg Pathol*. 2012;36(9):23.
74. Adsay V, Logani S, Sarkar F, Crissman J, Vaitkevicius V. Foamy gland pattern of pancreatic ductal adenocarcinoma: a deceptively benign-appearing variant. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(4):493–504.
75. Dursun N, Escalona OT, Roa JC, Basturk O, Bagci P, Cakir A, i sur. Mucinous carcinomas of the gallbladder: clinicopathologic analysis of 15 cases identified in 606 carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(11):1347–58.
76. Albores-Saavedra J, Molberg K, Henson DE. Unusual malignant epithelial tumors of the gallbladder. *Semin Diagn Pathol*. 1996;13(4):326–38.
77. Tuncel D, Roa JC, Araya JC, Bellolio E, Villaseca M, Tapia O, i sur. Poorly cohesive cell (diffuse-infiltrative/signet ring cell) carcinomas of the gallbladder: Clinicopathological analysis of 24 cases identified in 628 gallbladder carcinomas. *Hum Pathol*. 2017;60:24–31.
78. Roa JC, Tapia O, Cakir A, Basturk O, Dursun N, Akdemir D, i sur. Squamous cell and adenosquamous carcinomas of the gallbladder: clinicopathological analysis of 34 cases identified in 606 carcinomas. *Mod Pathol Off J.U.S. Can Acad Pathol Inc*. 2011;24(8):1069–78.
79. Nevin JE, Moran TJ, Kay S, King R. Carcinoma of the gallbladder. Staging, treatment, and prognosis. *Cancer*. 1976;37(1):141–8.
80. Wernberg JA, Lucarelli DD. Gallbladder cancer. *Surg Clin North Am*. 2014;94(2):343–60.
81. Waghlikar GD, Behari A, Krishnani N, Kumar A, Sikora SS, Saxena R, i sur. Early gallbladder cancer. *J Am Coll Surg*. 2002;194(2):137–41.
82. Dutta U. Gallbladder cancer: can newer insights improve the outcome? *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(4):642–53.
83. Yoshimitsu K, Honda H, Kuroiwa T, Irie H, Aibe H, Tajima T, i sur. Liver metastasis from gallbladder carcinoma: anatomic correlation with cholecystic venous drainage demonstrated by helical computed tomography during injection of contrast medium in the cholecystic artery. *Cancer*. 2001;92(2):340–8.
84. Kai K, Satoh S, Watanabe T, Endo Y. Evaluation of cholecystic venous flow using indocyanine green fluorescence angiography. *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci*. 2010;17(2):147–51.

85. Cancer Research UK. [Internet]. Pristupljeno 21.02.2024. Dostupno na: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/gallbladder-cancer>
86. Vogel A, Bridgewater J, Edeline J, Kelley RK, Klumpen HJ, Malka D, i sur. Biliary tract cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2023;34(2):127–40.
87. Ruys AT, van Beem BE, Engelbrecht MR, Bipat S, Stoker J, Van Gulik TM. Radiological staging in patients with hilar cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Radiol.* 2012;85(1017):1255-62.
88. Lamarca A, Barriuso J, Chander A, McNamara MG, Hubner RA, ÓReilly D, i sur. <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (<sup>18</sup>FDG-PET) for patients with biliary tract cancer: Systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2019;71(1):115-129.
89. Sahara K, Tsilimigras DI, Maithel SK, Abbott DE, Poultides GA, Hatzaras I, i sur.; and the US Extrahepatic Biliary Malignancy Consortium. Survival benefit of lymphadenectomy for gallbladder cancer based on the therapeutic index: An analysis of the US extrahepatic biliary malignancy consortium. *J Surg Oncol.* 2020;121(3):503-10.
90. Fong Y, Jarnagin W, Blumgart LH. Gallbladder cancer: comparison of patients presenting initially for definitive operation with those presenting after prior noncurative intervention. *Ann Surg.* 2000;232(4):557-69.
91. Ouchi K, Mikuni J, Kakugawa Y; Organizing Committee, The 30th Annual Congress of the Japanese Society of Biliary Surgery. Laparoscopic cholecystectomy for gallbladder carcinoma: results of a Japanese survey of 498 patients. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002;9(2):256-60.
92. Akki A. Gallbladder carcinoma. *Pathology Outlines.* [Internet]. Pristupljeno 02.08.2023. Dostupno na: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/gallbladdercarcinoma.html>.
93. Yue S, Zhang Y, Zhang W. Recent Advances in Immunotherapy for Advanced Biliary Tract Cancer. *Curr Treat Options Oncol* [Internet]. 2024;06. Dostupno na: <https://doi.org/10.1007/s11864-024-01243-y>
94. Tran Cao HS, Zhang Q, Sada YH, Chai C, Curley SA, Massarweh NN. The role of surgery and adjuvant therapy in lymph node-positive cancers of the gallbladder and intrahepatic bile ducts. *Cancer.* 2018;124(1):74-83.
95. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, i sur. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med.* 2010;362(14):1273–81.

96. Primrose JN, Fox RP, Palmer DH, Malik HZ, Prasad R, Mirza D, i sur; BILCAP study group. Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):663-73.
97. Edeline J, Benabdelghani M, Bertaut A, Watelet J, Hammel P, Joly JP, i sur. Gemcitabine and Oxaliplatin Chemotherapy or Surveillance in Resected Biliary Tract Cancer (PRODIGE 12-ACCORD 18-UNICANCER GI): A Randomized Phase III Study. *J Clin Oncol.* 2019;37(8):658-67.
98. Ebata T, Hirano S, Konishi M, Uesaka K, Tsuchiya Y, Ohtsuka M, i sur; Bile Duct Cancer Adjuvant Trial (BCAT) Study Group. Randomized clinical trial of adjuvant gemcitabine chemotherapy versus observation in resected bile duct cancer. *Br J Surg.* 2018;105(3):192-202.
99. Ikeda M, Nakachi K, Konishi M, i sur. Adjuvant S-1 versus observation in curatively resected biliary tract cancer: a phase III trial (JCOG1202: ASCOT). *J Clin Oncol.* 2022;40(S4):382.
100. Ben-Josef E, Guthrie KA, El-Khoueiry AB, Corless CL, Zalupski MM, Lowy AM, i sur. SWOG S0809: A Phase II Intergroup Trial of Adjuvant Capecitabine and Gemcitabine Followed by Radiotherapy and Concurrent Capecitabine in Extrahepatic Cholangiocarcinoma and Gallbladder Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(24):2617-22.
101. Oh DY, He AR, Bouattour M, Okusaka T, Qin S, Chen LT, i sur. Durvalumab or placebo plus gemcitabine and cisplatin in participants with advanced biliary tract cancer (TOPAZ-1): updated overall survival from a randomised phase 3 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2024;9(8):694–704.
102. Benson AB, D'Angelica MI, Abrams T, Abbott DE, Ahmed A, Anaya DA, i sur. Biliary Tract Cancers, Version 2.2023 Featured Updates to the NCCN Guidelines. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw.* 2023;21(7):694–704.
103. Finn RS, Ueno M, Yoo C, Ren Z, Furuse J, Kelley RK, i sur. Three-year follow-up data from KEYNOTE-966: Pembrolizumab (pembro) plus gemcitabine and cisplatin (gem/cis) compared with gem/cis alone for patients (pts) with advanced biliary tract cancer (BTC). 2024;42(16):4093.
104. Al Jaber F, Almaher E, Al-Ibrahim R, AlQahtani M. Curative surgical resection for initially unresectable metastatic gallbladder cancer following neoadjuvant chemotherapy: Case report and review of literature. *Int J Surg Case Rep.* 2022;100:107694.

105. Miura Y, Ashida R, Sugiura T, Ohgi K, Yamada M, Otsuka S, et al. Pathological complete response achieved by gemcitabine plus cisplatin therapy for initially unresectable advanced gallbladder cancer: a case report. *Surg Case Reports*. 2022;8(1):20.
106. de Bitter TJJ, de Reuver PR, de Savornin Lohman EAJ, Kroeze LI, Vink-Börger ME, van Vliet S, i sur. Comprehensive clinicopathological and genomic profiling of gallbladder cancer reveals actionable targets in half of patients. *npj Precis Oncol*. 2022;6(1):1–9.
107. Javle M, Borad MJ, Azad NS, Kurzrock R, Abou-Alfa GK, George B, i sur. Pertuzumab and trastuzumab for HER2-positive, metastatic biliary tract cancer (MyPathway): a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. *Lancet Oncol*. 2021;22(9):1290-300.
108. Song X, Hu Y, Li Y, Shao R, Liu F, Liu Y. Overview of current targeted therapy in gallbladder cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5:230.
109. Zhou Y, Yuan K, Yang Y, Ji Z, Zhou D, Ouyang J, i sur. Gallbladder cancer: current and future treatment options. *Front Pharmacol*. 2023;14:1183619.  
doi: 10.3389/fphar.2023.1183619.
110. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
111. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: Seven steps to success (or failure). *Ann Oncol*. 2016;27(8):1492-504.
112. Bonaventura P, Shekarian T, Alcazer V, Valladeau-Guilemond J, Valsesia-Wittmann S, Amigorena S, i sur. Cold tumors: A therapeutic challenge for immunotherapy. *Front Immunol*. 2019;10:168.
113. Vonderheide RH. The Immune Revolution: A case for priming, Not checkpoint. *Cancer Cell*. 2018;33(4):563-9.
114. Draganov D, Han Z, Rana A, Bennett N, Irvine DJ, Lee PP. Ivermectin converts cold tumors hot and synergizes with immune checkpoint blockade for treatment of breast cancer. [Internet]. *NPJ breast cancer*. 2021;7(1):22.
115. Feng Q, Sun B, Xue T, Li R, Lin C, Gao Y, i sur. Advances in CAR T-cell therapy in bile duct, pancreatic, and gastric cancers. *Front Immunol*. 2022;13:1025608.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.1025608.
116. Venetis K, Invernizzi M, Sajjadi E, Curigliano G, Fusco N. Cellular immunotherapy in breast cancer: The quest for consistent biomarkers. *Cancer Treat Rev*. 2020;90:102089.  
doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102089
117. Ayoub NM, Al-Shami KM, Yaghan RJ. Immunotherapy for HER2-positive breast cancer:



- Recent advances and combination therapeutic approaches. *Breast Cancer Targets Ther.* 2019;11:53-69.
118. Alard E, Butnariu AB, Grillo M, Kirkham C, Zinovkin DA, Newnham L, i sur. Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1826.
  119. Xiang X, Yu PC, Long D, Liao XL, Zhang S, You XM, i sur. Prognostic value of PD -L1 expression in patients with primary solid tumors. *Oncotarget.* 2018;9(4):5058–72.
  120. Tan TJ, Chan JJ, Kamis S, Dent RA. What is the role of immunotherapy in breast cancer? *Chinese Clin Oncol.* 2018;7(2):13.
  121. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10(3):727-42.
  122. Ayoub NM, Fares M, Marji R, Al Bashir SM, Yaghan RJ. Programmed death-ligand 1 expression in breast cancer patients: Clinicopathological associations from a single-institution study. *Breast Cancer Targets Ther.* 2021;13:603-15.
  123. Planes-Laine G, Rochigneux P, Bertucci F, Chrétien AS, Viens P, Sabatier R, i sur. PD-1/PD-L1 targeting in breast cancer: The first clinical evidences are emerging. a literature review. *Cancers (Basel).* 2019;11(7):1-25.
  124. Neyaz A, Husain N, Kumari S, Gupta S, Shukla S, Arshad S, i sur. Clinical relevance of PD-L1 expression in gallbladder cancer: a potential target for therapy. *Histopathology.* 2018;73:622–33.
  125. Mody K, Starr J, Saul M, Poorman K, Weinberg BA, Salem ME, i sur. Patterns and genomic correlates of PD-L1 expression in patients with biliary tract cancers. *J Gastrointest Oncol.* 2019;10:1099–109.
  126. Lin J, Long J, Wan X, Chen J, Bai Y, Wang A, i sur. Classification of gallbladder cancer by assessment of CD8<sup>+</sup> TIL and PD-L1 expression. *BMC Cancer.* 2018;18(1):766.
  127. Millares L, Barreiro E, Cortes R, Martinez-Romero A, Balcells C, Cascante M, i sur; Grupo Colaborativo en Cáncer de Pulmón CIBERES- CIBERONC- SEPAR - Plataforma Biobanco Pulmonar. Tumor-associated metabolic and inflammatory responses in early stage non-small cell lung cancer: local patterns and prognostic significance. *Lung Cancer.* 2018;122:124–30.
  128. Buchbinder EI, Dutcher JP, Daniels GA, Curti BD, Patel SP, Holtan SG, i sur. Therapy with high-dose Interleukin-2 (HD IL-2) in metastatic melanoma and renal cell carcinoma following PD1 or PDL1 inhibition. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):49.

129. Li H, Wang Z, Zhang Y, Sun G, Ding B, Yan L, Liu H, i sur. The immune checkpoint regulator PDL1 is an independent prognostic biomarker for biochemical recurrence in prostate cancer patients following adjuvant hormonal therapy. *J Cancer*. 2019;10(14):3102-11.
130. Ren X, Wu H, Lu J, Zhang Y, Luo Y, Xu Q, Shen S, Liang Z. PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2018;19,373–80.
131. Mocan T, Sparchez Z, Craciun R, Bora CN, Leucuta DC. Programmed cell death protein-1 (PD-1)/programmed death-ligand-1 (PD-L1) axis in hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic perspectives. *Clin Transl Oncol*. 2019;21:702–19.
132. Birnbaum DJ, Finetti P, Lopresti A, Gilabert M, Poizat F, Turrini O, i sur. Prognostic value of PDL1 expression in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016;7(44):71198-210.
133. Wang, X, Li X, Wei X, Jiang H, Lan C, Yang S, i sur. PD-L1 is a direct target of cancer-FOXP3 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and combined immunotherapy with antibodies against PD-L1 and CCL5 is effective in the treatment of PDAC. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5:38.
134. Ha H, Nam AR, Bang JH, Park JE, Kim TY, Lee KH, i sur. Soluble programmed death-ligand 1 (sPDL1) and neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) predicts survival in advanced biliary tract cancer patients treated with palliative chemotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(47):76604–12.
135. Kim JH, Kim K, Kim M, Kim YM, i sur. Programmed death-ligand 1 expression and its correlation with clinicopathological parameters in gallbladder cancer. *J Pathol Transl Med* 2020;54(2):154-64.
136. Song X, Hu Y, Li Y, Shao R, Liu F, Liu Y. Overview of current targeted therapy in gallbladder cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5:230.
137. Kong W, Wei J, Liu J, Qiu Y, Shi J, He J, i sur. Significant benefit of nivolumab combining radiotherapy in metastatic gallbladder cancer patient with strong PD-L1 expression: A case report. *Onco Targets Ther*. 2019;12:5389-93.
138. Almeida LG, Sakabe NJ, deOliveira AR, Silva MCC, Mundstein AS, Cohen T, i sur. CT database: a knowledge-base of high-throughput and curated dana on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D816–9. doi:10.1093/nar/gkn673
139. Fratta E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R, i sur. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol*. 2011;5:164–82.

140. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:615–25.
141. Caballero OL, Chen Y-T. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*. 2009;100:2014–21.
142. Chen Y-T, Ross DS, Chiu R, Zhou XK, Chen Y-Y, Lee P, i sur. Multiple cancer/testis antigens are preferentially expressed in hormone-receptor negative and high-grade breast cancers. *PLoS One*. 2011;6:e17876. doi:10.1371/journal.pone.0017876
143. Whitehurst AW. Cause and consequence of cancer/testis antigen activation in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:251–72.
144. Karpf AR, Lasek AW, Ririe TO, Hanks AN, Grossman D, Jones DA. Limited gene activation in tumor and normal epithelial cells treated with the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol*. 2004;65:18–27.
145. Gjerstorff MF, Andersen MH, Ditzel HJ. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget*. 2015;6:15772–87.
146. National Library of Medicine (U.S.A). Gallbladder Cancer. [Internet]. Pristupljeno 11.11.2023. Dostupno na: <https://medlineplus.gov/gallbladdercancer.html>
147. Chen YT, Boyer AD, Viars CS, Tsang S, Old LJ, Arden KC. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1998;79(3–4): 237–40.
148. Gene card. CTAG1B cancer/testis antigen 1B. [Internet]. Pristupljeno 09.08.2023. Dostupno na: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CTAG1B>
149. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, i sur. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(5):1914-8.
150. Satie AP, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, Henno S, Olivo L, Jacobsen GK, i sur. The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ. *Lab Invest*. 2002;82(6):775-80.
151. Raza A, Merhi M, Inchakalody VP, Krishnankutty R, Relecom A, Uddin S, i sur. Unleashing the immune response to NY-ESO-1 cancer testis antigen as a potential target for cancer immunotherapy. *J Transl Med*. 2020;18(1):1-11.

152. Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, Hendrickx W, Dermime S, Bedognetti D, i sur. NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives. *Front Immunol.* 2018;9:947.
153. Reiner MO, Wild PJ, Soll C, Knuth A, Jin B, Jungbluth A, i sur. Frequent expression of the novel cancer testis antigen MAGE-C2/CT-10 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2009;124:352-7.
154. Cho HJ, Caballero OL, Gnjatic S, Andrade VC, Colleoni GW, Vettore AL, i sur. Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6). *Cancer Immun.* 2006;6:12.
155. Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, i sur. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Experim. Med.* 1998;187(2):265–70.
156. Toor AA, Payne KK, Chung HM, Sabo RT, Hazlett AF, Kmiecik M, i sur. Epigenetic induction of adaptive immune response in multiple myeloma: sequential azacitidine and lenalidomide generate cancer testis antigen-specific cellular immunity. *British Journal of Haematology.* 2012;158 (6):700–11.
157. Ademuyiwa FO, Bshara W, Attwood K, Morrison C, Edge SB, Karpf AR, i sur. NY-ESO-1 cancer testis antigen demonstrates high immunogenicity in triple negative breast cancer. *PLOS ONE.* 2012;7(6):e38783. doi:10.1371/journal.pone.0038783.
158. Nakamura Y, Noguchi Y, Satoh E, Uenaka A, Sato S, Kitazaki T, i sur. Spontaneous remission of a non-small cell lung cancer possibly caused by anti-NY-ESO-1 immunity. *Lung Cancer.* 2009;65(1):119–22.
159. Matsuzaki J, Gnjatic S, Mhawech-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Tsuji T, i sur. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(17):7875-80.
160. Zhang XW, Wu YS, Xu TM, Cui MH. CAR-T Cells in the Treatment of Ovarian Cancer: A Promising Cell Therapy. *Biomolecules.* 2023;13(3):465. doi: 10.3390/biom13030465.
161. Robbins Y, Greene S, Friedman J, Clavijo PE, Van Waes C, Fabian KP, Padget MR, Abdul Sater H, Lee JH, Soon-Shiong P, Gulley J, Schlom J, Hodge JW, Allen CT. Tumor control via targeting PD-L1 with chimeric antigen receptor modified NK cells. *Elife.* 2020;9:e54854. doi: 10.7554/eLife.54854.

162. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106.
163. Muszynska C, Lundgren L, Lindell G, Andersson R, Nilsson J, Sandström P, i sur. Predictors of incidental gallbladder cancer in patients undergoing cholecystectomy for benign gallbladder disease: Results from a population-based gallstone surgery registry. *Surg (United States)*. 2017;162(2):256–63.
164. Rawla P, Sunkara T, Thandra KC, Barsouk A. Epidemiology of gallbladder cancer. *Clin Exp Hepatol*. 2019;5(2):93.
165. Weinberg BA, Xiu J, Lindberg MR, Shields AF, Hwang JJ, Poorman K, i sur. Molecular profiling of biliary cancers reveals distinct molecular alterations and potential therapeutic targets. *J Gastrointest Oncol*. 2019;10(4):652.
166. Merhi M, Raza A, Inchakalody VP, Nashwan AJJ, Allahverdi N, Krishnankutty R, i sur. Squamous cell carcinomas of the head and neck cancer response to programmed cell death protein-1 targeting and differential expression of immunological markers: A case report. *Front Immunol*. 2018;9:1769.
167. Wang H, Chen D, Wang R, Quan W, Xia D, Mei J, i sur. NY-ESO-1 expression in solid tumors predicts prognosis: A systematic review and meta-analysis. *Med (United States)*. 2019;98(48):e17990. doi: 10.1097/MD.00000000000017990.
168. Li Y, He M, Zhou Y, Yang C, Wei S, Bian X, i sur. The prognostic and clinicopathological roles of PD-L1 expression in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol*. 2019;10:139.
169. Rawal N, Awasthi S, Dash NR, Kumar S, Das P, Ranjan A, i sur. Prognostic relevance of PDL1 and CA19-9 expression in gallbladder cancer vs. inflammatory lesions. *Curr Oncol*. 2023;30(2):1571-84.
170. Xu G, Sun L, Li Y, Xie F, Zhou X, Yang H, i sur. The clinicopathological and prognostic value of PD-L1 expression in cholangiocarcinoma: A meta-analysis. *Front Oncol*. 2019;9:897.
171. Oshima Y, Shimada H, Yajima S, Nanami T, Matsushita K, Nomura F, i sur. NY-ESO-1 autoantibody as a tumor-specific biomarker for esophageal cancer: screening in 1969 patients with various cancers. *J Gastroenterol*. 2016;51(1):30-4.
172. Jung EH, Jang HR, Kim SH, Suh KJ, Kim YJ, Lee JH, i sur. Tumor LAG-3 and NY-ESO-1 expression predict durable clinical benefits of immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*. 2021;12(5):619-30.

173. Kassab J, Saba L, Gebrael G, Kais S, Kassab R, Kourie HR. Update on immunotherapy in the management of gallbladder cancer. *Immunotherapy*. 2023;15(1):35-42.
174. Camisaschi C, Renne SL, Beretta V, Rini F, Spagnuolo RD, Tuccitto A, i sur. Immune landscape and in vivo immunogenicity of NY-ESO-1 tumor antigen in advanced neuroblastoma patients. *BMC Cancer*. 2018;18(1):983.
175. Johnson V. NY-ESO-1 TCR T-cell therapy shows clinical activity in soft tissue sarcoma. [Internet]. Pristupljeno 05.05.2023. Dostupno na: <https://www.cgtlive.com/view/ny-eso-1-tcr-t-cell-therapy-clinical-activity-soft-tissue-sarcoma>
176. Kawamoto M, Wada Y, Koya N, Koya N, Takami Y, Saito H, i sur. Long-term survival of a patient with recurrent gallbladder carcinoma, treated with chemotherapy, immunotherapy, and surgery: A case report. *Surg Case Rep*. 2018;4(1):115.

## 11. ŽIVOTOPIS

Amir Ibukić rođen je 20. kolovoza 1977. godine u Bihaću. Po završetku osnovne škole i gimnazije, 1996. godine upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, na kojem je diplomirao 2003. godine. Od 2003. do 2006. godine specijalizirao je opću kirurgiju u Županijskoj bolnici u Bihaću te daljnju edukaciju nastavio u KB Dubrava i KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu. Specijalistički ispit iz opće kirurgije položio je 2009. godine, a 2013. godine je završio užu specijalizaciju iz abdominalne kirurgije. Zaposlen je u Klinici za kirurgiju KBC Sestre milosrdnice.

Aktivno je sudjelovao u nizu domaćih i inozemnih stručnih skupova. Objavio je više znanstvenih publikacija, između ostalih koautor je i Smjernica za liječenje benignih bolesti anorektalne regije. Član je Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju te Hrvatskog društva za endoskopsku kirurgiju Hrvatskog liječničkog zbora. Oženjen je i otac dvoje djece.