

Imunohistokemijska izraženost proteina MAGE-A10 i NY-ESO-1 u primarnom adenokarcinomu želuca s metastazama u regionalne limfne čvorove i bez njih

Misir, Zvonimir

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:003984>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Zvonimir Misir

**Imunohistokemijska izraženost proteina
MAGE-A10 i NY-ESO-1 u primarnom
adenokarcinomu želuca s metastazama
u regionalne limfne čvorove i bez njih**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Zvonimir Misir

**Imunohistokemijska izraženost proteina
MAGE-A10 i NY-ESO-1 u primarnom
adenokarcinomu želuca s metastazama
u regionalne limfne čvorove i bez njih**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

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

Voditelj rada: doc. dr. sc. Monika Ulamec

Svojoj mentorici doc. dr. sc. Moniki Ulamec zahvaljujem na vodstvu, vrijednim savjetima, strpljivosti, ohrabrenju i podršci koju mi je pružila tijekom planiranja i izrade ove disertacije.

Također, velika hvala svim kolegicama i kolegama, djelatnicima Klinike za kirurgiju KBC Sestre milosrdnice koji su mi pomogli u izradi disertacije.

Od srca hvala obitelji i prijateljima, jer bez njihove bezuvjetne i nesebične podrške, razumijevanja i ljubavi koju sam imao u svim trenucima ne bih ovo postigao.

Ovu disertaciju posvećujem svojoj supruzi Romini, djeci Magdaleni, Šimunu Petru, Mariji Ruži, te majci i ocu.

SADRŽAJ

1.	UVOD I SVRHA RADA	1
1.1.	<i>Epidemiologija karcinoma želuca</i>	1
1.2.	<i>Etiologija i patogeneza</i>	3
1.3.	<i>Rizični čimbenici</i>	7
1.3.1.	<i>Helicobacter pylori</i>	7
1.3.2.	<i>Epstein-Barr</i>	8
1.3.3.	<i>Krvna grupa</i>	8
1.3.4.	<i>Pušenje</i>	9
1.3.5.	<i>Pretilost</i>	9
1.3.6.	<i>Genetika</i>	9
1.4.	<i>Premaligne promjene i uloga upale</i>	10
1.4.1.	<i>Želučani polipi</i>	12
1.4.2.	<i>Želučani ulkusi</i>	13
1.5.	<i>Kliničke karakteristike karcinoma želuca</i>	13
1.6.	<i>Dijagnostika karcinoma želuca</i>	15
1.7.	<i>Klasifikacija i stupnjevanje karcinoma želuca</i>	15
1.8.	<i>Procjena stadija karcinoma želuca</i>	18
1.9.	<i>Liječenje i prognoza</i>	22
1.10.	<i>Karcinom-testis antigeni</i>	27
1.11.	<i>MAGE-A10</i>	28
1.12.	<i>NY-ESO-1</i>	30
2.	HIPOTEZA	33
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	34
3.1.	<i>Opći cilj</i>	34
3.2.	<i>Specifični ciljevi</i>	34
4.	MATERIJALI I METODE	35
4.1.	<i>Bolesnici i uzorci tkiva</i>	35
4.2.	<i>Metode</i>	35
4.3.	<i>Statistička analiza</i>	37
5.	REZULTATI	38
5.1.	<i>Osnovne antropometrijske i patohistološke karakteristike</i>	38
5.2.	<i>Imunohistokemijska izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10</i>	44
5.3.	<i>Analiza preživljenja</i>	50
5.4.	<i>Multivarijatna analiza</i>	55
5.5.	<i>Predviđanja 2-godišnjeg preživljenja</i>	57
6.	RASPRAVA	61
7.	ZAKLJUČCI	70
8.	SAŽETAK	71
9.	SUMMARY	72
10.	LITERATURA	73
11.	ŽIVOTOPIS	92

POPIS KRATICA

AFP	alfa fetoprotein
AJCC	engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i>
BabA2	gen za adhezin koji se veže na antigen vezan uz krvnu grupu (engl. <i>blood group antigen-binding adhesin</i>)
CA 125	tumorski marker (engl. <i>cancer antigen 125</i>)
CA 19-9	karbohidratni antigen 19-9, tumorski marker (engl. <i>carbohydrate antigen 19-9</i>)
CA 72-4	tumorski marker (engl. <i>cancer antigen 72-4</i>)
CagA	gen A vezan uz citotoksin (engl. <i>cytotoxin-associated gene A</i>)
CDH1	gen za E-kadherin, jedan od proteina iz obitelji kadherina (engl. <i>cadherin</i>) odgovornih za povezivanje stanica
CEA	karcinoembrionalni antigen, tumorski biljeg (engl. <i>carcinoembryonic antigen</i>)
CIN	kromosomska nestabilnost (engl. <i>chromosomal instability</i>)
CT	komputerizirana tomografija (engl. <i>computerized tomography</i>)
CTA	karcinom-testis antigeni (engl. <i>Cancer-Testis Antigens</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EBV	Epstein-Barr virus
ECM	izvanstanični matriks (engl. <i>extracellular matrix</i>)
ECOG	dogovoreni kriterij za procjenu općeg stanja onkološkog bolesnika (engl. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>)
EGD	ezogagogastroduodenoskopija
ESMO	Europsko društvo za medicinsku onkologiju (engl. <i>European Society for Medical Oncology</i>)

EUS	endoskopski ultrazvuk (engl. <i>endoscopic ultrasound</i>)
FNA	citološka aspiracija tankom iglom (engl. <i>fine-needle aspiration</i>)
FNAB	aspiracijska biopsija tankom iglom (engl. <i>fine-needle aspiration biopsy</i>)
HE	hematoksilin-eozin, standardno bojenje histološkog materijala u patologiji
HER2	gen koji kodira receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
Hp	<i>Helicobacter pylori</i>
HR, RR	mjere omjera izgleda i relativnog rizika korišteni u statistici (engl. <i>hazard risk, relative risk</i>)
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
IHC	metoda imunohistokemijskog bojenja (engl. <i>immunohistochemistry</i>)
MAGE-A10	Melanoma antigen A10
MR	magnetska rezonanca
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSI	mikrosatelitna nestabilnost (engl. <i>microsatellite instability</i>), spontano nakupljanje mutacija zbog defekata u genima za popravak DNA
N, n	broj ispitanika
NCCN	neprofitno udruženje stručnjaka SAD-a koji utvrđuju preporuke u kliničkoj onkološkoj praksi (engl. <i>National Comprehensive Cancer Network</i>)
NY-ESO-1	engl. New York esophageal squamous cell carcinoma 1
OMP	engl. <i>outer membrane proteins</i>
p	statistička značajnost
PET/FDG	pozitronska emisijska tomografija s fluordeoksiglukozom
Ras-ERK	signalni put uključen u regulaciju rasta stanice

TNM	klasifikacija proširenosti tumora (engl. Tumor (T), lymph Node metastasis (N), distant Metastasis (M))
TP53/p53	tumor-supresorski gen 53 (engl. <i>tumor protein p53</i>)
UZV	ultrazvuk
VacA	gen za vakuolizirajući toksin A (engl. <i>vacuolating toxin A</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)
χ^2	Hi-kvadrat test
ITM	indeks tjelesne mase
HDGC	nasljedni difuzni karcinom želuca (engl. <i>hereditary diffuse gastric cancer</i>)

1. UVOD I SVRHA RADA

Zloćudne bolesti predstavljaju jedan od vodećih javnozdravstvenih problema u svijetu, a karcinom želuca s milijun novih slučajeva godišnje nije iznimka. Karcinom želuca je 5. najčešća maligna bolest u svijetu i četvrti je na svjetskoj ljestvici uzroka smrti od zloćudnih tumora (1,2). Iako ukupna incidencija i smrtnost od karcinoma želuca opada od sredine 20. stoljeća u razvijenim zemljama, zabrinjava porast incidencije kod mlađe odrasle populacije (<50 godina) (2). Trenutno su kirurška resekcija s adjuvantnom ili neoadjuvantnom radioterapijom i kemoterapijom najučinkovitiji načini liječenja ove bolesti (3). Unatoč značajnom napretku u dijagnostici i liječenju malignih oboljenja, bolesnici s karcinomom želuca i dalje imaju lošu prognozu što dodatno naglašava potrebu za preventivnim mjerama i ranom dijagnozom. Iako je patogeneza adenokarcinoma želuca predmet mnogobrojnih istraživanja, poznato je da epigenetske promjene igraju važnu ulogu u nastanku većine slučajeva karcinoma želuca (4). Buduća istraživanja ne bi smjela podcijeniti heterogenost karcinoma želuca pri razvoju dijagnostičkih i terapijskih strategija usmjerenih na poboljšanje preživljenja bolesnika.

Glavna namjena ovog istraživanja je pobliže razjasniti prognostičku ulogu karcinom-testis proteina (eng. Cancer-Testis Antigens, CTAs) NY-ESO-1 i MAGE-A10 kod adenokarcinoma želuca. Otkrića u ovom području otvaraju mogućnost razvoja ciljanih, individualiziranih terapijskih metoda što bi doprinijelo uspješnijem liječenju i boljoj perspektivi oboljelih od ovog tumora.

1.1. Epidemiologija karcinoma želuca

Karcinom želuca zbog svoje heterogenosti i agresivnog ponašanja predstavlja značajan javnozdravstveni problem u svijetu (5,6). Unatoč padu incidencije i mortaliteta koja se prati u nekim razvijenim zemljama i dalje se radi o karcinomu s lošom prognozom (7). Prema učestalosti se nalazi na petom mjestu najčešćih malignih oboljenja na svijetu nakon karcinoma dojke, prostate, pluća i kolorektalnog karcinoma, dok je ukupno četvrti po smrtnosti (1,2). Prema GLOBOCAN izvješću o rasprostranjenosti raka u svijetu za 2020. godinu bilo je oko 1.000.000 novooboljelih i 769.000 smrtnih slučajeva od karcinoma želuca (1). Incidencija i mortalitet značajno

variraju ovisno o rasi, spolu i geografskom položaju te je značajno veća kod muškaraca u odnosu na ženski spol. Rijedak je prije 40-e godine života, s vrškom incidencije u 7. i 8. desetljeću života za oba spola, a češće se javlja u nerazvijenim zemljama, grupama lošijeg socioekonomskog statusa i crnoj rasi (2). Više od 70% slučajeva karcinoma želuca dijagnosticira se u zemljama u razvoju(8). Najveća incidencija prisutna je u zemljama Istočne Azije (Mongolija, Kina, Južna Koreja, Japan), istočnoj Europi i Južnoj Americi, dok je incidencija značajno manja u zemljama sjeverne Amerike, sjeverne Europe i u Africi (1,9). U Republici Hrvatskoj je karcinom želuca prema posljednjim podacima populacijskog Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2018. godini bio na sedmom mjestu po incidenciji u muškaraca s 535 novih slučajeva, dok je u žena zauzeo deseto mjesto s 335 novih slučajeva, uz značajno visoku smrtnost pri čemu je omjer mortaliteta i incidencije 0.96 (10). Opisane regionalne varijacije u incidenciji pripisuju se razlikama u prehrambenim navikama populacije te prevalenciji infekcije s *Helicobacter pylori* (Hp) (11).

Pad incidencije karcinoma želuca unatrag nekoliko desetljeća prvenstveno se pripisuje poboljšanju životnih uvjeta, promjenama prehrambenih navika te eradikaciji infekcije s *Helicobacter pylori* (11,12,14). Iako je sveukupna incidencija karcinoma želuca u svijetu u padu, epidemiološke studije su pokazale povećanu stopu incidencije i mortaliteta karcinoma proksimalnog dijela želuca (2,12,13). Ovaj tip karcinoma kojeg nazivamo karcinomom ezofagogastričnog spoja tj. karcinom kardije, u usporedbi s karcinomom distalnog dijela želuca ima lošije 5-godišnje preživljenje, veću perioperativnu smrtnost, dva puta češće se javlja u bijelaca te pet puta češće u muškaraca (14,15). Epidemiološki i patogenetski sličan je adenokarcinomu jednjaka te se stoga smatra zasebnim patološkim entitetom.

Ove promjene u incidenciji vidljive kod mlađe populacije nisu u potpunosti razjašnjene ali se pripisuju padu incidencije Hp, promjeni rizičnih čimbenika kao što su pretilost i prehrana, te porastu incidencije autoimunog gastritisa (16,17).

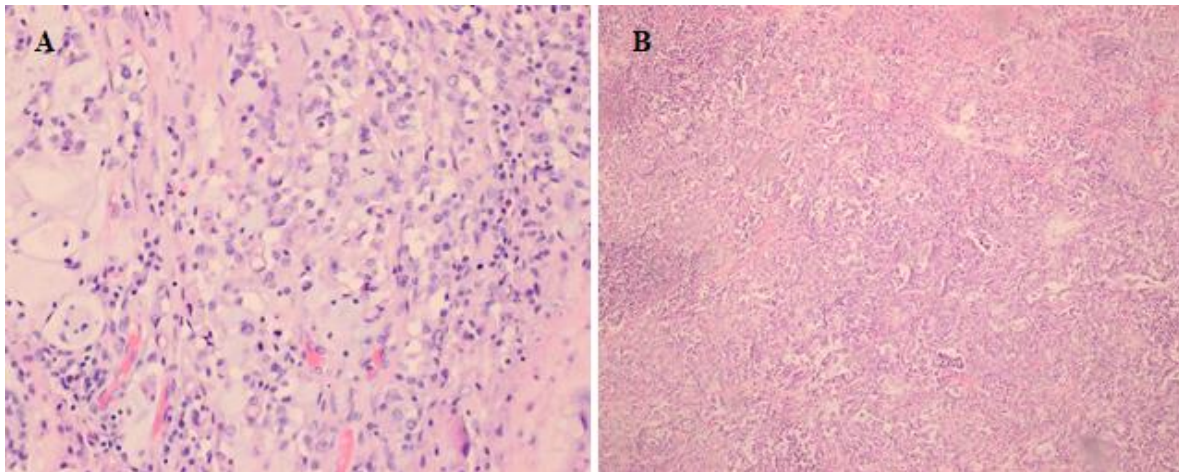
Unatoč trendovima pada incidencije, karcinom želuca ostaje važan uzrok smrtnosti od karcinoma na koji otpada 8% svih smrtnih slučajeva povezanih sa zloćudnim bolestima u 2020. godini. Iako su programi ranog otkrivanja bolesti važni u visokorizičnim populacijama, smanjenje prevalencije Hp, kao i smanjenje drugih poznatih čimbenika rizika ključno je za prevenciju raka želuca. Potreban je nadzor

trendova kod mlađih odraslih osoba kako bi se ustanovilo hoće li se porast učestalosti nastaviti za ovu skupinu. Važno je usmjeriti napore na preventivne mjere koje bi mogle promijeniti prevalenciju čimbenika rizika za dugoročnu dobrobit javnog zdravlja.

1.2. Etiologija i patogeneza

Većina (oko 90%) karcinoma želuca spada u skupinu adenokarcinoma, koji potječu iz žlijezda želučane sluznice. Osim karcinoma, maligni tumor želuca mogu biti mezenhimalnog podrijetla ili limfatičnog tkiva želuca. U ovoj raspravi usredotočit ćemo se na želučane adenokarcinome.

Tijekom povijesti je postojala nekolicina predloženih i korištenih klasifikacija adenokarcinoma želuca. Epidemiološki i prognostički vrlo diferentna tzv. Laurenova klasifikacija iz 1965. godine razlikuje intestinalni, difuzni i miješani tip adenokarcinoma želuca (18). Osnovne razlike u histološkoj građi tipova karcinoma po Laurenou prikazane su na Slici 1.



Slika 1. Histološki izgled dva osnovna tipa karcinoma želuca po Laurenou; (A) difuzni tip adenokarcinoma - difuzno razbacane pojedinačne atipične stanice, žarišno s po kojom stanicom tipa prstena pečatnjaka, mitozama i mucinoznom stromom (HEx400); (B) intestinalni tip - glandularne formacije zbijene jedna uz drugu infiltrativno rastu u okolinu (HEx100)

Intestinalni tip adenokarcinoma želuca povezan je s infekcijom *Helicobacter pylori*, sa želučanom intestinalnom metaplazijom i atrofijom, dok difuzni tip adenokarcinoma raste u okružju pangastritisa bez atrofije.

Intestinalni tip adenokarcinoma sadrži tubularne strukture slične žlijezdama intestinalnog epitela zbijene jedna uz drugu koje infiltrativno rastu u okolinu. Ovaj tip adenokarcinoma je povezan s okolišnim i prehrambenim čimbenicima te je visoko zastupljen u regijama s visokom incidencijom karcinoma želuca. Pad sveukupne incidencije karcinoma želuca je prvenstveno na račun pada incidencije ovog tipa karcinoma. Difuzni tip adenokarcinoma histološki karakteriziraju stanice koje difuzno infiltriraju stijenku želuca, bez jasnog formiranja tubularnih struktura. Histološkim pregledom mogu se naći posebne stanice bogate mucinom, tzv. stanice prstena pečatnjaka koje se ne uočavaju u intestinalnom tipu karcinoma. Pojavljuje se u mlađoj dobi, ima lošiju prognozu u odnosu na intestinalni tip te do sada nije uočen pad u njegovoj incidenciji (19). Difuzni tip koji zahvaća veću površinu želuca se naziva *linitis plastica*. Katkad se nađe i miješani tip karcinoma koji sadrži heterogena područja s predominacijom jednog od ova dva histološka tipa (20).

Pretpostavlja se da razvoju intestinalnog tipa adenokarcinoma želuca prethodi postupan proces karcinogeneze sličan onome u kolorektalnom karcinomu. Normalna sluznica želuca postupno se transformira u hiperproliferativni epitel nakon čega dolazi do žljezdane atrofije, intestinalne metaplazije, displazije i u konačnici razvoja adenokarcinoma (21,22). U prilog tome govori i veća incidencija kroničnog atrofičnog gastritisa i intestinalne metaplazije u osoba s intestinalnim tipom adenokarcinoma, kao i među populacijama s većom incidencijom karcinoma želuca (23,24). Ključni čimbenik za inicijaciju i progresiju ranije opisanog procesa karcinogeneze svakako je infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* (Hp). Životinjski modeli ukazuju na mogućnost reverzibilnosti svih stupnjeva promjena koje prethode visokom stupnju displazije (25,26).

Podatci o utjecaju kronične upale na razvoj difuznog tipa karcinoma kao i primjenjivost opisanog modela karcinogeneze za ovaj histološki tip su nejasni. Oba tipa adenokarcinoma su povezana s infekcijom *Helicobacter pylori* koja ima direktan utjecaj na gene zadužene za popravak DNA (27,28).

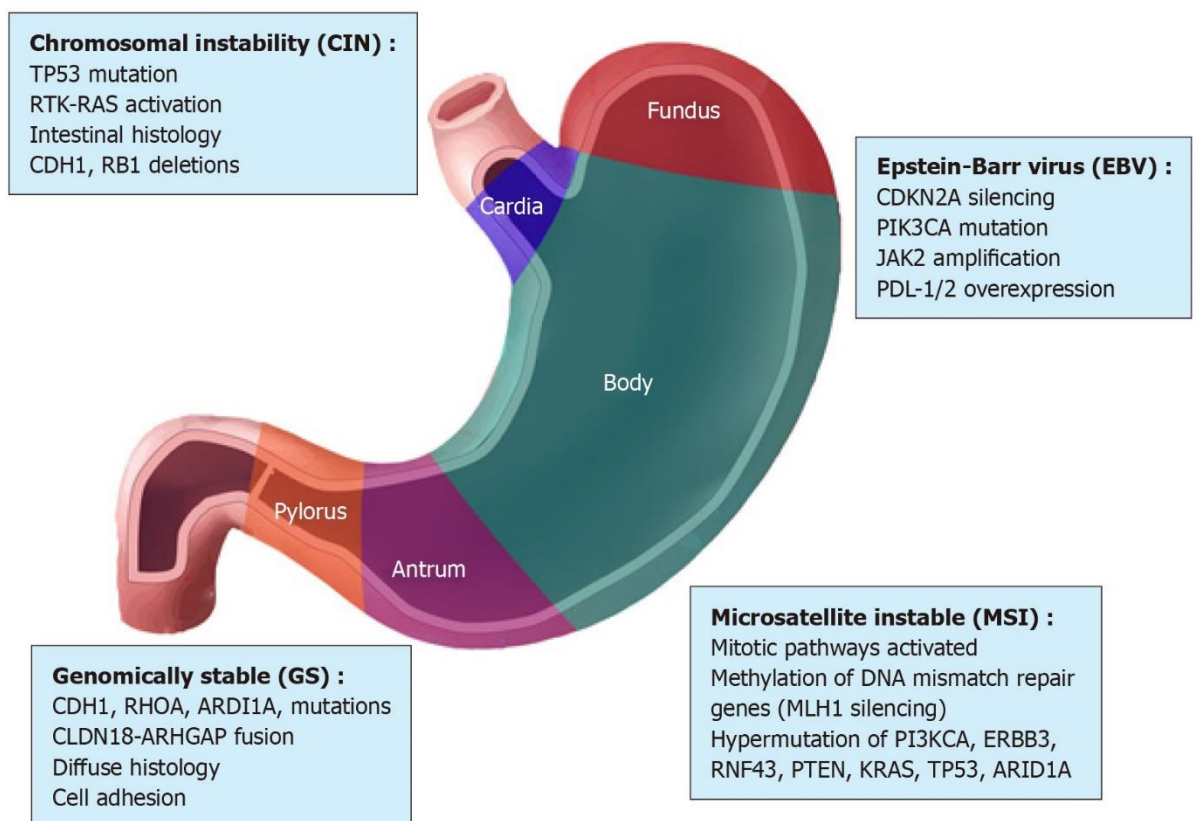
Prema anatomskej lokalizaciji razlikujemo želučane adenokarcinome proksimalnog dijela želuca (kardija) od distalnog karcinoma fundusa, tijela i antruma želuca. Većinu adenokarcinoma želuca čine nekardijalni karcinomi želuca koji su u porastu od 1970-ih (29,30). Distalni adenokarcinomi i karcinomi kardije želuca imaju vrlo različite biološke karakteristike. Karcinom distalnog želuca češći je u muškaraca (dvostruko češće nego u žena), crnaca, starijih osoba, nižih socioekonomskih skupina i zemljama u razvoju (29).

Za razliku od karcinoma kolona čija je karcinogeneza dobro proučena na genetskoj razini, točan mehanizam i geni uključeni u razvoj karcinoma želuca još nisu dobro definirani. Razlog je velika heterogenost molekularnih mehanizama uključenih u proces karcinogeneze karcinoma želuca i ezofagogastričnog spoja (31–34). Godine 2014. u sklopu programa „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) predložena je klasifikacija karcinoma želuca na osnovu epigenomskih, transkriptomskih i proteomskih analiza koja razlikuje 300 podvrsta karcinoma želuca (35). Iako ova opsežna klasifikacija do danas nije našla širu kliničku primjenu autori su definirali 4 molekularna podtipa karcinoma kako bi objasnili heterogenost karcinoma želuca (20,36–39). Prvu grupu čine karcinomi povezani s infekcijom virusom *Epstein Barr* (EBV) kojeg karakterizira visok stupanj DNA hipermetilacije, zatim karcinomi s mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI) s visokim stupnjem mutacija i hipermetilacije, genomski stabilni (GS) podtip i kromosomski nestabilni karcinomi (CIN) i (40). Od četiri opisane kategorije karcinoma, pacijenti s MSI imaju najbolju prognozu i najmanju učestalost recidiva s visokom incidencijom genskih mutacija i metilacije DNA. Bolesnici s EBV-podtipom povezani su s infekcijom Epstein-Barr virusom i imaju izrazito visok status metilacije DNA. Najveći udio čini grupa s CIN podtipom karcinoma koja je sklonija kromosomskim bolestima i karakterizirana velikim brojem mutacija, a u 60% slučajeva su intestinalnog tipa. Otkriveno je da su opisani podtipovi karcinoma želuca prediktori ishoda preživljenja i odgovora na standardnu adjuvantnu kemoterapiju. Studija je pokazala da su bolesnici s podtipom CIN najviše imali koristi od adjuvantne kemoterapije dok isto nije bio slučaj u bolesnika s GS podtipom. Ova otkrića upućuju na to da su stanice karcinoma želuca podtipa GS otporne na kemoterapiju, a mutirani geni u podtipu GS mogu biti odgovorni za kemorezistenciju.

Analizom genomskih podataka iz programa TCGA pokazana je klinička važnost četiri podtipa karcinoma želuca te su razvijeni modeli predviđanja koji mogu pouzdano

stratificirati pacijente s karcinomom želuca u četiri podtipa. Opisani model predviđanja mogao bi se koristiti za identifikaciju ne samo pacijenata s lošom prognozom (GS podtip), već i onih kojima bi adjuvantna kemoterapija najviše koristila (CIN podtip). Ključni izazovi za budućnost uključivat će implementaciju ovih molekularnih otkrića u rutinsku kliničku praksu, omogućavanjem novih strategija za rano otkrivanje karcinoma želuca i ciljanih terapija za oboljele.

Većina karcinoma difuznog tipa genetski pokazuje karakteristike genomski stabilnih karcinoma dok karcinomi intestinalnog tipa uglavnom spadaju u skupinu kromosomski nestabilnih karcinoma. Također je uočena i povezanost pojedinih genetski klasificiranih skupina s anatomskom lokalizacijom tumora (Slika 2); tako su genomski stabilni karcinomi zastupljeniji u proksimalnim dijelovima želuca, a kasnije je uočena i genetska sličnost s adenokarcinomima jednjaka (41).



Slika 2. The Cancer Genome Atlas (TCGA) klasifikacija karcinoma želuca. (preuzeto iz Bonelli i sur, 2019.)

1.3. Rizični čimbenici

1.3.1. Helicobacter pylori

Iako je razvoj karcinoma želuca rezultat složenog procesa koji uključuje interakciju različitih okolišnih, infektivnih i genetskih čimbenika, više od 80% slučajeva karcinoma želuca (uz izuzetak karcinoma kardije) posljedica je kronične infekcije bakterijom *Helicobacter pylori* (Hp) (42,43).

Međunarodna agencija za istraživanje tumora Svjetske zdravstvene organizacije (eng. International Agency for Research on Cancer; IARC) je 1994. godine klasificirala je Hp u grupu I (definitivnih) karcinogena u ljudi što je potvrdila 2009. godine (44). Riječ je o bakteriji koja kolonizira želudac i može uzrokovati ulkusnu bolest i karcinom želuca, a prenosi se oralno-oralnim ili fekalno-oralnim putem (45). Otprilike 50% svjetske populacije inficirano je bakterijom *H. pylori*, a prevalencija u zemljama u razvoju doseže 70% (46). 89% slučajeva karcinoma distalnog želuca uzrokovano je kroničnom infekcijom *Helicobacter pylori* i glavni je čimbenik rizika za razvoj atrofičnog gastritisa i intestinalne metaplazije sluznice želuca. Prevalencija uvelike ovisi o geografskom položaju i socioekonomskim okolnostima (47,48). Tako je prevalencija među odraslom populacijom u razvijenim zemljama između 20% i 50%, dok u nerazvijenim državama iznosi >70% (43). Transmisija uvelike ovisi o socioekonomskim prilikama te se veže uz blizak kontakt unutar obitelji u ranom djetinjstvu. Jednom etablirana, infekcija bez antibiotskog liječenja perzistira doživotno. Unatoč velikoj prevalenciji infekcije Hp u populacijama, samo mali broj inficiranih će razviti bolest (49). Epidemiološke studije pokazale su da 15-20% ukupno inficiranih razvije ulkusnu bolest, dok između 2% i 3% inficiranih razvije karcinom želuca (5,50). Od svih karcinoma želuca (osim karcinoma kardije) oko 89% je povezano s kroničnom infekcijom HP.

Onkogeni učinci infekcije *H. pylori* dokazani su kroz dva glavna mehanizma: izravni epigenetski učinci *Helicobacter pylori* na epitelne stanice želuca i neizravno putem upalnog odgovora na želučanu sluznicu (44,51). Najvažniji čimbenik virulencije Hp je protein CagA (gen A povezan s citotoksinom) koji je povezan s teškim oblicima gastritisa i karcinomom želuca (52). Određeni sojevi *H. pylori* s faktorom virulencije CagA imaju veću vjerojatnost da će povećati rizik za razvoj adenokarcinoma želuca (47,53). Genetske varijacije u proteinu CagA također su povezane s povećanim

rizikom za razvoj epitelne hiperplazije, želučanih polipa i intestinalnog adenokarcinoma (54). Fosforilacijom ovog čimbenika virulencije u epitelnim stanicama želuca dolazi dok aktivacije Ras-ERK signalnog puta koji je važan regulator staničnog rasta, migracije i adhezije (52). Nadalje, VacA je toksin koji stvara pore u membrani te inducira vakuolizaciju i apoptozu želučanih epitelnih stanica (55). Osim CagA i VacA, pokazalo se da i drugi čimbenici virulencije, kao što su OMP (eng. outer membrane proteins) doprinose karcinogenezi želuca promicanjem kronične upale, oksidativnog stresa i oštećenja DNA (56). Smatra se da kronična upala dovodi do oksidativnog stresa i nastanka slobodnih kisikovih radikala koji zatim oštećuju DNA, povećavaju broj CD4+ T limfocita i koncentraciju proinflamatornih citokina. Sve to smanjuje sposobnost popravka DNA i posljedično povećava vjerojatnost nastanka klonalnih karcinomskih stanica (44,47,57,58).

1.3.2. Epstein-Barr

Osim *Helicobacter pylori* infekcije, Epstein-Barr virus (EBV) također je povezan s razvojem karcinoma želuca (59). Izoliran je kod otprilike 2-20% karcinoma želuca i nije u potpunosti razjašnjena uloga EBV u karcinogenezi karcinoma želuca (59,60). EBV-pozitivni karcinomi želuca tipično se javljaju u proksimalnom dijelu želuca, kod mlađih osoba, češće muškaraca (61,62). Glavna molekularna odlika ovih karcinoma je hipermetilacija promotora tumor supresorskih gena (63). Unatoč tome što im je dijagnoza postavljena u uznapredovalim stadijima, bolesnici s EBV-pozitivnim karcinomom želuca imaju bolju prognozu i bolje preživljenje u usporedbi s EBV-negativnim bolesnicima (64).

1.3.3. Krvna grupa

Osobe s krvnom grupom A imaju 1,11–1,21 puta veću vjerojatnost da će dobiti karcinom želuca nego oni s drugim krvnim grupama (65). Navedeno je nekoliko mogućih razloga za ovu vezu, kao što su promjene u želučanoj sekretornoj funkciji, intracelularni adhezijski receptori, membranska signalizacija, imunološki nadzor, upalni odgovor na *H. pylori* i kancerogene stanice te povećan rizik od perniciozne anemije (66).

Opsežna istraživanja utvrdila su jasnu vezu između čimbenika prehrane i vjerojatnosti razvoja karcinoma želuca. Prema Svjetskom fondu za istraživanje

raka/Američkom institutu za istraživanje raka (WCRF/AICR), voće i povrće pruža zaštitu od karcinoma želuca, dok životinjsko meso pečeno na žaru, hrana konzervirana u soli i dimljena hrana vjerojatno povećavaju rizik od karcinoma želuca (67). Kancerogene tvari prisutne u hrani mogu stupiti u interakciju s epitelnim stanicama želuca i dovesti do promjena u ekspresiji gena. Studije su pokazale da visok unos soli može biti štetan za želučanu sluznicu i izazvati smrt stanica, nakon čega slijedi regenerativna proliferacija stanica u životinjskim modelima (68). N-nitroso spojevi identificirani su kao endogeni ili prehrambeni čimbenici koji značajno povećavaju rizik od raka probavnog sustava, osobito distalnog karcinoma želuca (69)

1.3.4. Pušenje

Epidemiološke studije i meta-analize pokazuju da pušači imaju 1,5 do 2 puta veći rizik od razvoja karcinoma želuca od nepušača pri čemu rizik raste s učestalošću i trajanjem pušenja (70–74). Povećan rizik je jednako povezan s karcinomima kardije i distalnog dijela želuca. Pušenje dodatno povećava rizik i od prekanceroznih lezija kao što su intestinalna metaplazija i displazija (75). Također, u Hp pozitivnih miševa izloženih ovim produktima zabilježena je veća stopa karcinoma u odnosu na neizložene Hp pozitivne miševe (20).

1.3.5. Pretilost

Pretilost je dobro poznati rizični faktor za razvoj više maligniteta gastrointestinalnog sustava. Povišeni indeks tjelesne mase, a posebno morbidna pretilost (definirana kao indeks tjelesne mase veći od 35) su povezani s povećanim rizikom za razvoj karcinoma kardije, ali ne i distalnog dijela želuca (76–81). Ova povezanost raste s porastom indeksa tjelesne mase (ITM). Mogući razlog ove povezanosti su proinflamatorni citokini i adipokini koje proizvodi intraabdominalno visceralno masno tkivo (82).

1.3.6. Genetika

Osim okolišnih čimbenika u patogenezi karcinoma želuca važnu ulogu imaju i genetski čimbenici. Iako se većina karcinoma želuca javlja sporadično, 10-20% bolesnika ima članove obitelji koji su bolovali od iste bolesti, a kod njih 1-3% može se utvrditi genetski uzrok bolesti (83). Osobe s obiteljskom anamnezom karcinoma želuca imaju tri puta veću vjerojatnost da će dobiti bolest od onih s negativnom anamnezom.

Hereditarni karcinomi želuca se mogu podijeliti u 3 glavna sindroma: nasljedni difuzni karcinom želuca, adenokarcinom želuca i proksimalna polipoza želuca te obiteljski intestinalni karcinom želuca (eng. FIGC) (84). Nasljedni difuzni karcinom želuca (engl. hereditary diffuse gastric cancer, HDGC) se javlja u 1-3% slučajeva, i rezultat je mutacije gena CDH1 koji kodira staničnu adhezijsku molekulu E-kadherin odgovornu za međustaničnu interakciju i polarnost (85). Bolesnici s ovim autosomno dominantnim nasljednim sindromom imaju 70% rizik za razvoj karcinoma želuca do 80. godine života (86–92). Osobama kojima se dokaže CDH1 mutacija najčešće se predlaže profilaktička gastrektomija kao metoda liječenja. Karcinom želuca također je povezan i s drugim tumorskim sindromima kao što su Li-Fraumeni sindrom (mutacija u genu *TP53*), Peutz-Jeghers sindrom (mutacija u genu *STK11*) i sindrom obiteljske adenomatozne polipoze kolona (84,92).

1.4. Premaligne promjene i uloga upale

Premaligne promjene karcinoma želuca zajednički je naziv za visokorizična stanja za razvoj karcinoma želuca kao što su atrofični gastritis i intestinalna metaplazija (IM). Iako mehanizam karcinogeneze želuca nije u potpunosti razjašnjen, poznato je da osim genetskih uključuje i čitav niz epigenetskih mehanizama (92,93).

Intestinalna metaplazija smatra se reverzibilnom promjenom gdje je zreli želučani epitel zamijenjen epitelom crijeva. Intestinalna metaplazija samo po sebi nije tumorska promjena ali sadrži brojne genetske i epigenetske promjene koje mogu dovesti do razvoja karcinoma (94). Postoji nekoliko klasifikacija intestinalne metaplazije. Prema histološkom zahvaćanju sluznice želuca razlikujemo lokaliziranu i ekstenzivnu intestinalnu metaplaziju (95). Ekstenzivna zahvaća korpus i/ili antrum i incizuru angularis dok je lokalizirana intestinalna metaplazija ograničena na antrum ili incizuru. Prema histološkoj klasifikaciji i tipu mucina želučana metaplazija se dijeli na kompletnu (Tip I) i nekompletnu (Tip II i III).

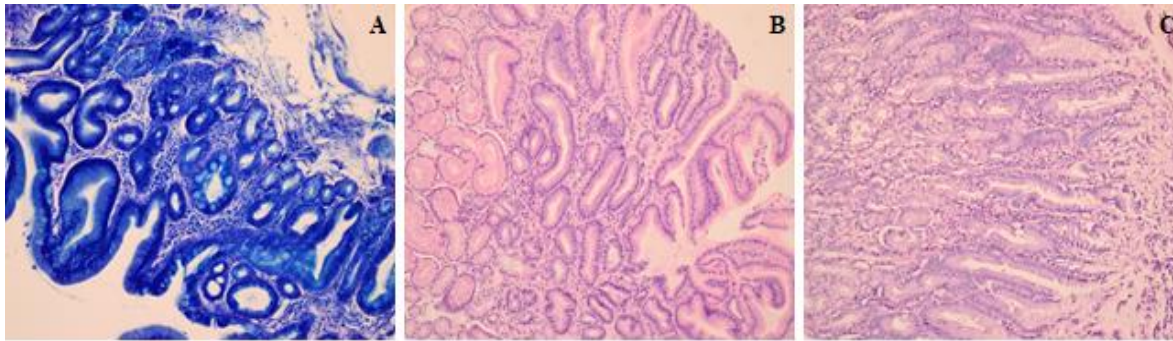
- 1) Tip I (kompletna) intestinalnu metaplaziju obilježava prisustvo vrčastih stanica koje secerniraju intestinalni sijalomucin i dobro diferenciranih neseekretornih apsorptivnih stanica. Ovaj tip metaplazije nije povezan s povećanim rizikom za razvoj karcinoma.

- 2) Tip II (nekompletna) intestinalnu metaplaziju karakterizira prisustvo cilindričnih stanica u različitim stupnjevima diferencijacije i vrčaste stanice koje izlučuju kombinaciju želučanih (neutralnih) mucina i intestinalni sijalomucin.
- 3) Tip III (nekompletna) intestinalna metaplazija se sastoji od slabo diferenciranih stanica i vrčastih stanica koje izlučuju prvenstveno sulfomucin.

Prevalencija želučane intestinalne metaplazije oscilira ovisno o incidenciji karcinoma želuca i u zemljama s visokom incidencijom iznosi 19-24%, dok u zemljama s niskom incidencijom karcinoma iznosi oko 5% (96). Prevalencija također raste s dobi i prevalencijom *Helicobacter pylori* u populaciji (97). Metaplastična žarišta često se prvo pojavljuju na spoju antruma i korpusa želuca, postupno se šireći na susjednu sluznicu (98). Rizik od karcinoma želuca veći je kod pojedinaca s nepotpunim u odnosu na potpuni oblik intestinalne metaplazije na histološkom pregledu, ekstenzivnim u odnosu na ograničeni oblik i onima s obiteljskom anamnezom karcinoma želuca (99,100). S vremenom intestinalna metaplazija može dovesti do kaskade histopatoloških promjena u sluznici želuca koje rezultiraju displazijom i razvojem karcinoma in situ.

Kronični atrofični gastritis se također smatra jednim predstadijem u procesu karcinogeneze. Definiran je kao stanjivanje mukoze i gubitak visoko specijaliziranih stanica želučanih žlijezda (101). Godišnja incidencija progresije atrofičnog gastritisa u karcinom želuca varira ovisno o studiji, između 0,1% i 1% (42,102–105), pri čemu je uočena pozitivna korelacija između površine želuca zahvaćene promjenama i pojavnosti karcinoma (106–108). Etiološki gledano, postoje dva tipa kroničnog atrofičnog gastritisa: znatno češći multifokalni atrofični gastritis uzrokovan okolišnim čimbenicima, prije svega Hp infekcijom, te autoimuni atrofični gastritis koji je posljedica stvaranja protutijela na parijetalne stanice želuca i intrinzični faktor. Potonji najčešće zahvaća tijelo želuca i obilježen je smanjenom sekrecijom želučane kiseline i pepsinogena te posljedičnim razvojem perniciozne anemije. Iako je uočen povećan rizik za razvoj karcinoma želuca, on je daleko manji od rizika kod gastritisa inducirano Hp-om (109,110). Mogući razlog je blaži stupanj upale koji se redovito vidi u autoimunom gastritisu. Pretpostavlja se da atrofični gastritis, neovisno o svojoj etiologiji, dovodi do hipoklorhidrije, u težim oblicima i aklorhidrije, čime je narušena

primarna barijera imunološkog sustava i omogućen nesmetan razvoj bakterija. Bakterije potom dovode do povećane produkcije karcinogenih N-nitrozo spojeva. Također, kao odgovor na smanjenu produkciju želučane kiseline dolazi do povećane sekrecije gastrina, dobro poznatog čimbenika rasta, čije kontinuirano visoke koncentracije mogu dovesti do abnormalne proliferacije i zloćudne transformacije (111,112).



Slika 3. Histološki izgled sluznice želuca koji pokazuje promjene epitela. (A) intestinalna metaplazija - nalaze se stanice intestinalnog tipa epitela te vrčaste „goblet“ stanice (Giemsa x200); **(B)** blaga displazija epitela (HE x200); **(C)** displazija epitela koja prelazi u karcinom (HE x200)

1.4.1. Želučani polipi

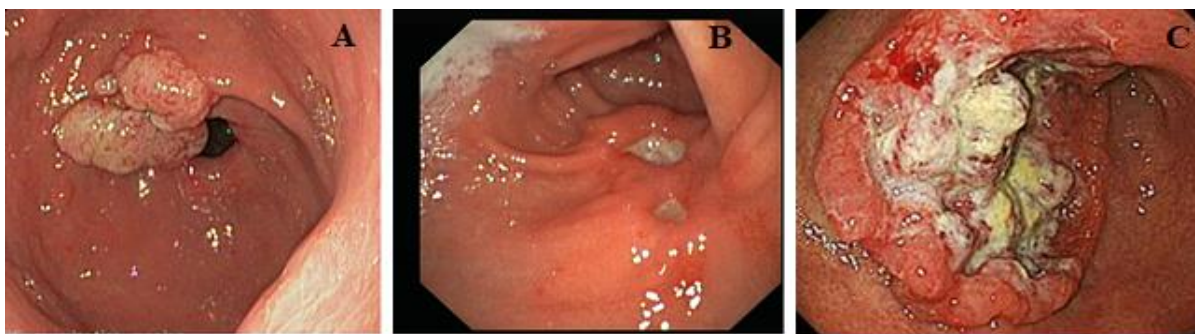
Prevalencija polipa želuca u općoj populaciji je između 0,8% i 2,4% (113,114). Oko 50% polipa su polipi fundusnih žlijezda, 40% otpada na hiperplastične polipe, a svega 10% na adenomatozne polipe (114,115). Polipi fundusnih žlijezda su najčešće benigne naravi te se češće viđaju u osoba koje koriste inhibitore protonske pumpe (116). Procjenjuje se da se maligna transformacija ovih polipa događa u svega 1% slučajeva i to većinom u polipa većih od 1cm (117). Iznimka su polipi fundusnih žlijezda koji se javljaju u sklopu obiteljske adenomatozne polipoze kolona gdje je displazija prisutna u oko 40% bolesnika s prisutnom polipozom želuca (118). Hiperplastični polipi su također najčešće benigni, često multipli te se povezuju sa stanjima kronične upale. Tijekom vremena mogu regredirati, ostati nepromijenjeni ili se povećati. Regresija često uslijedi nakon eradikacije Hp. Ovi polipi rijetko maligno alteriraju (119). Adenomatozni polipi želuca (Slika 4A), za razliku od prethodna dva tipa, imaju visoku stopu maligne alteracije. Procjenjuje se da će 11% ovih lezija progredirati do *in situ*

karcinoma unutar 4 godine (120). Stoga smjernice Britanskog gastroenterološkog godda

društva sugeriraju uklanjanje svih adenoma želuca kao i polipa s detektiranom displazijom (121).

1.4.2. Želučani ulkusi

Iako etiopatogeneza nije sasvim razjašnjena, anamneza želučanog ulkusa (Slika 4B) je povezana s 1,8 puta većim rizikom za razvoj karcinoma distalnog dijela želuca (122). Povezanost s karcinomima kardije želuca nije pronađena. Zanimljivo je da je postojanje duodenalnog ulkusa povezano sa smanjenim rizikom za razvoj karcinoma želuca (123).



Slika 4. Endoskopske slike. (A) polip želuca; **(B)** ulkus želuca; **(C)** karcinom želuca

1.5. Kliničke karakteristike karcinoma želuca

Najčešći simptomi bolesnika s karcinomom želuca su gubitak na tjelesnoj masi i bolovi u abdomenu (Tablica 1). Do gubitka tjelesne mase dolazi primarno zbog smanjenog kalorijskog unosa uslijed inapetencije, mučnine, osjećaja rane sitosti ili straha od nelagode i bolova koju konzumacija hrane može uzrokovati. Bolovi su uglavnom nespecifični i variraju od blage povremene nelagode u epigastriju do konstantnih jakih bolova, uglavnom kod uznapredovale bolesti (124). Ponekad su bolovi nalik onima kod bolesnika s peptičkim ulkusima, a očituju se postprandijalnim bolovima i osjećajem punoće u epigastriju te učestalim podrigivanjem (125,126).

Klinička prezentacija ovisi i o anatomskej lokalizaciji bolesti. Kod dijela bolesnika, češće onih s karcinomom proksimalnog dijela želuca ili karcinomom ezofagogastričnog prijelaza, glavni simptom može biti disfagija. S druge strane, kod bolesnika s karcinomom distalnog dijela želuca mogu se javiti tegobe uslijed smetnji pasaže u duodenum u vidu mučnine i/ili povraćanja. Povraćanje i mučnina mogu biti i prvi znakovi difuznih karcinoma želuca, a javljaju se zbog infiltracije stijenke želuca tumorskom masom i posljedičnom smanjenom sposobnosti distenzije.

Dio bolesnika s karcinomom želuca prezentira se krvarenjem iz gastrointestinalnog sustava. Krvarenje može biti okultno, ali i manifestno u obliku hematemeze ili melene (127).

Kod bolesnika s proširenom bolesti simptomatologija je često posljedica proširene maligne bolesti. Kod peritonealne diseminacije bolesnici se često prezentiraju s ascitesom, a kod udaljenih metastaza u jetru prvi simptom može biti žutica (128). Proširena metastatska bolest može se očitovati kao limfadenopatija, tipično u lijevu supraklavikularnu grupu limfnih čvorova (Virchowljev limfni čvor) (129).

Rjeđe se kod bolesnika može razviti paraneoplastički sindrom u vidu tromboflebitisa, neuropatije ili diseminirana intravaskularne koagulacije (130).

Tablica 1. Učestalost kliničkih simptoma i znakova karcinoma želuca

Simptomi bolesnika s karcinomom želuca	Postotak (%)
gubitak na tjelesnoj masi	62
bolovi u abdomenu	52
mučnina	34
disfagija	26
melena	20
osjećaj rane sitosti	18
simptomi slični onima kod ulkusne bolesti	17

1.6. Dijagnostika karcinoma želuca

Najvažnija dijagnostička metoda za potvrdu adenokarcinoma želuca je ezofagogastroeduodenoskopija (EGD) s obzirom na to da se konačna dijagnoza postavlja na temelju patohistološkog nalaza. Prednost EGD je točna lokalizacija tumorske promjene i uzimanje bioptičkih uzoraka suspektne promjena želučane sluznice (131). Makroskopski suspektne neoplastične lezije mogu biti morfološki različite, a prema pariškoj klasifikaciji dijele se u one iznad razine, u razini i ispod razine sluznice (132).

Tipični karcinomi želuca izgledaju kao egzulcerirane vulnerabilne mase neravnih, zadebljanih rubova (Slika 4C), no u čak do 5% naizgled dobroćudnih ulkusnih promjena patohistološki se potvrde zloćudne stanice. Iz tog razloga je nužno bioptirati svaki želučani ulkus, osobito one koji ne cijele te se preporučuje uzimanje multiplih bioptičkih uzoraka s ruba lezije, povećavajući na taj način osjetljivost pretrage (131,132). Poseban dijagnostički izazov predstavljaju karcinomi sa submukoznim širenjem (*linitis plastica*) kod kojih sluznica može imati uredan izgled i jedini patološki nalaz može biti smanjena distenzija želuca kod insuflacije zraka (131).

Endoskopski ultrazvuk (EUS), kompjuterizirana tomografija (CT), magnetska rezonancija (MR) i pozitronska emisijska tomografija (PET/FDG) u pravilu se ne koriste za postavljanje dijagnoze karcinoma želuca, no korisne su metode za određivanje stadija bolesti i praćenje odgovora bolesti na liječenje (133).

Tumorski biljezi koji se koriste u kliničkoj praksi poput karcinoembrinalnog antigena (CEA), tumorskih antigena CA 19-9, CA 125, CA 72-4, alfa fetoproteina (AFP) ili pepsinogena nisu dovoljno osjetljivi niti specifični za postavljanje dijagnoze karcinoma želuca, uzimajući u obzir da se javljaju i kod drugih tumora epitelnog podrijetla, no imaju primjenu u praćenju odgovora bolesnika na terapiju (134,135).

1.7. Klasifikacija i stupnjevanje karcinoma želuca

Maligni epitelni tumori želuca se prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2019. godine dijele u nekoliko velikih skupina: adenokarcinomi, karcinomi pločastih stanica, adenoskvamozni karcinomi, nediferencirani karcinomi,

gastroblastomi, neuroendokrini tumori, neuroendokrini karcinomi i miješane neuroendokrine i neneuroendokrine neoplazme (136). Unutar svake od navedenih velikih grupa postoje brojni podtipovi (136).

Od svih zloćudnih novotvorina želuca, adenokarcinomi čine 85% (137). Najčešći podtipovi adenokarcinoma su tubularni adenokarcinomi i čine oko 45% adenokarcinoma u europskim zemljama, malo manje od 10% čine papilarni adenokarcinomi, dok slabo kohezivni adenokarcinomi, karcinomi stanica prstena pečatnjaka i svi ostali podtipovi kumulativno čine do 50% svih adenokarcinoma želuca (Tablica 2) (136).

Tablica 2. Podjela karcinoma želuca prema tipu stanica od kojih su nastali po klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2019. (WHO, 2019)

WHO klasifikacija tumora želuca
Adenokarcinom
Tubularni adenokarcinom Karcinom parijetalnih stanica Adenokarcinom s miješanim podtipovima Papilarni adenokarcinom Mikropapilarni karcinom Mukoepidermoidni karcinom Mucinozni adenokarcinom Karcinom stanica prstena pečatnjaka Slabo kohezivni karcinom Medularni karcinom s limfoidnom stromom Hepatoidni adenokarcinom Karcinom Panethovih stanica
Karcinom pločastih stanica
Adenoskvamozni karcinom
Nediferencirani karcinom
Karcinom velikih stanica s rabdoidnim fenotipom Pleomorfni karcinom Sarkomatoidni karcinom Karcinom s gigantskim stanicama nalik osteoklastima
Gastroblastom
Neuroendokrini tumor
Neuroendokrini tumor gradus 1 Neuroendokrini tumor gradus 2 Neuroendokrini tumor gradus 3 Gastrinom Somatostatinom Karcinoid enterokromafinih stanica Maligni karcinoid enterokromafinih stanica
Neuroendokrini karcinom
Neuroendokrini karcinom velikih stanica Neuroendokrini karcinom malih stanica
Miješana neuroendokrini i ne-neuroendokrini neoplazma (MiNEN)

Druga važna podjela karcinoma želuca koja ima implikacije na liječenje i prognozu bolesti jest podjela na rani karcinom želuca i uznapredovali karcinom želuca. Ranim karcinomom želuca smatraju se sve maligne lezije koje su ograničene na mukozu i submukozu, neovisno o postojanju eventualnih metastaza, dok se svaka lezija koja infiltrira mišićni sloj smatra uznapredovalim karcinomom želuca. Koncept datira iz 60-ih godina kada je u Japanu započet sustavni probir rizičnih skupina zbog visoke incidencije karcinoma želuca (138).

Većina ranih karcinoma želuca su veličinom male lezije (u prosjeku 2-5 cm) i anatomski su češće lokalizirani na maloj krivini i oko angulusa, no mogu biti i multifokalni što je često povezano s lošijom prognozom. Makroskopski se dijele prema pariškoj klasifikaciji kao i sve druge površinske neoplastične lezije probavnog trakta. Histološki, uobičajene forme ranog karcinoma želuca su dobro diferencirane, uglavnom tubularne i papilarne arhitekture, no razlikovanje dobro diferenciranog karcinoma i displazije visokog stupnja ili *in situ* karcinoma može biti izazovno (139). Upravo razlikama u histološkoj interpretaciji se djelomično može pripisati značajna razlika u incidenciji ranog karcinoma u studijama iz azijskih centara u odnosu na zapadnjačke centre. Zapadnjački patolozi tipično uzimaju invaziju *laminae propriae* odlučujućim faktorom za dijagnozu karcinoma, dok to nije nužan uvjet u azijskim centrima. Kako bi se maksimalno uniformirali nalazi među različitim centrima formulirana je bečka klasifikacija gastrointestinalnih epitelnih neoplazija u kojoj je prepoznato nekoliko kategorija (140):

- kategorija 1: negativno na neoplaziju/displaziju
- kategorija 2: neodređeno za neoplaziju/displaziju
- kategorija 3: neinvazivna neoplazija niskog stupnja (adenom/displazija niskog stupnja)
- kategorija 4: neinvazivna neoplazija visokog stupnja
 - 4.1: adenom/displazija visokog stupnja
 - 4.2: neinvazivni karcinom (*in situ* karcinom)
 - 4.3: suspektan invazivni karcinom
- kategorija 5: invazivna neoplazija
 - 5.1: intramukozni karcinom (invazija)

1.8. Procjena stadija karcinoma želuca

Procjena stupnja proširenosti bolesti (eng. *staging*) ima za cilj grupirati bolesnike s karcinomom želuca u dvije skupine – one s lokoregionalnom bolesti koji su potencijalno izlječivi (stadij I-III) i one s lokalno uznapredovalom (neresektabilnom) i metastatskom bolesti (stadij IV). Najrašireniji sustav procjene proširenosti bolesti je TNM klasifikacija koju su razvili American Joint Committee on Cancer (AJCC) i Union for International Cancer Control (UICC): „T“ označava primarni tumor i odnosi se na dubinu invazije tumora kroz stijenku želuca i zahvaćanje okolnih struktura, „N“ označava zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, dok „M“ karakterizira prisutnost udaljenih metastaza (Tablica 3) (141). U kategoriju okolnih struktura ubrajaju se slezena, transverzalni kolon, jetra, dijafragma, gušterača, trbušna stijenka, nadbubrežne žlijezde i bubrezi, tanko crijevo i retroperitoneum. U regionalne limfne čvorove ubrajaju se limfni čvorovi uz malu i veliku krivinu želuca, limfni čvorovi oko lijeve gastične arterije, hepatalne i lijenalne arterije, trunkusa celijakusa te limfni čvorovi u hepatoduodenalnom ligamentu, dok se zahvaćenost ostalih intraabdominalnih limfnih čvorova kategorizira kao udaljena metastaza. Udaljenim metastazama, osim neregionalnih limfnih čvorova i udaljenih hematogenih metastaza, smatraju se i peritonealne presadnice, pozitivan nalaz malignih stanica u ascitesu i tumori omentuma koji nisu u kontinuitetu s primarnim tumorom (142).

Tablica 3. Pregled TNM klasifikacije karcinoma želuca prema smjernicama AJCC Cancer Staging Manual 2017

Primarni tumor (T)	
TX	primarni tumor se ne može procijeniti
T0	primarni tumor nije dokazan
Tis	<i>in situ</i> karcinom
T1	tumor invadira laminu propriju, muskularis mukoze ili submukozu
T1a	tumor invadira laminu propriju ili muskularis mukoze
T1b	tumor invadira submukozu
T2	tumor invadira muskularis propriju
T3	tumor penetrira subserozno vezivno tkivo bez invazije visceralnog peritoneja ili okolnih struktura
T4	tumor invadira visceralni peritonej ili okolne strukture
T4a	tumor invadira visceralni peritonej
T4b	tumor invadira okolne strukture
Regionalni limfni čvorovi (N)	
NX	regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
N0	bez metastaza u regionalne limfne čvorove
N1	metastaze u 1-2 regionalna limfna čvora
N2	metastaza u 3-6 regionalnih limfnih čvorova
N3	metastaze u 7 i više u regionalnih limfnih čvorova
N3a	metastaze u 7-15 u regionalnih limfnih čvorova
N3b	metastaze u 16 i više u regionalnih limfnih čvorova
Udaljene metastaze (M)	
M1	bez udaljenih metastaza
M2	prisutne su udaljene metastaze

Jedna od glavnih razlika revizije iz 2017. godine u usporedbi s onom prethodnom iz 2010. je redefinicija granice karcinoma koji zahvaćaju ezofagogastrični spoj. Prema trenutnoj klasifikaciji svi tumori ezofagogastričnog spoja s epicentrom udaljenim do 2 cm prema proksimalnom želucu ubrajaju se u tumore jednjaka, dok se oni udaljeni više od 2 cm od ezofagogastričnog spoja klasificiraju kao tumori želuca.

Osim toga, u klasifikaciju su dodane i odvojene prognostičke kategorije ovisno o kliničkom (Tablica 4) i patološkom (Tablica 5) stadiju bolesti te procjena stadija bolesti u bolesnika kod kojih je provedena neoadjuvantna terapija (143).

Tablica 4. Pregled kliničkog stadija bolesti prema kliničkom TNM (143)

Klinički stadij (cTNM)			
Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij I	T1, T2	N0	M0
Stadij IIA	T1, T2	N1, N2, N3	M0
Stadij IIB	T3, T4a	N0	M0
Stadij III	T3, T4a	N1, N2, N3	M0
Stadij IVA	T4b	Bilo koji N	M0
Stadij IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

Tablica 5. Pregled kliničkog stadija bolesti prema patohistološkom TNM (143)

Patološki stadij (pTNM)	
Stadij 0	TisN0
Stadij IA	T1N0
Stadij IB	T1N1, T2N0
Stadij IIA	T1N2, T2N1, T3N0
Stadij IIB	T1N3a, T2N2, T3N1, T4aN0
Stadij IIIA	T2N3a, T3N2, T4aN1, T4aN2, T4bN0
Stadij IIIB	T1N3b, T2N3b, T3N3a, T4aN3a, T4bN1, T4bN2
Stadij IIIC	T3N3b, T4aN3b, T4bN3a, T4bN3b
Stadij IV	Bilo koji T, bilo koji N i M1

*stadiji I-III podrazumijevaju M0

Prema preporuci europskog udruženja za medicinsku onkologiju (eng. ESMO) svi bolesnici s histološki dokazanim karcinomom želuca moraju se podvrgnuti CT snimanju toraksa, abdomen i zdjelice (oralni i i.v. kontrast) s ciljem otkrivanja metastatske bolesti (M stadij) (144,145). CT je široko dostupna i neinvazivna dijagnostička metoda koja je osobito pouzdana u otkrivanju presadnica u jetru,

adneksa i udaljene limfne čvorove. Iako se CT pokazao pouzdanim u otkrivanju udaljenih presadnica karcinoma, ograničene je pouzdanosti u procjeni sekundarizma manjih od 5 mm ili peritonealne diseminacije. Kod čak 20-30% bolesnika bez CT verificiranih znakova proširene bolesti, eksploracijom (laparoskopija ili laparotomija) su pronađene peritonealne presadnice (145,146). Isto tako, točnost CT-a kao metode za procjenu T statusa i zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova je ograničena, osobito ako su dimenzija manjih od 8 mm (147).

Endoskopski ultrazvuk (EUS) se prema važećim ESMO i NCCN smjernicama preporučuje kod većine bolesnika kod kojih CT-om nije dokazana diseminacija bolesti budući da se pokazao osjetljivim za procjenu dubine invazije tumora i eventualne zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova, a o čemu uvelike ovisi daljnje liječenje. Prednost EUS-a je i mogućnost aspiracije tankom iglom (FNA) ili aspiracijske biopsije (FNAB) suspektnih promjena tijekom postupka te moguća precizna detekcija submukozne invazije kod bolesnika s ranim karcinomom želuca (144,145). Osim toga, EUS-om se jasno može prikazati svih 5 slojeva želučane sluznice te se s oko 90%-tnom sigurnošću može razlučiti mukozna od submukozne invazije što ga čini korisnom metodom kod bolesnika s ranim karcinomom želuca (148).

MR se pokazao osjetljivijom metodom za detekciju jetrenih sekundarizama u usporedbi s CT-om (osobito onih manjih od 10 mm), no nije nađeno značajne razlike u specifičnosti (149). U 3 neovisne studije direktno su uspoređivani nalazi MR-a, CT-a i EUS-a u procjeni dubine invazije karcinoma želuca (T „staging“). Rezultati su pokazali veću specifičnost MR-a i CT-a u odnosu na EUS, dok se EUS pokazao kao osjetljivija metoda. Sveukupno su rezultati svih triju slikovnih metoda bili podjednaki ili diskretno na strani MR-a (150), no s obzirom na ograničenu dostupnost i veći trošak u hrvatskim centrima se rijetko koristi kao slikovna metoda izbora.

Pozitronska emisijska tomografija s fluordeoksiglukozom (PET/FDG) najčešće se koristi selektivno kod dvojbjenih slučajeva. Uglavnom se radi o bolesnicima kod kojih CT-om nisu sa sigurnošću potvrđene udaljene metastaze ili kod kojih postoji klinička sumnja na metastatsku bolest ali bez dijagnostičke potvrde. Ograničenje ove metode mogućnost lažno negativnih nalaza kod tumora s niskom metaboličkom aktivnosti ili onih koji ne apsorbiraju FDG kao što je slučaj s većinom adenokarcinoma želuca, a osobito difuznih karcinoma (144,148).

Dijagnostička laparoscopska eksploracija se također koristi prije liječenja s ciljem otkrivanja okultne peritonealne diseminacije kod bolesnika s promjenama većim od T1a na EUS-u, koji nema histološku potvrdu stadija IV bolesti i kojem inače ne bi bila potrebna palijativna gastrektomija zbog simptoma. Dijagnostičku laparoskopiju također je indicirana kod svakog pacijenta koji se razmatra za neoadjuvantnu terapiju (151). Laparoscopska eksploracija, iako invazivnija od CT-a ili EUS-a, ima prednost izravne vizualizacije površine jetre i peritoneuma te se može koristiti za pregled lokalnih limfnih čvorova. Između 20 i 30 posto pacijenata koji imaju negativan nalaz CT-a po pitanju proširenosti bolesti imat će peritonealne metastaze. Rizik za okultnu metastatsku bolest osobito je veći kod bolesnika s uznapredovim stadijem bolesti (T4) i kod tumora tipa linitis plastica (152,153). Kod navedenih slučajeva primjenom dijagnostičke laparoskopije može se izbjeći do 50% nepotrebnih laparotomija, a većina pacijenata kod kojih se laparoskopijom utvrdi peritonealna bolest nikada neće trebati laparotomiju ili resekciju (154).

1.9. Liječenje i prognoza

Odabir optimalne terapijske metode ovisi o stadiju bolesti i o kliničkom stanju bolesnika (ECOG kriteriji). Primarni modalitet liječenja bolesnika s karcinomom želuca još uvijek je kirurška resekcija, koja za neke bolesnike s lokoregionalnom bolesti može biti kurativna, dok se za one s uznapredovalom bolesti koristi u svrhu palijacije simptoma (smetnje pasaže ili perzistentno krvarenje iz tumora). Za tumore proksimalnog želuca ili difuzne tumore metoda izbora je totalna gastrektomija, dok se kod tumora distalnog želuca uglavnom odabire pošteniji zahvat u vidu parcijalne gastrektomije, budući da u više randomiziranih multicentričnih studija nije dokazana razlika u ukupnom preživljenju (148).

Kod svih bolesnika bez jasnog dokaza udaljene diseminacije bolesti ili invazije velikih vaskularnih struktura poput aorte, trunkusa celijakusa i hepatalne arterije indicirano je kirurško liječenje kao potencijalna kurativna metoda. Invazija distalnog dijela lijenalne arterije kao niti proširenost u limfne čvorove oko trunkusa celijakusa nisu nužno indikator neresekabilne bolesti, no ponekad je teško donijeti odluku na temelju slikovnih metoda te se kod dijela bolesnika može učiniti preoperativna ekspoloracija. S druge strane, bolesnici s peripankreatičnom, aortokavalnom,

medijastinalnom ili portalnom limfadenopatijom nisu kandidati za resekciju s obzirom na visoki rizik od prisutnih okultnih presadnica (155).

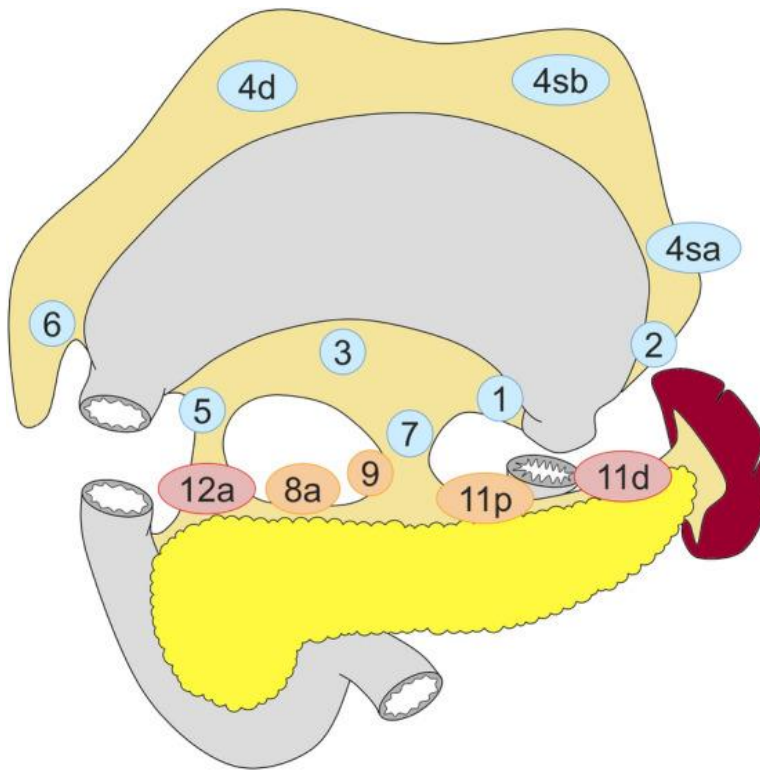
Tipovi kirurških resekcija su standardna gastrektomija s kurativnom namjerom koja uključuje odstranjenje oko 2/3 želuca s D2 limfadenektomijom. Također se može raditi o ne-standardnoj resekciji želuca koja ovisno o stadiju bolesti može biti manje ili više ekstenzivna u odnosu na standardnu. Tako kod lokalno uznapredovale bolesti može uključivati i resekciju okolnih organa s ekstenzivnom limfadenektomijom (156).

Prilikom određivanja resekcijske linije kod gastrektomije s kurativnom namjerom potrebno je osigurati dovoljan rub resekcije. Preporučuje se proksimalni rub od najmanje 3 cm za T2 ili dublje tumore s ekspanzivnim uzorkom rasta (tipovi 1 i 2) i 5 cm za one s infiltrativnim uzorkom rasta (tipovi 3 i 4). Ako se ova pravila ne mogu zadovoljiti, preporučljivo je ispitati cijelu debljinu proksimalnog ruba resekcije smrznutim presjekom. Za tumore koji infiltriraju jednjak, margina resekcije > 5 cm nije nužno potrebna, ali je poželjan pregled zamrznutog presjeka linije resekcije kako bi se osigurala R0 resekcija.

Standardni kirurški postupak za klinički pozitivne limfne čvorove (cN+) ili T2–T4a tumore je totalna ili distalna gastrektomija. Distalna gastrektomija odabire se kada se može postići zadovoljavajući rub proksimalne resekcije. Kada nije moguće dobiti čisti proksimalni rub resekcije, odabire se totalna gastrektomija. Čak i u slučaju da se može postići zadovoljavajući rub proksimalne resekcije, invazija tumora u gušteraču koja zahtijeva pankreatikosplenektomiju zahtijeva totalnu gastrektomiju bez obzira na lokaciju tumora. Totalnu gastrektomiju sa splenektomijom treba razmotriti kod tumora koji se nalaze duž velike zakrivljenosti. Za adenokarcinom ezofagogastričnog prijelaza također dolazi u obzir proksimalna gastrektomija (156).

Ekstenzivnost resekcije regionalnih limfnih čvorova kod karcinoma želuca unatrag nekoliko desetljeća uvelike je debatirana. Ključna točka rasprave bila je uravnotežiti onkološku korist u odnosu na postoperativni morbiditet i mortalitet. Među zapadnim kirurzima rasprostranjeno je mišljenje da su pozitivni limfni čvorovi pokazatelji, a ne regulatori preživljenja. Suprotno ovom stajalištu, japanski kirurzi su pokazali da opsežna limfadenektomija dovodi do boljeg preživljenja zahvaljujući boljoj kontroli loko-regionalnih recidiva i time smanjenjem incidencije udaljenih metastaza. Azijski centri bili su zagovaratelji radikalne D2 limfadenektomije (resekcija limfnih

čvorova uz trunkus celijakus, u hepatoduodenalnom ligamentu i perigastričnih limfnih čvorova) uz detaljnu patohistološku analizu preparata (Slika 5). Zapadni centri dugo su bili zagovaratelji manje radikalnog pristupa, a pokušaj repliciranja rezultata istočnih kolega rezultirao je visokom stopom morbiditeta i mortaliteta operiranih pacijenta bez pozitivnog utjecaja na preživljenje. Također, definicija D1 i D2 limfadenektomije dugo je bila nejasno definirana i ovisila je o lokalizaciji samog tumorskog procesa želuca. Prema NCCN smjernicama definicija D1/D2 grupe limfnih čvorova je sljedeća: D1 grupa limfnih čvorova obuhvaća sve perigastrične limfne čvorove uz malu i veliku krivinu želuca dok D2 grupu čine čvorovi uz arterijske ogranke truncusa celiacusa i hilus slezene. Opseg disekcije klasificira se kao D0, D1 ili D2. D0 disekcija ukazuje na nepotpunu resekciju perigastričnih limfnih čvorova, D1 predstavlja potpunu resekciju perigastričnih limfnih čvorova, a D2 predstavlja radikalnu limfadenektomiju N1 i N2 grupe regionalnih limfnih čvorova. D3 limfadenektomija osim uklanjanja limfnih čvorova grupe N1 i N2 dodatno uključuje resekciju paraaortalnih i retropankreatičnih limfnih čvorova. Multicentrične studije su pokazale dugoročno bolje preživljenje kod D2 limfadenektomije u odnosu na D1 limfadenektomiju, međutim problem leži u provođenju zaključaka studija. D1 limfadenektomija je korisna kod ranih karcinoma želuca, osobito u centrima s malim brojem pacijenata. D2 limfadenektomija je standard liječenja resektabilnih karcinoma želuca i rezervirana je za kirurge s iskustvom i velikim protokom pacijenata s ciljem smanjenja morbiditeta, mortaliteta i komplikacija postupka.



Slika 5. Limfadenektomija kod totalne gastrektomije. Limfni čvorovi označeni plavom bojom uklanjaju se kod D1 disekcije, narančastom bojom kod D1+ disekcija, a crvenom kod D2 limfadenektomije. (preuzeto iz Japanese Gastric Cancer Treatment Guidelines 2021, 6th edition)

S obzirom na činjenicu da sveukupno preživljenje bolesnika nakon kirurškog liječenja ipak nije zadovoljavajuće, vrlo važnim su se pokazali perioperativna kemoradioterapija.

Za bolesnike sa stadijem T2N0 i višim uglavnom se koristi kombinirani terapijski pristup koji osim kirurške resekcije uključuje i kemo(radio)terapiju. Adjuvantna kemoterapija nakon kirurške resekcije, čak i u slučaju resektabilne bolesti, pokazuje obećavajuće rezultate. Vrlo često kod bolesnika u kojih je napravljen potencijalno kurativan kirurški zahvat, a perioperativno je potvrđena invazija limfnih čvorova dolazi do povrata bolesti te se kod tih bolesnika provodi adjuvantna kemoterapija. Iako su rezultati vezani za preživljenje kontroverzni, u nekoliko studija je preživljenje bolesnika kod kojih je provedena adjuvantna kemoterapija bilo 15-20% veće u odnosu na one liječene samo kirurški (157).

Kod bolesnika koji zbog stadija bolesti ili lošeg kliničkog statusa nisu kandidati za kirurško liječenje provodi se kemoterapija kao monoterapija ili konkomitantno s radioterapijom.

Neoadjuvantna kemo(radio)terapija za cilj ima takozvani „downstaging“, odnosno smanjenje tumorske mase do razine kada bolest postaje potencijalno kurativna ili može biti od koristi kod bolesnika za koje je procijenjen visoki rizik od razvoja udaljenih metastaza (veliki T3/T4 tumori, pozitivni perigastrični limfni čvorovi) budući da se kod jednog dijela bolesnika u međuvremenu ipak verificiraju udaljene metastaze te ih se na taj način poštedi nepotrebnog kirurškog zahvata (132).

Zračenje kao monoterapija ima ograničenu primjenu u liječenju karcinoma želuca primarno zbog toga što su adenokarcinomi želuca relativno radiorezistentni tumori, a primjena visokih/adekvatnih doza iradijacije, zbog anatomske lokalizacije i niske tolerancije okolnih struktura na zračenje, nije moguća. Pokazalo se i da zračenje kao adjuvantna monoterapija nema utjecaja na dulje preživljenje bolesnika (158).

Kod bolesnika s ranim karcinomom želuca dodatni modalitet liječenja je endoskopska resekcija u vidu endoskopske mukozne resekcije ili endoskopske submukozne disekcije. Endoskopska resekcija je pogodna je za bolesnike kod kojih je procijenjeni rizik od proširenosti bolesti mali i kod kojih je zahvat vrlo vjerojatno kurativan. To su najčešće bolesnici s neulceriranim dobro diferenciranim lezijama manjim od 2 cm kod kojih nije verificirana limfokapilarna invazija (159).

Prognoza bolesnika s karcinomom želuca direktno ovisi o kliničkom stadiju bolesti (Tablica 6) i općenito je loša jer se bolest u čak do 50% bolesnika otkrije u uznapredovalom stadiju. Sveukupna 5-godišnja stopa preživljenja kod karcinoma želuca u SAD-u je samo 27% (132).

Tablica 6. Stope petogodišnjeg preživljenja bolesnika s karcinomom želuca ovisno o kliničkom stadiju, u nekoliko razvijenih zemalja

Stadij bolesti	Japan	Njemačka	SAD
IA	95 %	86 %	78 %
IB	75 %	72 %	58 %
II	46 %	47 %	34 %
IIIA	48 %	34 %	20 %
IIIB	18 %	25 %	8 %
IV	5 %	16 %	7 %

1.10. Karcinom-testis antigeni

Otkrivanje bolesti u uznapredovalom stadiju, heterogenost tumora i veliki metastatski potencijal razlozi su loše prognoze karcinoma želuca (160,161). Terapijske mogućnosti kod ovog karcinoma uglavnom su ograničene na radikalno kirurško liječenje i kemoradioterapiju s često lošim ishodom (162). Dijagnoza bolesti u uznapredovalom stadiju kod većine bolesnika dodatni je čimbenik koji ograničava terapijske mogućnosti. S ciljem pravovremene dijagnoze i poboljšanja ishoda ove bolesti traže se markeri koji bi ukazivali na rani stadij karcinoma, kao i ciljane molekule na koje bi se moglo terapijski djelovati i pospješiti liječenje već proširene bolesti.

Otkrićem tumor specifičnih antigena u središte pažnje dovedena je mogućnost imunoterapije koja se zbog svoje specifičnosti i niske toksičnosti predstavlja kao alternativna terapija kod različitih tumora. Tumorskim antigenom može se smatrati bilo koja molekula iz tumorske stanice koju imunološki sustav prepoznaje kao stranu, odnosno protiv koje može nastati protutumorska imunološka reakcija. Kao i na ostale antigene, imunološka reakcija na tumor može biti stanična i/ili humoralna. Da bi bio dobar kandidat za tumorsku imunoterapiju, tumorski marker bi trebao biti selektivno izražen na tumorskim stanicama, odsutan iz normalnih somatskih stanica i neophodan za preživljavanje tumorskih stanica.

Poznato je dan neki oblici raka mogu izazvati imunološki odgovor u ljudskom tijelu (163,164). Tijekom posljednjih desetljeća, imunoterapijske metode za liječenje raznih karcinoma, prvenstveno inhibitori imunoloških kontrolnih točaka i onkovakcine, pokazale su se uspješnim i implementirane su u standardno medicinsko liječenje (165).

Karcinom-testis antigeni (eng. Cancer-testis antigens, CTA) prvi su put otkriveni 1991. godine na stanicama melanoma (166). Pojam „cancer-testis antigen“ (CTA) predložio je Chen i sur. zbog njihove ograničene izraženosti na testis (167).

Riječ je o obitelji karcinom-testis antigena koji su izraženi u brojnim tumorima kod ljudi, dok je njihova ekspresija u zrelih tkivima ograničena na imunološki privilegirane spermatogonije, stanice trofoblasta i ovarij (168–171). Dije se u skupinu antigena koja je kodirana na X kromosomu (X-CTA geni) i skupinu koja nije kodirana na X kromosomu (171). Gotovo polovica tumor/testis antigena (CTA) kodirano je na X

kromosomu i čine oko 10% gena X kromosoma (171). Ovi antigeni su za razliku od grupe II tumor specifični.

CTA su široko i varijabilno raspoređeni među tumorima različitih histoloških tipova. Dostupni podaci uglavnom se temelje na analizi njihovih transkripata i pokazuju da ekspresija CTA uvelike varira među vrstama tumora. Prema RT-PCR analizi, članovi različitih obitelji i super-obitelji CTA u velikoj su mjeri izraženi u melanomu, mokraćnom mjehuru i raku pluća nemalih stanica, umjereno izraženi u raku dojke i prostate, te slabo izraženi u raku bubrega i debelog crijeva (169,172,173).

Dok funkcija ovih CT antigena nije dovoljno razjašnjena, nedavne studije pokazale su da ti proteini sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, kontroli transkripcije i apoptozi (174). Nadalje, kao najvažniji mehanizam aktivacije ovih gena spominju se promjene u metilaciji DNA koja je kao važan epigenetski mehanizam prisutna u brojnim karcinomima (175,176).

Karcinom-testis antigeni (CTA) idealne su mete za cjepiva protiv raka zbog svoje ograničene izraženosti na tumorske stanice raznih histoloških tipova. Osim toga, CT antigeni kao što je NY-ESO-1 i MAGE-A10 imaju snažnu spontanu imunogenost kod ljudi, inducirajući integrirani odgovor koji uključuje stanične i humoralne ogranke imunološkog sustava (177). Za izradu imunogenih cjepiva koja ciljaju CT antigene, niz različitih strategija cjepiva istražuje se i uspoređuje u kliničkim ispitivanjima koja su u tijeku.

1.11. MAGE-A10

Najznačajniju skupinu karcinom-testis antigena čine tzv. „melanoma-associated antigens“ (MAGE) antigeni kodirani na X kromosomu koje su prvi put opisali Van der Bruggen i sur. 1991. godine (166,178). Riječ je o skupini od preko 60 gena koji se prema tkivnoj ekspresiji dijele na dvije skupine. MAGE-I skupina naziva se karcinom-testis antigenima i čine ju podobitelji MAGE-A, MAGE-B i MAGE-C antigena koji su kodirani na X kromosomu (171). MAGE-I antigeni su selektivno izraženi u spermatogonijama i različitim tipovima tumora te imaju važnu ulogu u tumorigenezi. Grupu MAGE-II čine geni koji nisu povezani s karcinomima, izraženi su u normalnim tkivima i imaju antitumorsko djelovanje (179).

MAGE-A obitelj antigena kodira 12 gena lociranih na kromosomu X (MAGE-A1 – MAGE-A12) (180). MAGE-1 antigen, koji je kasnije preimenovan u MAGE-A1 bio je prvi karcinom-testis antigen otkriven u stanicama melanoma 1991. godine (166). Kasnije su uslijedili i drugi članovi MAGE-A skupine (MAGE-A2, -A3, -A4, -A6, -A10 i -A12).

Dokazano je da MAGE tumorski antigeni mogu inducirati spontani humoralni i stanični imunološki odgovor organizma (181). Riječ je o antigenima koji su selektivno izraženi u spermatogonijama i brojnim tumorima te dokazano imaju imunogeno djelovanje (171,178,182). MAGE-A10 je okarakteriziran kao najimunogeniji član ove grupe antigena (zajedno s NY-ESO-1) zbog čega predstavlja privlačnu metu za potencijalnu imunoterapiju (182). Riječ je o nukleranom proteinu veličine 72-kDa koji je nađen zahvaljujući širokoreaktivnim monoklonalnim antitijelima zajedno s drugim članovima MAGE-A obitelji (183). S obzirom na sličnost u građi svih MAGE-A proteina razvijena su visokospecifična protutijela s ciljem točne identifikacije MAGE-A10 proteina u parafinskim blokovima (182). Ustanovljeno je da je visoka izraženost MAGE-A10 proteina prisutna u zloćudnim tumorima pluća, kože i urološkog podrijetla, dok je u dobroćudnim tumorima rijetko izražen (182). Isti autori su također potvrdili izraženost MAGE-A10 proteina u 22% uzoraka intestinalnog podtipa karcinoma želuca (182).

Brojne studije pokazale su povezanost izraženosti MAGE-A proteina s lošijim kliničkim ishodom. Primjerice ekspresija MAGE-A3 i -A9 proteina povezana je s lošijim preživljenjem kod bolesnika s karcinomom pluća (184,185). Kod karcinoma dojke izraženost MAGE-A3, -A6, i -C2 povezana je s estrogen receptor-negativnim ili progesteron receptor-negativnim statusom, većim gradusom tumora i lošijim ishodom (186,187).

Osim utjecaja na lošiji klinički ishod bolesnika oboljelih od raznih tumora, MAGE-A antigeni su dokazano promicatelji tumorigeneze i povećavaju invazivni potencijal tumorskih stanica *in vitro* (188,189). Onkogeno aktivnost je povezana s interakcijom MAGE-A proteina s drugim staničnim proteinima kao što su E3 ubiquitin ligaze i protein p53 te ometanjem proizvodnje fibronektina (188,190–193). Jedan od važnijih regulatornih mehanizama aktivacije *MAGE-A* gena je hipometilacija genoma koja je prisutna u stanicama brojnih malignih tumora (171,176). Tako je moguće

demetilirajućim agensima inducirati izraženost *MAGE-A* gena što govori u prilog tome da je demetilacija osnovni mehanizam transkripcijske kontrole ovih gena u tumorskim stanicama (194). S obzirom na činjenicu da neki tumori izražavaju *MAGE-A* antigene iako nisu obilježeni demetilacijom tumorskih stanica, dodatni mehanizmi kontrole ekspresije ovih gena također su uključeni u njihovu regulaciju .

Kod brojnih bolesnika s tumorima može se utvrditi spontana stanična i humoralna imunost što sugerira imunogenost samog proteina i potencijalnu korist kod tumorske imunoterapije (195,196). Relativno ograničena izraženost *MAGE-A* proteina i njihova antigenost potaknuli su istraživanja u njihovu korištenju kao meta za imunoterapije.

1.12. NY-ESO-1

NY-ESO-1 (engl. *New York esophageal squamous cell carcinoma-1*) pripada rastućoj obitelji ljudskih karcinom-testis antigena (CTA) kojeg kodira gen smješten na regiji Xq28 X kromosoma (167,197). NY-ESO-1 je izvorno pronađen i izoliran iz 58-godišnje pacijentice s planocelularnim karcinomom jednjaka u New Yorku po čemu je dobio i naziv (167). Proizvod ekspresije gena je protein od 180 aminokiselina koji sadrži N-kraj bogat glicerinom i izrazito hidrofoban C kraj (167,173,197). Ekspresija NY-ESO-1 antigena javlja se rano tijekom fetalnog razvoja (1. trimestar) u spolnim stanicama testisa (spermatogonije) i ovarija s najvećom ekspresijom u 2. trimestru koja se zatim postupno smanjuje i nestaje do 28. tjedna fetalnog razvoja (198,199). Budući da testis i ovarij ne eksprimiraju MHC molekule, NY-ESO-1 ekspresija se gubi tijekom spermatidne diferencijacije. Važno obilježje NY-ESO-1 antigena je činjenica da nije izražen u zdravim somatskim tkivima što je važno za potencijalno terapijsko djelovanje koje neće imati negativne posljedice na zdrava tkiva .

Kod karcinoma, izraženost NY-ESO-1 proteina je posljedica epigenetskih događaja koji uključuju strogo kontrolirano regrutiranje i interakciju histonskih deacetilaza, histon metiltransferaza, DNA metiltransferaze i transkripcijskih faktora (200). Posljedično dolazi do formiranja multiproteinskih kompleksa koji predstavljaju glavne čimbenike u regulaciji ekspresije NY-ESO-1 (201).

Ranijim studijama je pokazano da kod brojnih tumora dolazi do ekspresije NY-ESO-1 antigena pri čemu više od 75% pacijenata eksprimira ovaj antigen u nekoj fazi svoje bolesti (202). Najveća ekspresija NY-ESO-1 antigena pokazana je kod neuroblastoma (82%), sinovijalnog sarkoma (80%), melanoma (46%), karcinoma cerviksa (45%) i epitelnog ovarijalnog karcinoma (43%) (173,203). Važno je naglasiti da ekspresija NY-ESO-1 antigena u tumorima varira s obzirom na fenotip tumora koji se mijenja kroz stadije bolesti. Također, tumorski stadij, gradus tumora i terapijske intervencije mogu značajno usmjeriti ekspresiju NY-ESO-1 antigena u tumorskom tkivu (172,203,204). Dostupni podatci pokazuju da je ekspresija NY-ESO-1 antigena veća kod metastatskih tumora, tumora većeg gradusa i uznapredovalih stadija bolesti kao što je pokazano kod melanoma i tumora dojke (205,206). Nadalje, brojne studije su pokazale povezanost kliničkog tijeka bolesti i izraženosti NY-ESO-1 antigena. Primjerice, kod melanoma je pokazana uglavnom stabilna ekspresija antigena kroz stadije bolesti (202). Smatra se da je varijabilna ekspresija posljedica intratumorske heterogenosti, imunoeditiranja i smanjene proliferacije tumorskih stanica (204). Također, terapijske intervencije kao što su zračenje i demetilirajući lijekovi mogu dovesti do povećanog otpuštanja antigena i time usmjeriti tumorsku dinamiku (207).

Točna biološka funkcija antigena NY-ESO-1 još uvijek nije poznata iako je otkriven u spermatogonijama prije 15 godina. Do sada je ustanovljena dominantno citoplazmatska lokalizacija NY-ESO-1 proteina kod diferenciranih stanica i tumorskim staničnim linijama, dok mezenhimalne matične stanice pokazuju nuklearnu ekspresiju proteina. Iako je većinom lokaliziran u citoplazmi, neke studije su pokazale istovremenu ekspresiju NY-ESO-1 antigena u citoplazmi i u jezgri tumorskih stanica (208).

S obzirom na izazivanje spontanog humoralnog i stanično posredovanog imunološkog odgovora kod tumora koji izražavaju NY-ESO-1 antigen, od posebnog je istraživačkog interesa (204,209). Spontani imunološki odgovor predstavlja marker za odabir primatelja tumorskog cjepiva. Pokazano je da je povišen titar NY-ESO-1 antitijela pokazatelj progresije i povrata bolesti kod nekih tumora kao što su multipli mijelom, melanom i hepatocelularni karcinom (172,210). Kod pacijenata s karcinomom želuca i kolorektalnim karcinomom pokazana je regresija humoralnog odgovora na NY-ESO-1 antigen u slučajevima bez relapsa bolesti što pokazuje vezu između kliničkog stadija bolesti i humoralnog odgovora na NY-ESO-1 (211,212).

Također, spontani humoralni odgovor na NY-ESO-u kombinaciji s konvencionalnim tumorskim markerima pokazao se kao koristan tumorski marker za detekciju uznapredovalog karcinoma želuca kod seropozitivnih pacijenata (212). Brojne studije su pokazale da je NY-ESO-1 titar dobar surogat marker za odgovor karcinoma na terapiju kod multiplog mijeloma, hepatocelularnog karcinoma i karcinoma želuca (212).

Važno je naglasiti da cirkulirajuća antitijela nisu dovoljna za antitumorski učinak već integrirani humoralni te CD4+ i CD8+ T stanični odgovor organizma. Pokazano je da terapijom induciran odgovor na NY-ESO-1 (cijepljenje) za razliku od prirodnog imunološkog odgovora može inducirati ovaj integrirani imunološki učinak i pridonijeti kontroli tumorske bolesti (173).

2. HIPOTEZA

U primarnim adenokarcinomima želuca s metastazama u limfne čvorove povećana je imunohistokemijska izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10 antigena u odnosu na primarne adenokarcinome želuca bez metastaza u limfne čvorove.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj

Odrediti i usporediti imunohistokemijsku izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10 u primarnom adenokarcinomu želuca s i bez metastaza u limfne čvorove te usporediti njihovu izraženost s različitim kliničkim i patohistološkim parametrima.

3.2. Specifični ciljevi

1. Odrediti izraženost NY-ESO-1 u primarnom adenokarcinomu želuca s i bez metastaza u limfne čvorove.
2. Odrediti izraženost MAGE-A10 u primarnom adenokarcinomu želuca s i bez metastaza u limfne čvorove.
3. Usporediti izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10 u primarnim adenokarcinomima želuca s i bez metastaza u limfne čvorove.
4. Usporediti izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10 s karakteristikama tumora: veličinom, dubinom invazije (pT stadij) tumora, vaskularnom invazijom, perineuralnom invazijom, statusom regionalnih limfnih čvorova (pN stadij), histološkim tipom tumora (WHO klasifikacija iz 2019. godine).
5. Usporediti izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10 s kliničkim parametrima: dob, spol, preživljenje.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Bolesnici i uzorci tkiva

Provedena je presječna studija s retrospektivno uzetim podacima u razdoblju od 01.01.2005. do 31.12.2015. godine nakon terapijske resekcije želuca i regionalnih limfnih čvorova (D1+ limfadenektomija s minimalno 15 izoliranih i patohistološki pregledanih limfnih čvorova) bolesnika s histološki potvrđenom dijagnozom adenokarcinoma želuca u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Istraživanje je obuhvatilo 108 uzoraka karcinoma želuca od čega su 53 uzorka karcinoma želuca bez prisutnih regionalnih metastatskih limfnih čvorova (N0) te 55 uzoraka karcinoma želuca koji su razvili metastaze u limfne čvorove (N+). Podatci o bolesnicima i histološkim karakteristikama karcinoma želuca prikupljeni su iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Klinike za kirurgiju KBC Sestre milosrdnice te iz arhive Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ). Iz patološkog nalaza bolesnika preuzeti su podaci o dobi i spolu bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze te histološke karakteristike karcinoma želuca: veličina tumora, histološki tip tumora, patološki TNM stadij bolesti (pTNM), prisutnost perineuralne i vaskularne invazije, dok smo iz povijesti bolesti bolesnika prikupili demografske i kliničke parametre. Podatak o vremenu do konačnog smrtnog ishoda bolesnika smo preuzeli iz baze podataka HZJZ-a. Datum operacije uzet je kao nulto vrijeme, a zadnja provjera konačnog ishoda bolesti obavljena je 10. studenog 2019. godine. Za četiri bolesnika nismo uspjeli prikupiti podatak o ishodu bolesti.

U istraživanju nismo koristiti osobne podatke koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost bolesnika.

4.2. Metode

Materijal dobiven operativnim zahvatom je obrađen standardnom histološkom obradom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10 % puferiranom formalinu, dehidriranje u uzlaznom nizu alkohola, uklapanje u parafinske blokove te arhiviranje parafinskih kocki.

Područje analize određeno je pregledavanjem svih uzoraka tumora na malom povećanju ($\times 40$) na HE prerezima. Odabrani reprezentativni uzorci tumora iz više donorskih blokova određenih za tkivni mikropostroj (eng. *tissue microarray*) iglom su prebačeni u novi blok stvarajući više uzoraka u jednom parafinskom bloku (mikropostroj). Iz tako dobivenih parafinskih blokova s multiplim uzorcima tumora rezani su rezovi tkiva debljine 5 μm , deparafinirani i rehidrirani kroz ksilol i silazni niz alkohola do vode. Materijal je nakon imunohistokemijskog bojenja u cijelosti analiziran, a izraženost protutijela određena je na minimalno 1000 stanica pod velikim vidnim povećanjem mikroskopa ($\times 400$), na mjestu najjače reakcije (tzv. "hot spot").

Za imunohistokemijsku analizu koristili smo primarno monoklono zečje protutijelo na MAGE-A10 i monoklono zečje protutijelo na NY-ESO-1 (dar prof. Spagnolija, Sveučilište u Baselu, Švicarska) (213,214)1). Imunohistokemijska analiza za navedena protutijela učinjena je indirektnom ABC tehnikom, LSAB metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate TM automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaze protokola prema preporuci proizvođača.

Imunohistokemijska reakcija na MAGE-A10 i NY-ESO-1 određena je semikvantitativno uzimajući u obzir intenzitet reakcije kako slijedi:

- intenzitet reakcije označen kao „0“ predstavlja odsutnost reakcije;
- intenzitet reakcije označen kao „1“ slabo izraženu reakciju;
- intenzitet reakcije označen kao „2“ umjereno izraženu reakciju;
- intenzitet reakcije označen kao „3“ jako izraženu reakciju.

Postotak imunoreaktivnih stanica određen je kako slijedi:

- „0“, nema reaktivnih stanica;
- „1“, do 10 % pozitivnih stanica;
- „2“, > 10-50 % pozitivnih stanica;
- „3“, > 50 % pozitivnih stanica.

Evaluacija imunohistokemijske reakcije provedena je određivanjem imunohistokemijskog indeksa bojanja kako su predložili Remmele i Stegner(215)2). Imunohistokemijski indeks bojenja (IIB) dobiven je kao umnožak intenziteta bojenja (IB) i postotka reaktivnih stanica (PRS): $IIB=IR \times PRS$, a iznosi od 0 do 9. IIB 0 predstavlja odsustvo reakcije, IIB 1-4 predstavlja slabu, a IIB 5-9 predstavlja jaku izraženost.

4.3. Statistička analiza

Inicijalno je učinjena opisna statistika, a podaci su prikazani tablično i grafički. Distribucija podataka analizirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Većina varijabli nije pratila normalnu distribuciju. Kontinuirane varijable izražene su medijanom i interkvartilnim rasponom (25% - 75%), i analizirane su Kruskal-Wallisovim testom, ili Mann-Whitneyevim testom. Kategoričke varijable su uspoređene Chi-kvadrat testom uz Yatesovu korekciju. Krivulje preživljenja su kreirane Kaplan-Meierovom metodom, a razlike između pojedinih skupina su dodatno uspoređene Log-Rank testom.

Analiza povezanosti pojedinih parametara s preživljenjem učinjena je Coxovom regresijom. Binarna logistička regresija je korištena kako bi se analizirala povezanost pojedinih parametara i dvogodišnjeg preživljenja. Dvogodišnje razdoblje odabrano je za analizu preživljenja s obzirom na činjenicu da je nakon 2 godine praćenja 55% sudionika bilo živo što je omogućilo dovoljan broj sudionika za adekvatnu procjenu utjecaja proćavanih parametara na preživljenje. Cilj dvostruke analize preživljenja bio je određivanje prediktivne vrijednosti pojedinog parametra. Višestruka regresija je korištena u svim oblicima regresijske analize (Coxovoj regresiji i binarnoj logističkoj regresiji) kako bi se utvrdilo postoji li neovisna povezanost s preživljenjem, odnosno kako bi se učinila korekcija za ometajuće čimbenike. Prilikom izvođenja višestruke regresije (istovremena analiza nekoliko parametara) korišten je model postepene retrogradne uvjetovane regresije (eng. *backward stepwise conditional regression*). U postupku multivarijatne analize je u svakom pojedinom modelu korišteno najviše 6 varijabli, što je primjereno veličini uzorka. U multivarijatnu analizu uvrštene su samo varijable koje su pokazale statistički značajnu razliku u univarijatnoj analizi. S ciljem povezivanja prediktivne vrijednosti svakog parametra koji se pokazao neovisnim prognostičkim čimbenikom, konstruirana je regresijska jednadžba sastavljena od nestandardiziranih koeficijenata multivarijatne analize za svaki pojedini prediktivni čimbenik. Konačno, *Receiver operating characteristic* (ROC) analiza je korištena kako bi se analizirala prediktivna vrijednost pojedinog parametra, odnosno regresijske jednadžbe u predikciji dvogodišnjeg preživljenja.

Statistička analiza učinjena je uz programsku podršku SPSS verzija 20.0. Za granicu statističke značajnosti određena je vrijednost $p = 0.05$.

5. REZULTATI

5.1. Osnovne antropometrijske i patohistološke karakteristike

Istraživanje je provedeno na 108 uzoraka bolesnika s primarnim karcinomom želuca. U Tablici 7 prikazane su njihove osnovne karakteristike.

Tablica 7. Značajke bolesnika i patohistološke karakteristike karcinoma želuca uključenih u istraživanje

		Broj slučajeva (%)
Dob (godine), medijan (raspon)	68 (59-75)	
Spol, n (%)	Muški	54 (50)
	Ženski	54 (50)
Veličina tumora (cm), medijan (range)	4.1 (3.0-7.0)	
Tip tumora, n (%)	Intestinalni	38 (35.2)
	Difuzni	17 (15.7)
	Miješani	49 (45.4)
	Ostalo	4 (3.7)
T stadij, n (%)	1	23 (21.3)
	2	18 (16.7)
	3	57 (52.8)
	4	10 (9.2)
N stadij, n (%)	0	53 (49.1)
	1	16 (14.8)
	2	22 (20.4)
Vaskularna invazija, n (%)	3	17 (15.7)
	Ne	74 (68.5)
Perineuralna invazija, n (%)	Da	34 (31.5)
	Ne	68 (63.0)
Perineuralna invazija, n (%)	Da	40 (37.0)

Medijan dobi bolesnika uključenih u istraživanje u vrijeme postavljanja dijagnoze bio je 68 (59-75) godina. U jednakom udjelu bili su zastupljeni bolesnici oba spola. Miješani tip je bio najčešći histološki tip tumora (49, 45.4%), a potom su slijedili intestinalni (38, 35.2%) i difuzni (17, 15.7%). Medijan veličine tumora iznosio je 4,1 (3.0 - 7.0) cm. Vaskularna invazija je bila prisutna u 34 (31.5%), a perineuralna u 40 (37.0%) ispitanika. Metastaze u limfne čvorove su bile prisutne u 55 (50.9%) ispitanika, a negativni limfni čvorovi u 49,1% slučajeva. Bolesnici su u 38% slučajeva imali karcinome ograničene na sluznicu i dosluznicu želuca (T1 i T2).

Medijan preživljenja iznosio je 31.0 (13.3 – 48.7) mjesec. Preživljenje u prvoj godini iznosilo je 75% (75/100), nakon dvije godine 55% (55/100), a nakon 5 godina 23% (23/100).

Mlađa životna dob je bila značajno povezana s višim N statusom te s perineuralnom invazijom tumora. Očekivano, viši T i N status su bili povezani s perineuralnom i vaskularnom invazijom, a također su T i N status bili međusobno povezani. Nije nađeno značajne povezanosti spola s proučavanim parametrima (Tablica 8).

Tablica 8. Međusobna korelacija osnovnih antropometrijskih parametara. Rezultati su izraženi kao Spearmanov koeficijent korelacije (gornja vrijednost) i p vrijednost.

	Dob	Spol	Veličina tumora	Vaskularna invazija	Perineuralna invazija	T status	N status
Dob	1.000	-.004	-.082	-.094	-.240*	-.137	-.248**
	.	.968	.400	.331	.012	.158	.010
Spol	-.004	1.000	.061	.120	.038	-.003	.188
	.968	.	.532	.218	.694	.976	.052
Veličina	-.082	.061	1.000	.291**	.348**	.679**	.426**
	.400	.532	.	.002	.000	.000	.000
Vaskularna invazija	-.094	.120	.291**	1.000	.677**	.395**	.279**
	.331	.218	.002	.	.000	.000	.004
Perineuralna invazija	-.240*	.038	.348**	.677**	1.000	.510**	.432**
	.012	.694	.000	.000	.	.000	.000
T status	-.137	-.003	.679**	.395**	.510**	1.000	.596**
	.158	.976	.000	.000	.000	.	.000
N status	-.248**	.188	.426**	.279**	.432**	.596**	1.000
	.010	.052	.000	.004	.000	.000	.

**** korelacija je značajna pri $P < 0.001$, * korelacija je značajna pri $P < 0.05$**

Kada smo usporedili razlike između ispitanika prema tipu tumora, miješani tip tumora je imao najčešće pozitivne limfne čvorove, a nađena je i statistički značajna razlika između miješanog i intestinalnog tipa tumora (67.3% naspram 34.2%, $\chi^2=10.7$, $P=0.013$). Nije nađena značajna razlika ostalih parametara prema tipu tumora (Tablica 9).

Tablica 9. Razlike u pojedinim varijablama između različitih histoloških tipova tumora

		Tip tumora				P
		Intestinalni	Difuzni	Miješani	Ostali	
Vaskularna invazija, n (%)	Ne	29 (76.3)	12 (70.6)	29 (59.2)	4 (100.0)	0.178
	Da	9 (23.7)	5 (29.4)	20 (40.8)	0 (0.0)	
Perineuralna invazija n (%)	Ne	27 (71.1)	12 (70.6)	25 (51.0)	4 (100.0)	0.077
	Da	11 (28.9)	5 (29.4)	24 (49.0)	0 (0.0)	
Spol, n (%)	0	16 (42.1)	12 (70.6)	25 (51.0)	1 (25.0)	0.183
	1	22 (57.9)	5 (29.4)	24 (49.0)	3 (75.0)	
T status, n (%)	T1	12 (31.6)	3 (17.6)	7 (14.3)	1 (25.0)	0.481
	T2	5 (13.2)	3 (17.6)	8 (16.3)	2 (50.0)	
	T3	19 (50.0)	9 (52.9)	28 (57.1)	1 (25.0)	
	T4	2 (5.3)	2 (11.8)	6 (12.2)	0 (0.0)	
N status, n (%)	N0	25 (65.8)	9 (52.9)	16 (32.7)	3 (75.0)	0.135
	N1	3 (7.9)	2 (11.8)	11 (22.4)	0 (0.0)	
	N2	7 (18.4)	4 (23.5)	11 (22.4)	0 (0.0)	
	N3	3 (7.9)	2 (11.8)	11 (22.4)	1 (25.0)	
Limfni čvorovi, n (%)	Negativni	25 (65.8)	9 (52.9)	16 (32.7)	3 (75.0)	0.013
	Pozitivni	13 (34.2)	8 (47.1)	33 (67.3)	1 (25.0)	
Stadij, n (%)	1	17 (44.7)	6 (35.3)	12 (24.5)	3 (75.0)	0.406
	2	10 (26.3)	5 (29.4)	14 (28.6)	0 (0.0)	
	3	9 (23.7)	6 (35.3)	18 (36.7)	1 (25.0)	
	4	2 (5.3)	0 (0.0)	5 (10.2)	0 (0.0)	
Veličina tumora (cm), medijan (raspon)		4.1 (3.0-5.5)	5.0 (3.0-7.5)	4.0 (4.0-7.0)	5.0 (5.0-5.5)	0.902
Dob (godine), medijan (raspon)		70 (65-75)	70 (63-74)	64 (61-70)	65 (62-74)	0.650

U Tablici 10 prikazane su razlike u raspodjeli ispitivanih parametara prema metastatskom statusu limfnih čvorova. Značajne razlike zabilježene su kod svih istraživanih parametara osim spola ($P=0,178$). Vidimo da su bolesnici bez metastaza u regionalne limfne čvorove stariji (medijan dobi 71 god), imaju prosječno manje karcinome (medijan 3 cm), češće intestinalnog tipa (47,2%) i T1 dubinom prodora tumora kroz stijenku želuca (39,6%). Za razliku od njih bolesnici s razvijenim metastazama u limfne čvorove su mlađi (medijan dobi 64 god), s većim tumorima (medijan 5,5 cm), prisutnom vaskularnom (45,5%) i perineuralnom (58,2%) invazijom, u 60% slučajeva miješanog histološkog tipa karcinoma te s T3 i T4 (90,9%) dubinom prodora tumora kroz stijenku želuca.

Tablica 10. Razlike u analiziranim parametrima prema prisustvu metastaza u limfne čvorove

		Metastaze u limfne čvorove		P
		Odsutne	Prisutne	
Dob (godine), medijan (raspon)		71 (63-76)	64 (56-72)	0,009
Veličina tumora (cm), medijan (raspon)		3.0 (2.0-6.0)	5.5 (4.0-8.0)	0,001
Vaskularna invazija, n (8%)	odsutna	44 (83)	30 (54.5)	0,001
	prisutna	9 (17%)	25 (45.5)	
Perineuralna invazija, n (%)	odsutna	45 (84.9)	23 (41.8)	<0,001
	prisutna	8 (15.1)	32 (58.2)	
Spol, n (%)	Muški	23 (43.4)	31 (56.4)	0,178
	Ženski	30 (56.6)	24 (43.6)	
Tip tumora, n (%)	Intestinalni	25 (47.2)	13 (23.6)	0,013
	Difuzni	9 (17)	8 (14.5)	
	Miješani	16 (30.2)	33 (60)	
	Ostalo	3 (5.7)	1 (1.8)	
T status, n (%)	1	21 (39.6)	2 (3.6)	<0,001
	2	15 (28.3)	3 (5.5)	
	3	14 (26.4)	43 (78.2)	
	4	3 (5.7)	7 (12.7)	

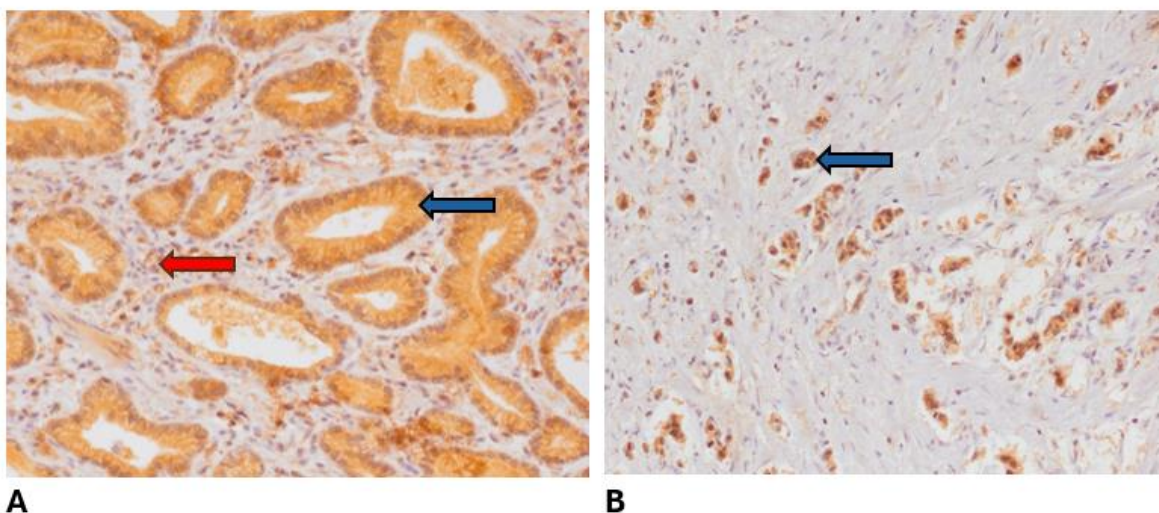
U Tablici 11 su prikazane razlike u ispitivanim parametrima prema stadiju bolesti. Značajne razlike zabilježene su kod svih promatranih parametara osim spola ($P=0,317$) i histološkog tipa tumora ($P=0,138$).

Tablica 11. Razlike u analiziranim parametrima prema stadiju bolesti

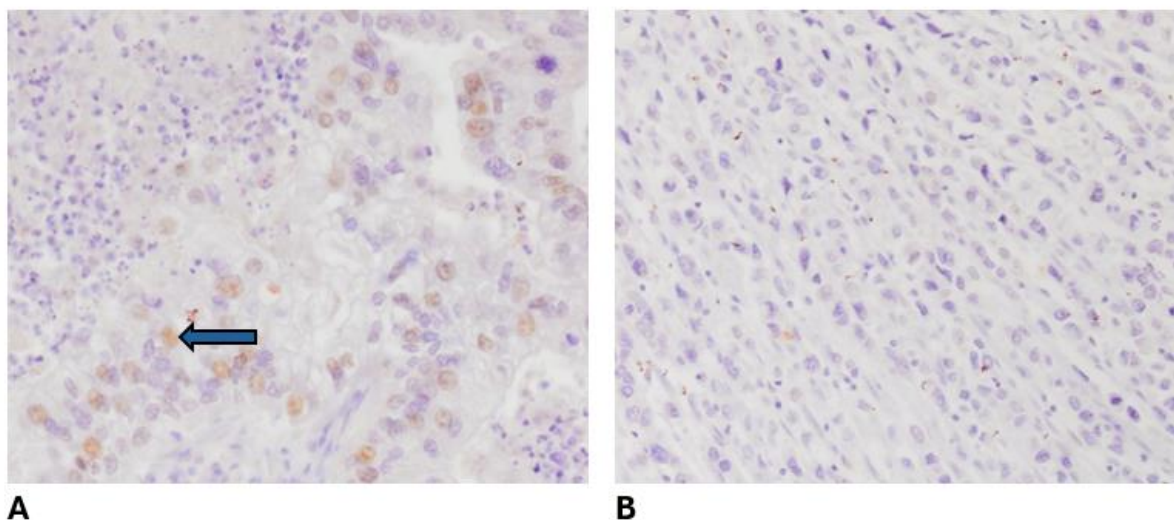
		Stadij bolesti				P
		1	2	3	4	
Vaskularna invazija, n (%)	Odsutna	36 (94.7)	17 (58.6)	18 (52.9)	3 (42.9)	<0.001
	Prisutna	2 (5.3)	12 (41.4)	16 (47.1)	4 (57.1)	
Perineuralna invazija, n (%)	Odsutna	36 (94.7)	17 (58.6)	14 (41.2)	1 (14.3)	<0.001
	Prisutna	2 (5.3)	12 (41.4)	20 (58.8)	6 (85.7)	
Spol, n (%)	Ženski	19 (50)	18 (62.1)	15 (44.1)	2 (28.6)	0.317
	Muški	19 (50)	11 (37.9)	19 (55.9)	5 (71.4)	
Tip tumora, n (%)	Intestinalni	17 (44.7)	10 (34.5)	9 (26.5)	2 (28.6)	0.138
	Difuzni	6 (15.8)	5 (17.2)	6 (17.6)	0 (0)	
	Miješani	12 (31.6)	14 (48.3)	18 (52.9)	5 (71.4)	
	Ostalo	3 (7.9)	0 (0)	1 (2.9)	0 (0)	
T status, n (%)	1	23 (60.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<0.001
	2	15 (39.5)	3 (10.3)	0 (0)	0 (0)	
	3	0 (0)	24 (82.8)	28 (82.4)	5 (71.4)	
	4	0 (0)	2 (6.9)	6 (17.6)	2 (28.6)	
N status, n (%)	0	36 (94.7)	16 (55.2)	1 (2.9)	0 (0)	<0.001
	1	2 (5.3)	13 (44.8)	1 (2.9)	0 (0)	
	2	0 (0)	0 (0)	18 (52.9)	4 (57.1)	
	3	0 (0)	0 (0)	14 (41.2)	3 (42.9)	
Dob, medijan (raspon)		70 (63-75)	71 (63-75)	63 (56-72)	65 (58-69)	0.113
Veličina tumora (cm), medijan (raspon)		2.7 (2.0-3.5)	5.0 (4.0-7.0)	6.3 (4.0-9.0)	7.0 (6.0-8.0)	<0.001

5.2. Imunohistokemijska izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10

Imunohistokemijska izraženost proteina NY-ESO-1 analizirana je u epitelnim stanicama primarnih karcinoma želuca (u daljnjem tekstu karcinom) i u okolnoj dezmodoplastičnoj tumorskoj stromi (u daljnjem tekstu stroma) te pokazuje citoplazmatski i nuklearni pozitivitet (Slika 6). MAGE-A10 protein isključivo je bio izražen u nukleranoj komponenti epitelnih stanica karcinoma želuca (Slika 7).



Slika 6. Imunohistokemijska izraženost NY-ESO-1 u stanicama karcinoma želuca i okolnoj stromi. (A) Jaka epitelna citoplazmatska izraženost NY-ESO-1 u 100% epitelnih stanica intestinalnog podtipa karcinoma (označeno plavom strelicom) uz blagu izraženost u stromi (označeno crvenom strelicom) (x200); **(B)** Jaka epitelna citoplazmatska izraženost NY-ESO-1 kod difuznog podtipa karcinoma bez stromalne reakcije (označeno plavom strelicom) (x200).



Slika 7. Imunohistokemijska izraženost MAGE-A10 u stanicama karcinoma želuca. (A) Umjereno jak intenzitet nuklearne reakcije intestinalnog podtipa karcinoma na MAGE-A10 u 50% epitelnih stanica (označeno plavom strelicom) uz negativnu reakciju u stromi (x200); **(B)** Negativna nuklearna reakcija na MAGE-A10 epitela i strome kod difuznog podtipa karcinoma (x200).

Ukupna izraženost NY-ESO-1 proteina u uzorku bila je 75% (78/108) pri čemu je od 78 pozitivnih uzoraka, njih 75 pokazalo jaku izraženost NY-ESO-1 proteina. Jaka izraženost NY-ESO-1 u epitelnoj komponenti tumora snažno je korelirala sa slabom izraženošću NY-ESO-1 u pripadajućoj stromi tumora ($p < 0,001$). Pošto su samo dva ispitanika imala umjerenu izraženost NY-ESO-1 proteina u karcinomu, odlučili smo u svim daljnjim multivarijatnim analizama koristiti izraženost u stromi radi lakšeg prikaza podataka i točnijih analiza (Tablica 12).

Tablica 12. Međusobna povezanost izraženosti NY-ESO-1 u karcinomu i u stromi.

		Izraženost NY-ESO-1 u epitelu, n (%)			p
		Negativna	Slaba	Jaka	
Izraženost NY-ESO-1 u stromi, n (%)	Negativna	29 (100.0)	2 (66.7)	2 (2.7)	<0.001
	Slaba	0 (0.0)	1 (33.3)	73 (97.3)	
	Jaka	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

Osim toga utvrdili smo povezanost izraženosti NY-ESO-1 s dubinom prodora karcinoma kroz stijenku želuca (T stadij, $p = 0,033$). Tako uzorci tumora s dubinom

prodora T1 pokazuju pozitivitet u 14,9% slučajeva za razliku od 60,8% NY-ESO-1 pozitivnih tumora kod karcinoma stadija T3. Također, primijetili smo tendenciju ka statistički značajnoj korelaciji s tipom tumora ($P=0,084$). Kod tumora koji pokazuju izraženost NY-ESO-1 antigena najviše je tumora miješanog tipa (39,2%), dok tumori difuznog tipa u najvećem udjelu pokazuju pozitivitet na NY-ESO-1 (14/16, 87,5%) (Tablica 13).

Tablica 13. Povezanost izraženosti NY-ESO-1 u stromi tumora s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma želuca u ukupnom istraživanom uzorku (N=108).

		Izraženost NY-ESO-1 u stromi		P
		Negativna	Slaba	
Spol, n (%)	Ženski	16 (48.5)	37 (50.0)	0.885
	Muški	17 (51.5)	37 (50.0)	
Tip tumora, n (%)	intestinalni	11 (33.3)	27 (36.5)	0.084
	difuzni	2 (6.1)	14 (18.9)	
	miješani	20 (60.6)	29 (39.2)	
	ostalo	0 (0.0)	4 (5.4)	
vaskularna invazija (1-DA, 0-NE), n (%)	0	25 (75.8)	48 (64.9)	0.264
	1	8 (24.2)	26 (35.1)	
perineuralna invazija (1-DA, 0-NE), n (%)	0	24 (72.7)	43 (58.1)	0.149
	1	9 (27.3)	31 (41.9)	
T status, n (%)	T0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.033
	T1	12 (36.4)	11 (14.9)	
	T2	7 (21.2)	11 (14.9)	
	T3	11 (33.3)	45 (60.8)	
	T4	3 (9.1)	7 (9.5)	
N status, n (%)	N0	17 (51.5)	36 (48.6)	0.527
	N1	7 (21.2)	9 (12.2)	
	N2	5 (15.2)	17 (23.0)	
	N3	4 (12.1)	12 (16.2)	
Stadij, n (%)	1	17 (51.5)	21 (28.4)	0.137
	2	6 (18.2)	23 (31.1)	
	3	8 (24.2)	25 (33.8)	
	4	2 (6.1)	5 (6.8)	

MAGE-A10 protein ukupno je bio izražen u 28.7% (31/108) uzoraka od čega je u njih 23 izraženost bila jaka. Nismo utvrdili povezanost izraženosti MAGE-A10 u epitelu karcinoma s proučavanim kliničko-patološkim parametrima i tipu tumora (Tablica 14 i 15).

Tablica 14. Razlike u analiziranim parametrima prema izraženosti MAGE-A10 u epitelu tumora u ukupnom istraživanom uzorku (N=108).

		Izraženost MAGE u epitelu			P
		Negativna	Slaba	Jaka	
Spol, n (%)	Ženski	32 (45.7)	12 (80.0)	10 (43.5)	0.043
	Muški	38 (54.3)	3 (20.0)	13 (56.5)	
Tip tumora, n (%)	Intestinalni	21 (30.0)	6 (40.0)	11 (47.8)	0.542
	Difuzni	13 (18.6)	2 (13.3)	2 (8.7)	
	Miješani	32 (45.7)	7 (46.7)	10 (43.5)	
	Ostalo	4 (5.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Vaskularna invazija, n (%)	Odsutna	50 (71.4)	9 (60.0)	15 (65.2)	0.639
	Prisutna	20 (28.6)	6 (40.0)	8 (34.8)	
Perineuralna invazija, n (%)	Odsutna	44 (62.9)	10 (66.7)	14 (60.9)	0.936
	Prisutna	26 (37.1)	5 (33.3)	9 (39.1)	
T status, n (%)	T1	17 (24.3)	2 (13.3)	4 (17.4)	0.918
	T2	12 (17.1)	3 (20.0)	3 (13.0)	
	T3	34 (48.6)	9 (60.0)	14 (60.9)	
	T4	7 (10.0)	1 (6.7)	2 (8.7)	
N status, n (%)	N0	34 (48.6)	8 (53.3)	11 (47.8)	0.398
	N1	8 (11.4)	3 (20.0)	5 (21.7)	
	N2	13 (18.6)	3 (20.0)	6 (26.1)	
	N3	15 (21.4)	1 (6.7)	1 (4.3)	
Stadij, n (%)	1	27 (38.6)	5 (33.3)	6 (26.1)	0.702
	2	15 (21.4)	5 (33.3)	9 (39.1)	
	3	24 (34.3)	4 (26.7)	6 (26.1)	
	4	4 (5.7)	1 (6.7)	2 (8.7)	

Tablica 15. Razlike u izraženosti MAGE-A10 i NY-ESO-1 u stromi i epitelu između pojedinih tipova tumora

		Tip tumora				p
		Intestinalni	Difuzni	Miješani	Ostali	
MAGE-A10 u epitelu, n (%)	Negativna	21 (55.3)	13 (76.5)	32 (65.3)	4 (100.0)	0.542
	Slaba	6 (15.8)	2 (11.8)	7 (14.3)	0 (0.0)	
	Jaka	11 (28.9)	2 (11.8)	10 (20.4)	0 (0.0)	
NY-ESO-1 u epitelu, n (%)	Negativna	10 (26.3)	2 (12.5)	17 (34.7)	0 (0.0)	0.378
	Slaba	2 (5.3)	0 (0.0)	1 (2.0)	0 (0.0)	
	Jaka	26 (68.4)	14 (87.5)	31 (63.3)	4 (100.0)	
NY-ESO-1 u stromi, n (%)	Negativna	11 (28.9)	2 (12.5)	20 (40.8)	0 (0.0)	0.084
	Slaba	27 (71.1)	14 (87.5)	29 (59.2)	4 (100.0)	
	Jaka	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

Iz Tablice 16 je vidljivo da nismo utvrdili razliku u izraženosti NY-ESO-1 i MAGE-A10 proteina između karcinoma s metastazama i onih bez metastaza u regionalne limfne čvorove.

Tablica 16. Razlike u izraženosti MAGE-A10 i NY-ESO-1 u stromi i epitelu karcinoma prema prisustvu metastaza u limfne čvorove

		Metastaze u limfne čvorove		p
		Odsutne	Prisutne	
MAGE-A10 u karcinomu, n (%)	Negativan	34 (64.2)	36 (65.5)	0.937
	Slabo izražen	8 (15.1)	7 (12.7)	
	Jako izražen	11 (20.8)	12 (21.8)	
NY-ESO-1 u karcinomu, n (%)	Negativan	15 (28.3)	14 (25.9)	0.787
	Slabo izražen	2 (3.8)	1 (1.9)	
	Jako izražen	36 (67.9)	39 (72.2)	
NY-ESO-1 u stromi, n (%)	Negativan	17 (32.1)	16 (29.6)	0.784
	Slabo izražen	36 (67.9)	38 (70.4)	

Izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10 antigena u tumoru nije pokazala statistički značajnu korelaciju s kliničkim stadijem bolesti. Može se primijetiti nešto veći broj NY-ESO-1 pozitivnih tumora kod viših kliničkih stadija bolesti ali bez statističke značajnosti (P=0,068). Tako je u stadiju II (79,3%) i III (75,8%) zabilježeno najviše slučajeva s jakim intenzitetom bojenja, dok je u I stadiju 55,3% slučajeva pozitivno na NY-ESO-1 (Tablica 17).

Tablica 17. Izraženosti NY-ESO-1 i MAGE-A10 u stanicama karcinoma i strome prema stadiju bolesti

		Klinički stadij bolesti				P
		1	2	3	4	
MAGE- A10 u karcinomu, n (%)	Negativan	27 (71.1)	15 (51.7)	24 (70.6)	4 (57.1)	0.683
	Slabo izražen	5 (13.2)	5 (17.2)	4 (11.8)	1 (14.3)	
	Jako izražen	6 (15.8)	9 (31)	6 (17.6)	2 (28.6)	
NY-ESO-1 u karcinomu, n (%)	Negativan	15 (39.5)	6 (20.7)	6 (18.2)	2 (28.6)	0.068
	Slabo izražen	2 (5.3)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	
	Jako izražen	21 (55.3)	23 (79.3)	26 (78.8)	5 (71.4)	
NY-ESO-1 u stromi, n (%)	Negativan	17 (44.7)	6 (20.7)	8 (24.2)	2 (28.6)	0.091
	Slabo izražen	21 (55.3)	23 (79.3)	25 (75.8)	5 (71.4)	

5.3. Analiza preživljenja

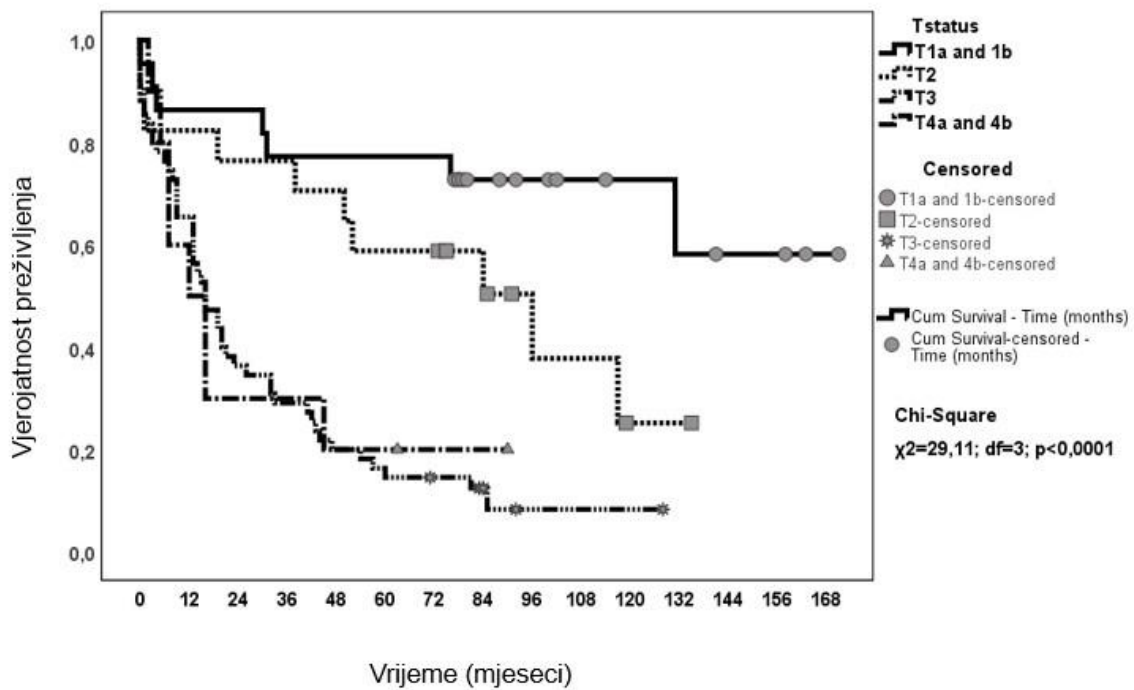
Kod svih sudionika istraživanja lošije preživljenje bilo je povezano s vaskularnom invazijom (HR 2.1, 95% CI 1.3-3.4, P=0.002) i perineuralnom invazijom. Također, lošije preživljenje povezano je s većim T stadijem karcinoma, većim brojem pozitivnih limfnih čvorova, te višim stadijem bolesti (Tablica 18).

Tablica 18. Preživljenje bolesnika u mjesecima (medijan) ovisno o pojedinim kategoričkim varijablama

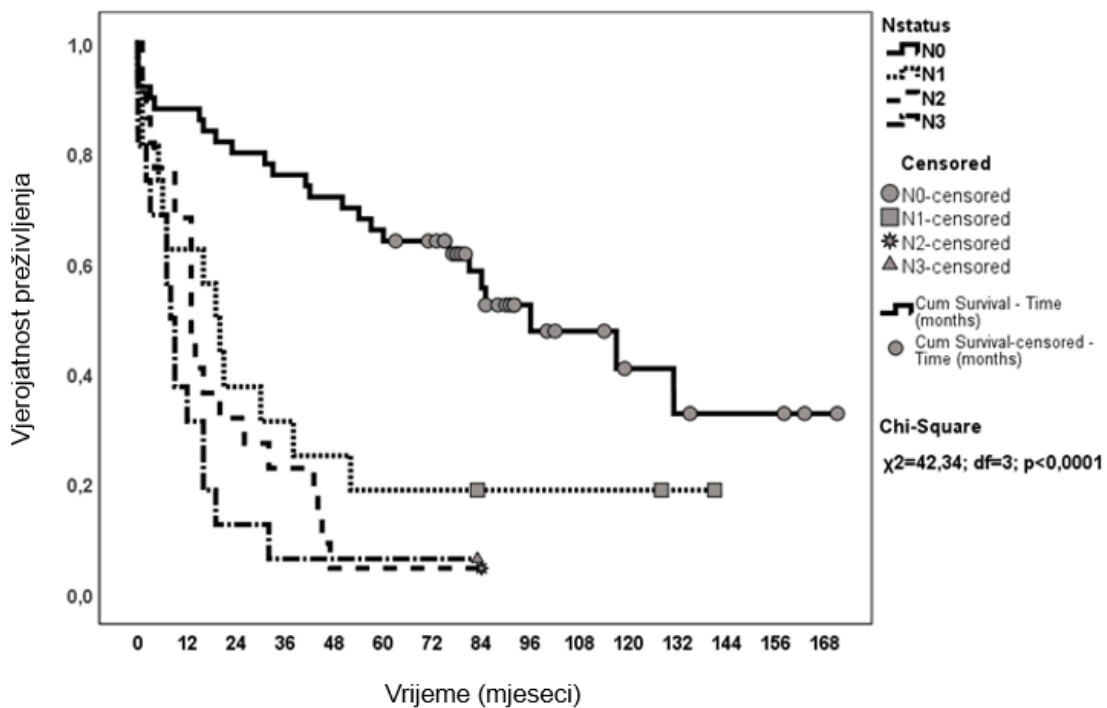
		Mjeseci (medijan)	SE	95% interval pouzdanosti		P
T status	T1a / 1b	Nije dosegnut	-	-	-	<0,001
	T2	96	30,5	36,2	155,8	
	T3	16	3,2	9,8	22,2	
	T4a / 4b	12	4,7	2,7	21,3	
N status	N0	96	18,7	59,2	132,8	<0,001
	N1	19	4,0	11,2	26,8	
	N2	13	1,9	9,2	16,8	
	N3	8	1,0	5,4	10,6	
Stadij bolesti	1	131	-	-	-	<0,001
	2	33	13,2	7,0	58,9	
	3	13	2,3	8,5	17,5	
	4	9	2,6	3,8	14,1	

SE, standardna pogreška

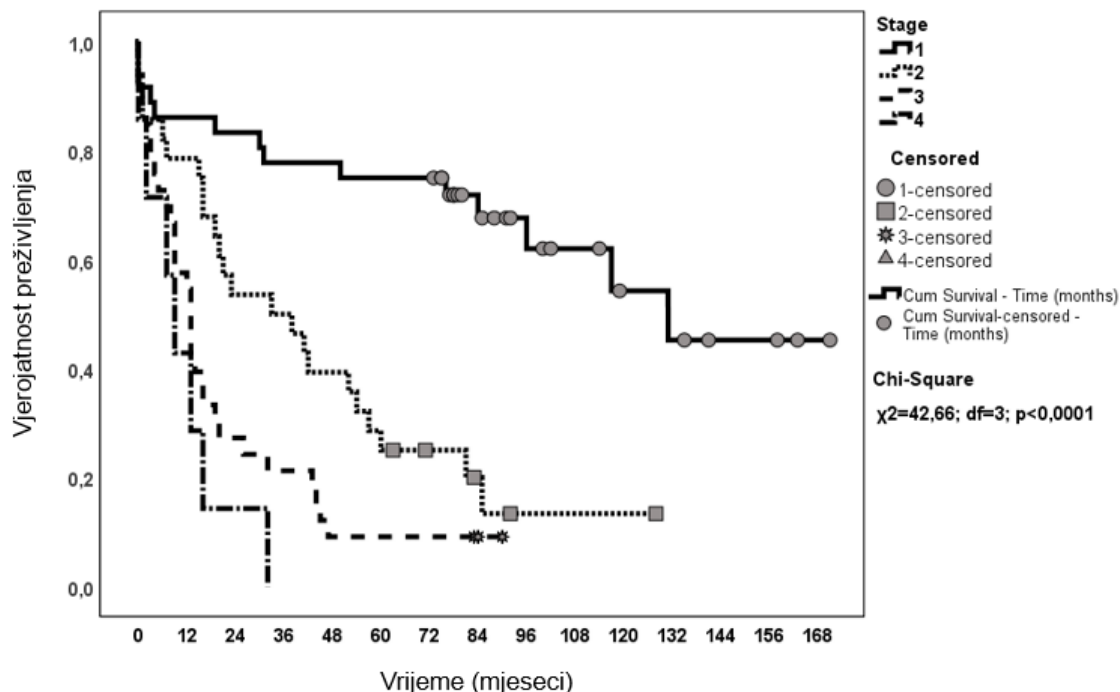
Stariji pacijenti su imali nešto bolje preživljenje, iako navedena razlika nije dosegla statističku značajnost (HR 0.980, 95% CI 0.958 – 1.002, P=0.089). Ispitanici s miješanim tipom tumora su imali najlošije preživljenje (medijan 16.0 (9.2 – 22.9)), što je bilo bitno manje u odnosu na difuzni (medijan 50.0 (0.0 – 117.9)) i intestinalni tip karcinoma (medijan 42.0 (2.3 – 81.7)), no navedene razlike nisu bile statistički značajne, prije svega zbog velike razlike u broju ispitanika između skupina.



Slika 8. Ukupno preživljenje prema T stadiju bolesti

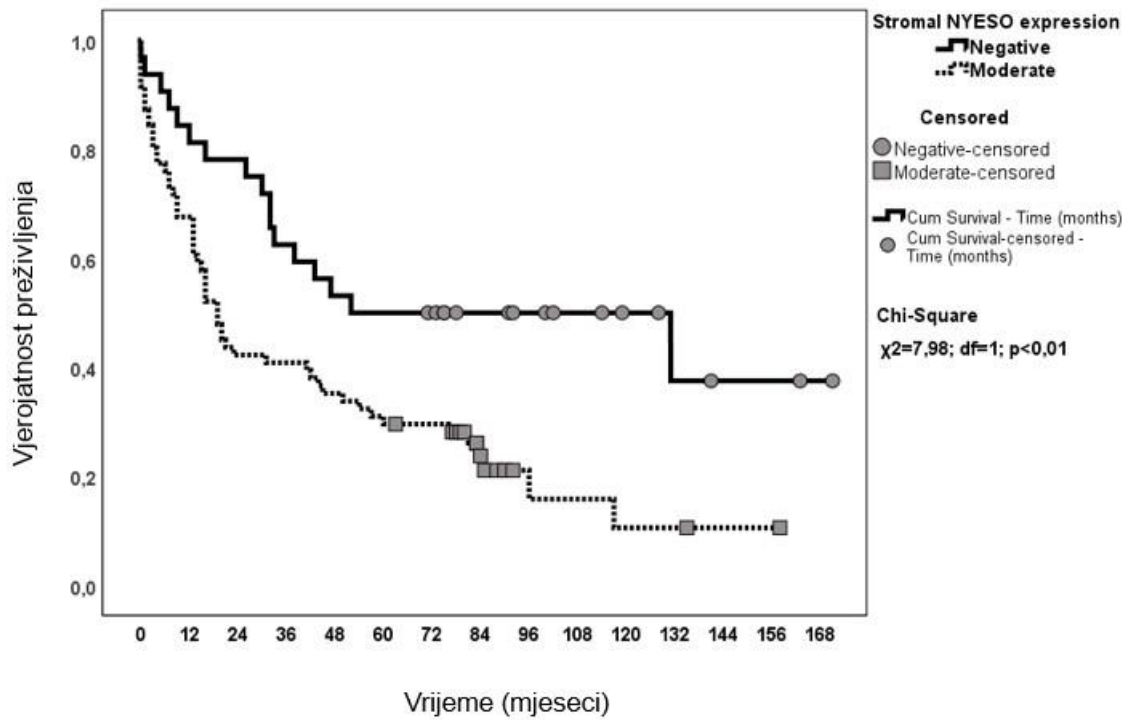


Slika 9. Ukupno preživljenje prema N stadiju bolesti

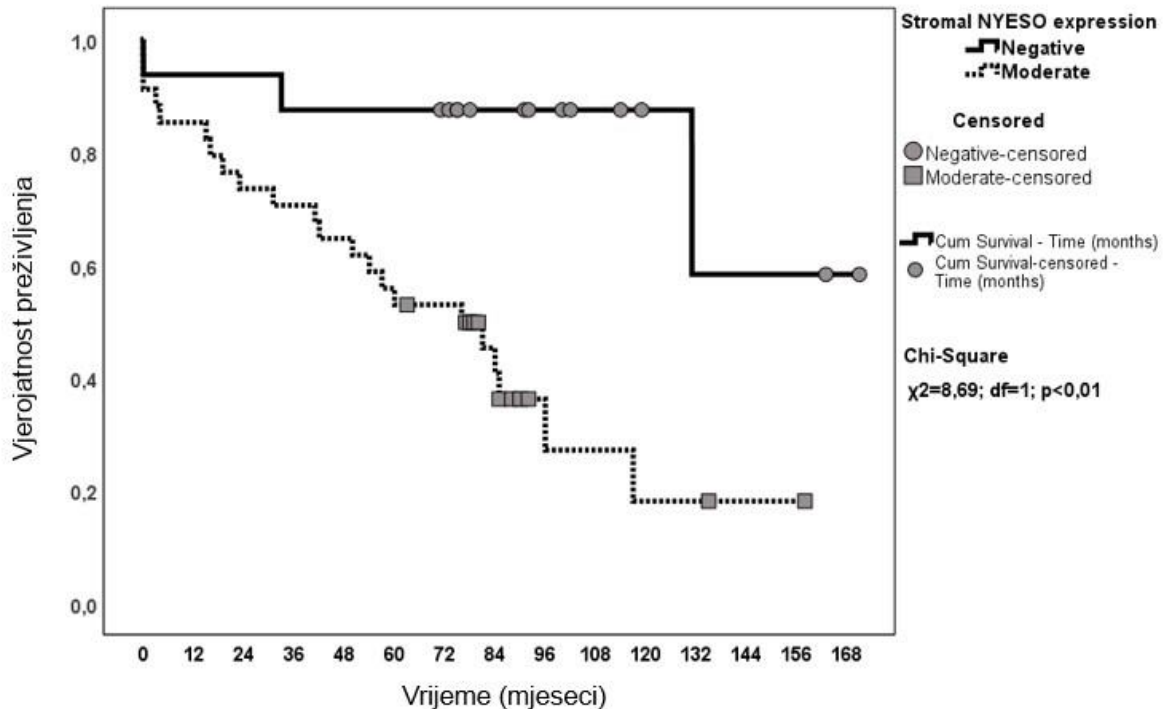


Slika 10. Ukupno preživljenje prema stadiju bolesti

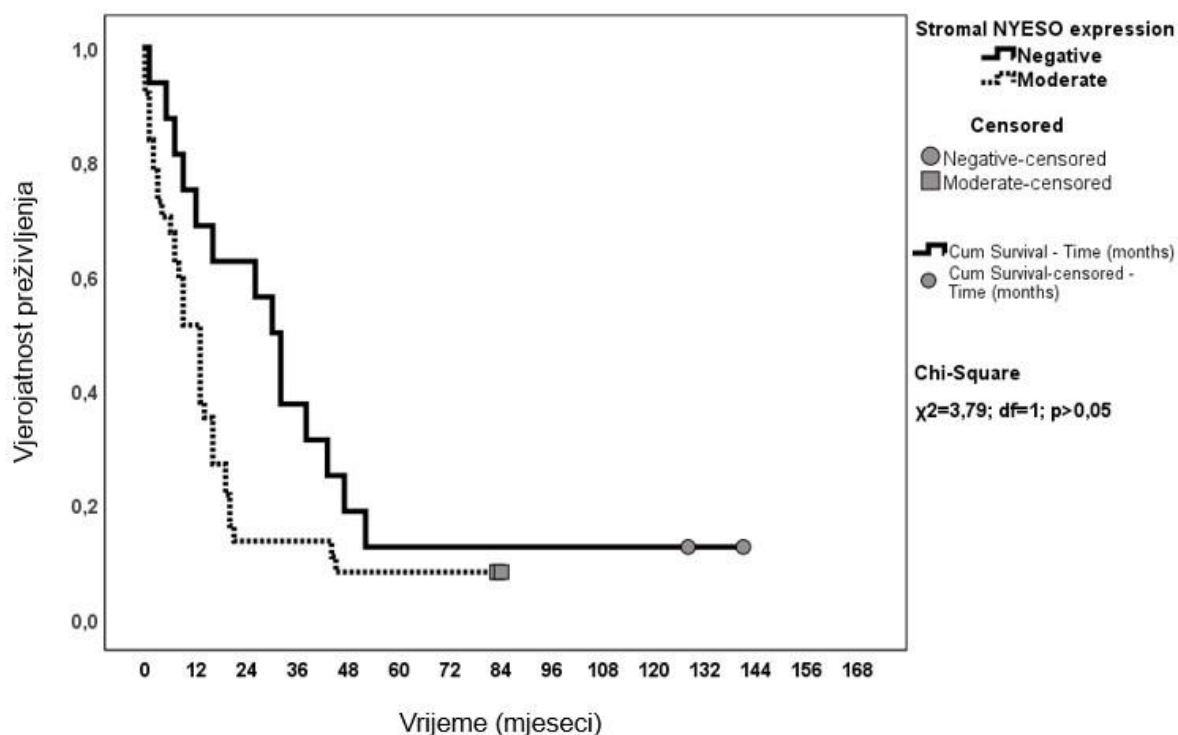
Bolesnici koji su imali slabu izraženost NY-ESO-1 u stromi karcinoma (jaka izraženost u epitelnoj komponenti karcinoma) su imali medijan preživljenja 19.0 (14.1 – 24.0) mjeseci, za razliku od pacijenata koji su imali negativnu izraženost čiji je medijan preživljenja iznosio 52.0 (0.0 – 133.3) mjeseci (hi kvadrat 7.99, $P=0.005$) (Slika 11). Kada smo analizirali povezanost izraženosti NY-ESO-1 i preživljenja zasebno u pacijenata bez i s metastazama u limfne čvorove, pronašli smo još veću razliku u preživljenju kod bolesnika bez metastaza u limfnim čvorovima. U ovoj skupini medijan preživljenja nije dosegnut u pacijenata s negativnom izraženošću NY-ESO-1 u stromi, a u pacijenata sa slabom izraženošću je medijan preživljenja iznosio 76.0 (45.9 – 106.1) mjeseci (hi kvadrat 8.698, $P=0.003$) (Slika 12 i Slika 13).



Slika 11. Krivulje ukupnog preživljenja bolesnika prema izraženosti NY-ESO-1 u svih pacijenata



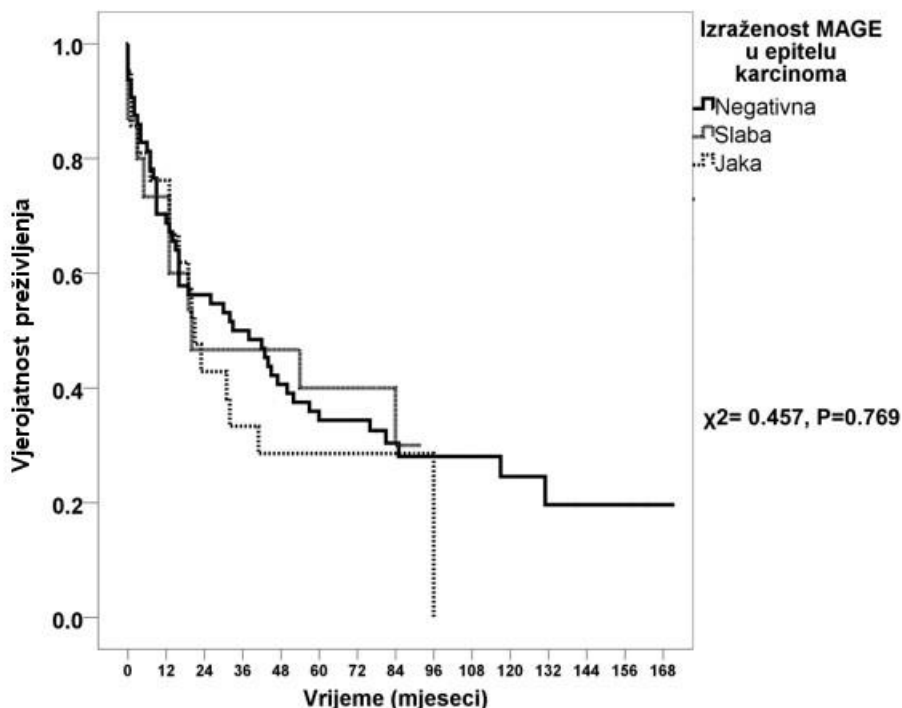
Slika 12. Krivulje preživljenja bolesnika bez metastaza u limfne čvorove prema izraženosti NY-ESO-1



Slika 13. Krivulje preživljenja bolesnika s metastazama u limfne čvorove prema izraženosti NY-ESO-1

Nije nađeno značajne povezanosti preživljenja i izraženosti MAGE-A10 u epitelu karcinoma ($\chi^2=0.457$, $P=0.769$) (Slika 14). S obzirom na to da su pacijenti koji su imali slabu i jaku izraženost imali sličan medijan preživljenja, učinjena je dodatna analiza u kojoj su pacijenti sa slabom i jakim izraženosti svrstani u istu skupinu nakon čega je ponovljena analiza. Iako je medijan preživljenja bio veći u pacijenata s negativnom izraženosti MAGE-A10 u karcinomu, nije nađeno statistički značajne razlike u preživljenju ($\chi^2=0.403$, $P=0.526$) zato što su se krivulje preživljenja u prvih 12 mjeseci preklapale.

Nije nađeno niti značajne razlike u izraženosti MAGE-A10 kada je preživljenje analizirano zasebno u pacijenata bez metastaza u limfne čvorove ($\chi^2=0.283$, $P=0.595$) i onih s prisutnim metastazama ($\chi^2=1.318$, $P=0.251$).



Slika 14. Krivulje ukupnog preživljenja bolesnika prema izraženosti MAGE-A10

5.4. Multivarijatna analiza

U multivarijatnoj analizi su korištene varijable koje su pokazale statističku značajnost u univarijatnoj analizi (Tablica 18). Pojedine varijable su postupno uvođene u analizu, a završni korak postupne regresije je prikazan u Tablici 19. Primjerice, u modelu 1 su uvrštene samo tri varijable (NY-ESO-1, dob i spol), od kojih su samo dvije neovisno povezane s preživljenjem. U modelu 2 su dodane varijable T i N status, a u modelu 3 uz sve i perineuralna i vaskularna invazija. Kako je vidljivo u tablici, izraženost NY-ESO-1 u stromi je povezana s lošijim preživljenjem neovisno o T i N statusu, dobi i prisutnosti perineuralne invazije.

Tablica 19. Multivarijatna analiza parametara koji su povezani s preživljenjem

	B	SE	Wald	HR	95% CI za HR		P
Model 1 (dob, spol, NY-ESO-1)							
Izraženost NY-ESO-1 u stromi	.806	.281	8.241	2.238	1.291	3.879	.004
Dob	-.025	.012	4.639	.975	.953	.998	.031
Model 2 (dob, spol, NY-ESO-1, T i N status)							
Izraženost NY-ESO-1 u stromi	.590	.290	4.135	1.804	1.022	3.187	.042
T status	.359	.169	4.499	1.432	1.028	1.995	.034
N status	.484	.118	16.700	1.623	1.287	2.047	.000
Model 3 (dob, spol, NY-ESO-1, T i N status, perineuralna i vaskularna invazija)							
Izraženost NY-ESO-1 u stromi	.693	.283	5.987	2.000	1.148	3.485	.014
N status	.528	.115	21.152	1.696	1.354	2.125	.000
Perineuralna invazija	.706	.276	6.549	2.025	1.180	3.476	.010

B: nestandardizirani koeficijent korelacije; SE: standardna pogreška nestandardiziranog koeficijenta korelacije; CI: interval pouzdanosti; HR: omjer hazarda (eng. *hazard ratio*)

5.5. Predviđanja 2-godišnjeg preživljenja

Učinjena je inicijalno orijentacijska ROC analiza kojom se prikazala dijagnostička preciznost u predviđanju 2-godišnjeg preživljenja. Najbolju prediktivnu vrijednost imao je N status, dok spol i izraženost MAGE-A10 u karcinomu nisu imali prediktivnu vrijednost (Tablica 20).

Tablica 20. ROC analiza

	AUC	SE	P	95% CI	
Spol	.564	.057	.261	.453	.676
Dob	.371	.055	.024	.263	.479
T status	.732	.050	.000	.635	.830
N status	.786	.046	.000	.695	.876
Stadij bolesti	.774	.047	.000	.683	.865
Veličina tumora	.773	.045	.000	.684	.861
Vaskularna invazija	.629	.056	.024	.520	.738
Perineuralna invazija	.692	.053	.001	.587	.796
NY-ESO-1 izraženost u stromi	.654	.054	.007	.549	.760
MAGE-A10 izraženost u epitelu	.556	.057	.325	.445	.668

Nakon što smo uvrstili sve varijable koje su povezane s 2-godišnjim preživljenjem u multivarijatni model, zaključili smo kako su samo N status, veličina tumora i izraženost NY-ESO-1 u stromi neovisno povezani s 2-godišnjim preživljenjem (Tablica 21).

Tablica 21. Završni korak multivarijatne binarne logističke regresije u predviđanju 2-godišnjeg preživljenja

	B	SE	Wald	HR	95% CI za HR		P
NY-ESO-1 (stroma)	2.296	.733	9.823	.002	9.933	2.363	41.749
Nstatus			18.765	.000			
Nstatus(1)	3.509	1.082	10.523	.001	33.410	4.010	278.358
Nstatus(2)	.648	1.135	.326	.568	1.912	.207	17.668
Nstatus(3)	1.558	1.091	2.038	.153	4.750	.559	40.339
Veličina tumora (cm)	-.276	.102	7.291	.007	.759	.622	.927
Constant	-1.179	1.184	.992	.319	.308		

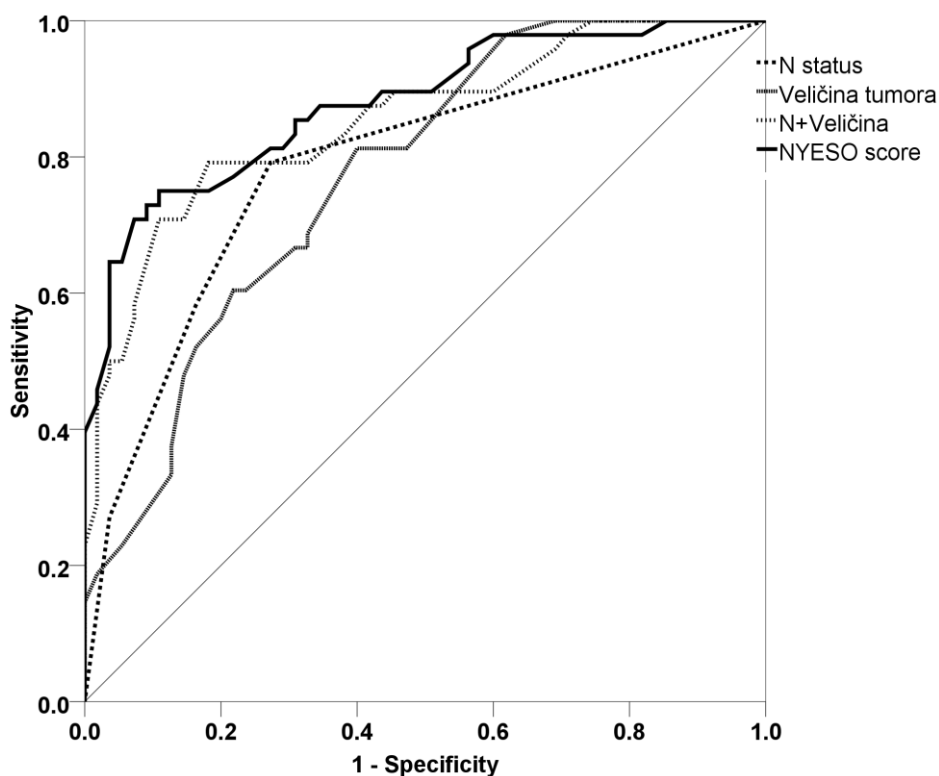
Zatim su izrađene regresijske jednadžbe cilj kojih je bio objediniti najbolje prediktore i potom ponovno testirati njihovu prediktivnu vrijednost. Regresijske jednadžbe su izrađene prema vrijednostima nestandardiziranih koeficijenata korelacije (Tablica 22).

Ako je zadovoljen pojedini kriterij, dodan je pojedini koeficijent svakom parametru prema sljedećem obrascu:

- **Veličina tumora:** Veličina tumora \times 0.276
- **N status:** N status $>$ 0 +3.509
- **NY-ESO-1 u stromi:** Pozitivna izraženost NY-ESO-1 u stromi +2.296

Tablica 22. Prediktivna preciznost pojedinih parametara i zbirnih parametara dobivenih regresijskom jednadžbom.

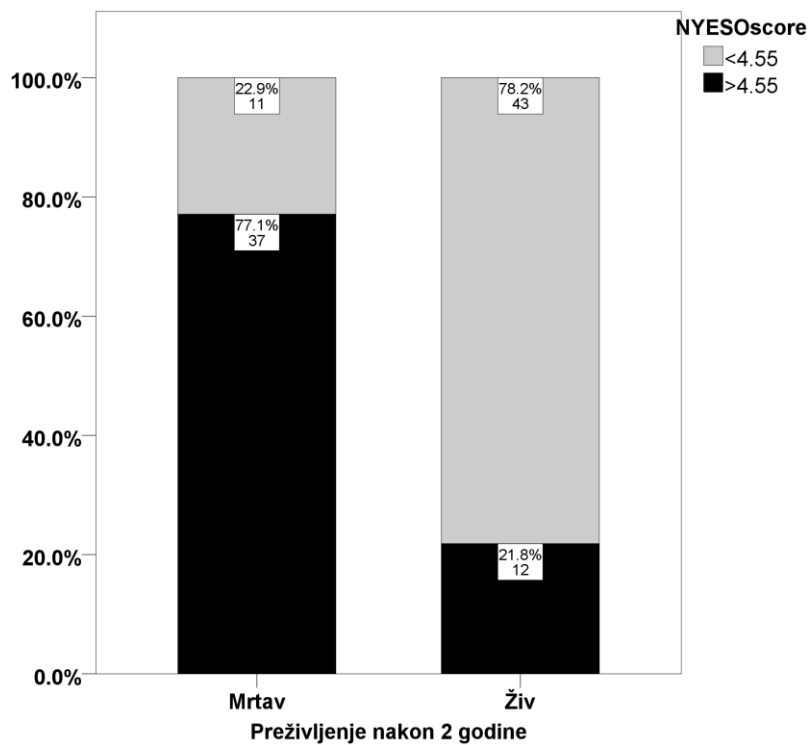
	AUC	SE	P	95 CI	
Stromalna NY-ESO-1 izraženost	.654	.054	.007	.549	.760
N status	.786	.046	.000	.695	.876
Veličina tumora	.773	.045	.000	.684	.861
N status + veličina tumora	.854	.038	.000	.780	.927
NYESO score	.878	.034	.000	.812	.945



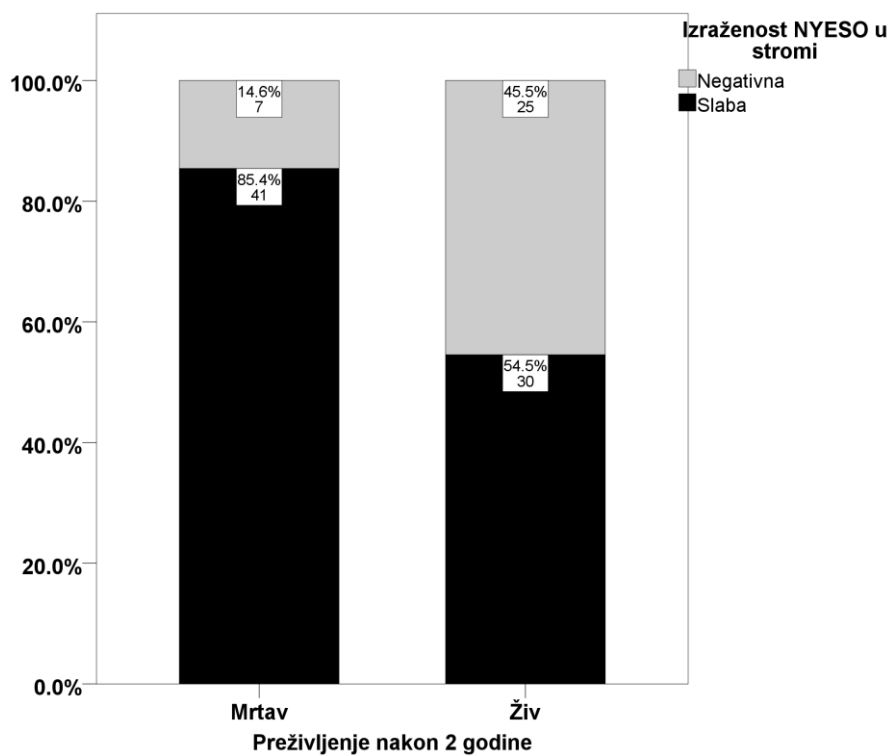
Slika 15. ROC krivulje koje pokazuju prediktivnu preciznost pojedinih i zbirnih parametara dobivenih regresijskom jednađbom

Dijagnostička preciznost izraženosti NY-ESO-1 u stromi je iznosila 65.4% (54.9 – 76.0%), a dijagnostička preciznost zbirnog parametra veličine tumora i N statusa je iznosio 85.4% (78.0 – 92.7%). Dodatak izraženosti NY-ESO-1 u stromi u model regresijske jednađbe u koji su bili uključeni N status i veličina tumora je značajno povećao dijagnostičku preciznost prediktivnog modela ($\chi^2=5.974$, $P=0.015$) samog NY-ESO-1 (Slika 10), no ne i zajedničke prediktivne vrijednosti N statusa i veličine tumora.

Zbroj parametara dobivenih prema veličini tumora, N statusu i izraženosti NY-ESO-1 u stromi je nazvan NYESO score. NYESO score je imao prediktivnu preciznost od 87.8% (81.2 – 94.5) u predviđanju 2-godišnjeg preživljenja. Granična vrijednost NYESO score-a od 4.55 je imala osjetljivost 77.1% uz specifičnost 78.2%



Slika 16. Razlike u 2-godišnjem preživljenju u ispitanika s NYESO score-om <4.55 i >4.55.



Slika 17. Razlike u 2-godišnjem preživljenju prema izraženosti NY-ESO-1 u stromi tumora.

6. RASPRAVA

Karcinom želuca je heterogena bolest s visokim morbiditetom, a izostanak učinkovitih modaliteta liječenja i loša prognoza uznapredovale bolesti zahtijeva nove strategije liječenja kako bi se poboljšalo preživljenje bolesnika. Imunoterapijski pristupi liječenju privukli su pozornost posljednjih godina, pri čemu se karcinom-testis antigeni (CTA) smatraju posebno povoljnim ciljevima, s obzirom na ograničenu izraženost u solidnim epitelnim karcinomima, čineći ih privlačnim metama za imunoterapijske lijekove (165,216,217).

Osim već poznatih genetskih promjena koje su važan dio karcinogeneze te dovode do razvoja karcinoma želuca, epigenetski čimbenici predstavljaju značajan mehanizam u razvoju tumora (93). Dokazana je uloga demetilacije kao važnog epigenetskog čimbenika u aktivaciji karcinom-testis antigena (CTA) (218). Procesom demetilacije njihovih promotora dolazi do ekspresije CTA, slično kao i kod tumor supresorskih gena i gena povezanih s rastom (176). Honda i sur. su pokazali da se demetilacija promotora *MAGE-A1* i *-A3* gena češće uočava kod uznapredovalih stadija karcinoma želuca, te da je povezana s agresivnim karakteristikama tumora i lošijom prognozom bolesti (175).

Izraženost NY-ESO-1 i MAGE antigena dosada je istraživana u brojnim karcinomima s različitim rezultatima. Izraženost uglavnom ovisi o histološkom tipu tumora i stadiju bolesti, međutim, razina izraženosti također varira ovisno o primijenjenoj metodi istraživanja (169). Najčešće korištene metode su određivanje mRNA pomoću metode lančane reakcije polimeraze (eng. reverse transcriptase-polymerase chain reaction-RT-PCR) i imunohistokemijska analiza (172,212,219).

S obzirom na činjenicu da posttranskripcijska kontrola genske ekspresije može utjecati na stvarnu prisutnost proteina u tumorskim stanicama, imunohistokemijska metoda određivanja izraženosti na razini proteina je klinički važnija. Nadalje, nekoliko je studija pokazalo nesrazmjer u izraženosti mRNA i proteina u istim skupinama bolesnika, što je uzrok raznolikosti prijavljenih razina izraženosti između različitih tipova karcinoma, ali i unutar istih histoloških tipova tumora (212,219,220).

U ovom se istraživanju, imunohistokemijskom metodom odredila izraženost proteina MAGE-A10 i NY-ESO-1 u epitelu i stromi primarnog karcinoma želuca. Uspoređivana je izraženost navedenih proteina u primarnom karcinomu između skupina bolesnika bez i s metastazama u regionalne limfne čvorove. Također se određivala i njihova povezanost s kliničko-patološkim parametrima (dob, spol, klinički stadij bolesti (TNM klasifikacija), veličina tumora, histološki tip tumora) i preživljenjem.

Izraženost grupe MAGE-A proteina prema dosadašnjim studijama kreće se od 9% do >50%. Tako su Lian i sur. pokazali imunohistokemijsku (IHC) izraženost MAGE-A antigena kod 54,7% (47/86) uzoraka karcinoma želuca, dok su Jung i sur. istom metodom na više od 1000 uzoraka pokazali znatno manju izraženost MAGE-A antigena (MAGE-A2 i -A3 proteina) kod 15,8% uzoraka (173/1097). Treba naglasiti kako su u navedenim istraživanjima korištena nespecifična protutijela, koja osim MAGE-A10 proteina prepoznaju i ostale proteine iz MAGE-A skupine.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su izraženost proteina MAGE-A10 kod 35% (38/108) uzoraka primarnog karcinoma želuca. Pri tome je jako izražena reakcija bila prisutna kod 21,1% uzoraka. Izraženost proteina je bila prisutna isključivo u nuklearnoj komponenti stanica, što govori u prilog specifičnosti korištenog protutijela na MAGE-A10 protein koji je za razliku od drugih pripadnika MAGE-A skupine isključivo nuklearni antigen (182,221). Rezultati izraženosti dobiveni u našem istraživanju u skladu su s dosadašnjim studijama na karcinomu želuca gdje izraženost MAGE-A10 proteina oscilira u rasponu od 9% do 65,9% (182,220,222).

Tako su Li J i sur. pokazali izraženost MAGE-A10 kod 55% staničnih linija i proteinsku izraženost kod 9% uzoraka pri čemu je kod 82% posto uzoraka karcinoma bio prisutan najmanje jedan antigen iz MAGE-A skupine (223). Schultz-Tather i sur. su imunohistokemijom analizom pokazali izraženost proteina MAGE-A10 kod 22% (11/49) uzoraka karcinoma želuca, uglavnom intestinalnog tipa (182), a slične rezultate imali su i Fujiya i sur. (18,8% uzoraka) (222). Suzuki i sur. su pokazali značajno veću izraženost (65,9%) kod uznapredovalih karcinoma s udaljenim metastazama u jetri (220). Ova studija je, za razliku od naše, imala značajno manji broj uzoraka i većinu sudionika s uznapredovalim stadijem bolesti, što otežava usporedbu s dobivenim rezultatima naše studije.

U našem istraživanju je ukupna izraženost MAGE-A10 proteina u primarnom karcinomu želuca u određenoj mjeri slična podacima iznesenim u navedenim istraživanjima. Uzrok varijacija u rezultatima može ležati u različitosti IHC metoda, specifičnosti protutijela, veličini uzorka i, moguće, izboru pacijenata. Naime, cilj našeg istraživanja bio je istražiti izraženost CTA antigena u primarnom karcinomu želuca kod pacijenata s pozitivnim i negativnim limfnim čvorovima. Time je zastupljenost bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti bila manja u odnosu na neke od navedenih studija, što je potencijalno utjecalo na rezultate analize (220).

U našem istraživanju izraženost MAGE-A10 proteina u primarnom karcinomu želuca nije u statistički značajnoj korelaciji ni s jednim istraživanim histopatološkim parametrom (veličina tumora, histološki tip, pT i pN, vaskularna i perineuralna infiltracija te klinički stadij bolesti), kao niti s dobi i spolom bolesnika. Za razliku od naših rezultata Lian i sur. su pokazali učestaliju izraženost MAGE-A proteina kod uzoraka s metastazama u limfne čvorove i u višim TNM stadijima bolesti (162). Slične rezultate dobili su i Jung i sur. koji su pokazali povezanost izraženosti MAGE-A proteina s invazivnošću tumora, metastazama u limfne čvorove i patološkim stadijem bolesti. Navedena istraživanja provedena su s nespecifičnim protutijelima na MAGE-A10 i na manjem uzorku bolesnika s udaljenim metastazama, što je jedan od mogućih uzroka dobivenih rezultata.

Kada izdvojimo istraživanja koja su bila isključivo usredotočena na izraženost MAGE-A10 proteina, naši rezultati su u skladu s istraživanjem Li J i sur., koji također nisu pokazali povezanost antigena MAGE-A10 s kliničko-patološkim parametrima, međutim, treba naglasiti da je broj uzoraka bio značajno manji usporedno s našom studijom. Ovo je u suprotnosti s istraživanjem kojeg su proveli Suzuki i sur., a koji su pokazali da izraženost MAGE-A10 proteina kod karcinoma želuca raste s kliničkim stadijem bolesti te da je značajno veća kod bolesnika s udaljenim metastazama u jetru i da iznosi 65,9% (220). U navedenu studiju je bio uključen značajno manji broj sudionika u odnosu na našu, s uglavnom IV. stadijem bolesti. Zbog dobivenih rezultata isti autori sugeriraju moguću terapijsku korist kod MAGE-A10 pozitivnih bolesnika s uznapredovalim stadijem karcinoma želuca. Također, Fujija i sur. su u svom istraživanju na 154 uzoraka karcinoma želuca i gastroezofagealnog spoja pokazali povezanost izraženosti MAGE-A10 s pojavom udaljenih metastaza u jetru. U

navedenoj studiji osjetljivost i specifičnost bojenja MAGE-A10 za rani jetreni recidiv bile su 58,3% (95% interval pouzdanosti [95% CI] 27,7-84,8%) i 84,5% (95% CI 77,5-90,0%). Autori su ukazali na korist određivanja izraženosti MAGE-A10 proteina za predviđanje ranog jetrenog recidiva kod karcinoma želuca i gastroezofagealnog spoja (222).

Iako u našem istraživanju nismo došli do sličnih zaključaka, razlike su potencijalno uvjetovane namjernim grupiranjem bolesnika u grupe prema metastatskom statusu limfnih čvorova te znatno manjem udjelu uznapredovalih stadija bolesti u odnosu na navedena istraživanja.

Među tumorima koji su pokazali jaku izraženost MAGE-A10 proteina, najviše je bio zastupljen intestinalni tip tumora (28.9%, 11/38), dok je difuzni tip karcinoma u najvećem udjelu bio negativan na ovaj antigen (76.5% uzoraka), doduše, bez statistički značajne razlike. Ovo odgovara rezultatima ostalih studija koje su također pokazale veću zastupljenost MAGE-A10 pozitivnih uzoraka među karcinomima intestinalnog tipa i slabu ili negativnu izraženost kod difuznog tipa karcinoma (182,222,224). Moguće objašnjene ovog rezultata leži u činjenici da *Helicobacter pylori* kao dokazani kancerogen i važan čimbenik u karcinogenezi intestinalnog tipa karcinoma želuca, može inducirati ekspresiju MAGE-A antigena (225).

Za razliku od MAGE-A10 proteina, NY-ESO-1 je u znatno većem udjelu bio izražen u uzorcima karcinoma. Naime, od 108 uzoraka, njih 75 (70%) je imalo jaku izraženost, a samo 3 uzorka (2.7%) pokazala su slabo izraženu reakciju na NY-ESO-1 antigen. Pri tome je izraženost u epitelnoj komponenti karcinoma snažno korelirala sa slabom izraženošću u stromi tumora. Dosadašnje studije nisu ukazivale na prisutnost i značaj ekspresije CTA antigena u stromi tumora. Poznato je da je tumorska stroma bitan i vrlo dinamičan dio tumorskog mikrokruženja (eng. TME), koji utječe na biologiju tumora i pridonosi inicijaciji karcinoma, progresiji, metastazama i terapijskoj rezistenciji. Tumorske stanice su u neprestanoj interakciji s okolnim stromalnim stanicama otpuštanjem izvanstaničnih vezikula (EV) i ekspresijom signalnih molekula za njihov opstanak i širenje. Stoga smo u ovom istraživanju analizirali i izraženost NY-ESO-1 proteina u miofibroblastima okolne strome tumora.

Dosada objavljena istraživanja uglavnom pokazuju znatno nižu razinu izraženosti u karcinomu želuca (226–228). Tako se razine izraženosti NY-ESO-1 na

razini mRNA kreću od približno 17% do 24%, dok je na razini proteina opisana u do 30% bolesnika s karcinom želuca (212,229,230). Također, treba spomenuti da se izraženost NY-ESO-1 biljeaga mijenja s tumorom te je pokazano da otprilike 75% bolesnika s karcinomom izražava ovaj antigen u nekoj fazi bolesti (202,219).

Naši rezultati više odgovaraju izraženosti NY-ESO-1 proteina nađenim kod drugih tumora, poput neuroblastoma, sinovijalnog sarkoma, melanoma i karcinoma ovarija, gdje su veće od 40% (203,206,231). Kod karcinoma pluća i mokraćnog mjehura ova izraženost je manja i iznosi između 20-30%, dok je kod tumora kolona i bubrega uglavnom odsutna (208). Značajne varijacije u izraženosti ovog antigena kod različitih tipova tumora ponajprije su odraz različitih primijenjenih metoda za detekciju antigena i nestandardiziranog sustava bodovanja pozitiviteta tumorskih stanica. Sustav bodovanja imunohistokemijskog bojenja naših uzoraka moguće je stoga doveo do rezultata viših izraženosti NY-ESO-1 proteina nego je to bio slučaj u do sada objavljenim istraživanjima. Nadalje, razlog navedenim razlikama može se tražiti u različitim protutijelima korištenima za imunohistokemijsku analizu te heterogenoj izraženosti CTA antigena kod solidnih tumora. Naime, za NY-ESO-1 antigen tipična je varijabilna i heterogena ekspresija što može znatno utjecati na rezultate imunohistokemijske analize uzoraka (204). Tako izraženost u pojedinom uzorku može oscilirati od jedne pozitivne stanice do homogene izraženosti cijelog tumora. Iako razlozi ove heterogene izraženosti CTA antigena nisu utvrđeni, nameće se pitanje jeli riječ o stabilnom obilježju pojedinog tumora ili se dinamički mijenja kroz vrijeme (203,208).

Analizom povezanosti NY-ESO-1 antigena s istraživanim kliničko-patološkim parametrima, pronašli smo značajnu povezanost izraženosti NY-ESO-1 proteina u primarnom karcinomu želuca s dubinom invazije tumora (T stadijem), dok s ostalim parametrima nije bilo povezanosti. Tako su karcinomi T3 stadija tumora izražavali protein NY-ESO-1 u 60,8% slučajeva, dok su tumori stadija T1 i T2 bili pozitivni na protein u svega 14,9% slučajeva.

NY-ESO-1 pozitivni tumori također su bili više zastupljeni u II. i III. stadiju bolesti (79% i 75%) u odnosu na I. stadij (55%), ali razlika u izraženosti nije bila statistički značajna. Iako nismo dokazali statističku značajnost, rezultati upućuju na rastući trend izraženosti NY-ESO-1 antigena s uznapredovalim stadijima bolesti. Slični rezultati

opisani su kod karcinoma mokraćnog mjehura, dojke i karcinoma pluća gdje je izraženost proteina NY-ESO-1 bila veća kod uznapredovalih stadija bolesti (232,233). I kod karcinoma želuca je pokazana veća izraženost NY-ESO-1 proteina u uznapredovalim stadijima bolesti, iako je ukupna stopa izraženosti značajno manja u odnosu na naše istraživanje (15,9% kod stadija III i IV) (219).

Rezultati ove studije nisu potvrdili povezanost izraženosti NY-ESO-1 antigena u primarnom karcinomu želuca s metastazama u regionalne limfne čvorove ($p < 0.787$). Iako su neke od studija pokazale povezanost sa statusom limfnih čvorova, u našem istraživanju nismo došli do sličnih zaključaka (226).

Unatoč činjenici da nismo ustanovili razliku u izraženosti NY-ESO-1 proteina prema metastatskom statusu regionalnih limfnih čvorova, nalaz povezanosti izraženosti s dubinom invazije tumora kroz stijenku (T stadij) i veća učestalost NY-ESO-1 pozitivnih karcinoma kod viših stadija bolesti daje naslutiti veći maligni potencijal ovih tumora.

Naši podaci upućuju da su među NY-ESO-1 pozitivnim tumorima najveću zastupljenost imali intestinalni (36,5%) i miješani tip (39,2%) karcinoma. Od svih tipova karcinoma difuzni tip je u najvećem udjelu pokazao pozitivitet na protein NY-ESO-1 (87,5%). U našem istraživanju imamo veći postotak karcinoma miješanog tipa nego je to referirano u WHO klasifikaciji, pa je moguće da je to utjecalo na nedostatak statistički značajne razlike (142). Također se pokazalo da je izraženost NY-ESO-1 bila značajno veća od izraženosti MAGE-A10 u svim histološkim tipovima karcinoma i kliničkim stadijima bolesti.

Opsežna istraživanja izraženosti jednog ili više CTA u različitim tipovima tumora ukazuju kako može biti vrijedan prognostički čimbenik u pogledu preživljenja bolesnika. Tako je izraženost MAGE-A proteina u različitim vrstama karcinoma pokazala njegovu povezanost s lošijom kliničkom prognozom. Primjerice, kod karcinoma pluća nemalih stanica, visoke razine izraženosti NY-ESO-1 i MAGE-A3 povezane su sa smanjenjem stope preživljavanja pacijenata (184,185). Kod karcinoma dojke visoka izraženost MAGE antigena povezana je s većim malignim potencijalom tumora (187). Slično se pokazalo i kod karcinoma jajnika, gdje je izraženost MAGE-A antigena ukazivala na lošiji klinički ishod (223). S druge strane, neke studije pokazale su da visoka izraženost CTA može biti povezana s dobrom

prognozom ili s ranim stadijima bolesti. Primjerice, bolje stope preživljenja pokazane su kod bolesnika s adenokarcinomom pluća s visokom izraženošću MAGE-A3/4 (234).

NY-ESO-1 biljeg također je povezan s lošijom prognozom i agresivnijim fenotipom raznih vrsta tumora (235,236). Također je pokazano da je humoralni odgovor na NY-ESO-1 antigen pokazatelj progresije maligne bolesti (205,235).

Brojne studije pokušale su pokazati utjecaj izraženosti MAGE-A10 i NY-ESO-1 biljega na agresivniji fenotip i lošiji klinički ishod kod karcinoma želuca. Tako je pokazano da je izraženost MAGE-A proteina (MAGE-A1, -A3, -A6, A10 i -A12) povezana s metastazama u limfne čvorove, stadijem bolesti i lošijim preživljenjem (162,220,224,226,237,238). Međutim, nijedna od navedenih studija nije dokazala MAGE-A10 kao neovisni prediktivni čimbenik lošijeg preživljenja. Fujiya i sur. su u svom istraživanju pokazali da je izraženost MAGE-A10 proteina prediktivni marker ranog jetrenog recidiva nakon kurativne gastrektomije kod karcinoma želuca i gastroezofagealnog prijelaza (222). U navedenoj studiji rani jetreni recidiv nađen je u 6 (35,3%) od 17 bolesnika s pozitivnom ekspresijom MAGE-A10, ali u niti u jednom od 4 bolesnika s negativnom ekspresijom. Ni u ovom istraživanju autori nisu pokazali utjecaj izraženosti MAGE-A10 na ukupno preživljenje bolesnika.

Varijabilni, pa čak i kontradiktorni podaci o izraženošću CTA u različitim tumorima i njihovim korelacijama s kliničko-patološkim parametrima i preživljenjem, mogu se objasniti heterogenošću analiziranih uzoraka tumora te različitim metodologijom. Treba napomenuti i da podaci o učestalostima i razinama izraženosti mRNA koja se koristi u većini istraživanja ne moraju odgovarati razinama izraženosti CTA na razni proteina, što dodatno doprinosi raznolikosti podataka.

Za razliku od navedenih studija koje ukazuju na lošiju prognozu bolesnika s malignim oboljenjima, u našem se istraživanju MAGE-A10 nije pokazao kao biomarker lošijeg preživljenja. Naime, ukupno preživljenje bolesnika bilo je jednako bez obzira na izraženost MAGE-A10 antigena u karcinomu. Razlog ovoj razlici u rezultatima može ležati u manjem udjelu uznapredovalih stadija karcinoma želuca (ponajprije stadija IV) nego li je to slučaj u prethodno navedenim istraživanjima. Možemo pretpostaviti da se statistička značajnost u našem istraživanju izgubila zbog planskog grupiranja bolesnika u grupu karcinoma želuca bez metastaza i grupu s metastazama

te znatno manjem udjelu IV. stadija bolesti, dok su u većini drugih istraživanja kohorte bile negrupirane.

Iako u ovoj studiji nismo utvrdili povezanost izraženosti MAGE-A10 i NY-ESO-1 proteina s metastatskim statusom regionalnih limfnih čvorova, bolesnici s pozitivnom izraženošću NY-ESO-1 proteina u karcinomu želuca imali su značajno kraće preživljenje u odnosu na NY-ESO-1 negativne. Tako je više od 85% umrlih sudionika nakon 2 godine bilo pozitivno na NY-ESO-1 antigen. Razlika u preživljenju bila je još izraženija kod bolesnika u ranom stadiju bolesti, tj. bez prisustva metastaza u regionalne limfne čvorove. Dobiveni rezultati, osim što sugeriraju veći maligni potencijal NY-ESO-1 pozitivnih tumora, ujedno ukazuju i na činjenicu da se radi o tumorima koji slabije reagiraju na poznate terapijske modalitete. Iako su rezultati u dostupnim studijama o prognostičkom značaju NY-ESO-1 biljega dvosmisleni, u vlastitom istraživanju pokazali smo utjecaj izraženosti NY-ESO-1 u ranoj fazi bolesti na ukupno preživljenje pacijenata s karcinomom želuca.

Ovi rezultati su na tragu rezultata drugih autora koji su pratili utjecaj NY-ESO-1 antigena na prognozu malignih tumora. Tako je kod većine drugih tipova karcinoma, primjerice melanoma, karcinoma pluća nemalih stanica (eng. NSCLC), miksoidnog liposarkoma i ovarija, izraženost NY-ESO-1 povezana s uznapredovalim stadijem bolesti i nepovoljnom prognozom (184,202,205,227,235).

Fujiwara i sur. su analizirajući izraženost NY-ESO-1 proteina (19/60 uzoraka) i humoralni odgovor kod pacijenata s karcinomom želuca, zaključili da niti humoralni odgovor na NY-ESO-1, niti izraženost NY-ESO-1 proteina nisu imali utjecaj na ukupno preživljenje bolesnika s karcinomom želuca. Međutim, u istoj studiji humoralni imunološki odgovor na NY-ESO-1 antigen u kombinaciji s karcinoembrionalnim antigenom (CEA) i tumorskim markerom CA19-9 pokazao se korisnim tumorskim biljekom za otkrivanje uznapredovalog karcinoma želuca (212). U drugoj studiji autori su pokazali da je prisutnost NY-ESO-1 i p53 protutijela kod bolesnika s karcinomom želuca povezana s progresijom tumora i da je neovisni prediktor lošije prognoze (239).

Navedeni rezultati sugeriraju da bi pozitivna izraženost NY-ESO-1 proteina u tumoru želuca također bila povezana s lošijom prognozom bolesti. Kako bismo istražili utjecaj nekoliko prediktora na preživljenje u vlastitom istraživanju proveli smo i

postupnu multivarijatnu Coxovu regresijsku analizu koja je potvrdila NY-ESO-1 kao neovisni prediktor dvogodišnjeg preživljenja (zajedno s N i T statusom) bolesnika.

Na kraju možemo zaključiti da izraženost NY-ESO-1 u našem istraživanju ukazuje na agresivniji fenotip karcinoma želuca te da može poslužiti kao prediktivni marker lošije prognoze kod bolesnika bez metastaza u regionalne limfne čvorove. Štoviše, izraženost proteina kod bolesnika bez metastaza u regionalne limfne čvorove povezana je s lošim preživljenjem, neovisno od TNM stadija bolesti.

S obzirom na to da naši rezultati pokazuju neovisnu prediktivnu vrijednost NY-ESO-1 proteina, daljnja istraživanja trebalo bi nastaviti na metastatskim sjelima karcinoma želuca kako bismo dobili precizniju sliku. To bi ujedno moglo doprinijeti potvrdi kako ovaj tumorski antigen može biti meta ciljane imunoterapije i biljeg agresivnijeg fenotipa tumora.

7. ZAKLJUČCI

1. Antigen MAGE-A10 izražen je kod malog broja primarnih adenokarcinoma želuca.
2. NY-ESO-1 protein je izražen u oko 75% uzoraka karcinoma želuca; u epitelnoj komponenti pokazuje većinom jaku izraženost dok u stromi istih uzoraka tumora pokazuje slabu izraženost.
3. Izraženost MAGE-A10 i NY-ESO-1 u epitelnim stanicama karcinoma želuca nije u korelaciji s dobi, spolom, veličinom tumora, histološkim tipom karcinoma, TNM stadijem, vaskularnom ili perineuralnom invazijom i kliničkim stadijem bolesti.
4. Jaka izraženost NY-ESO-1 u epitelnoj komponenti karcinoma u korelaciji je s dubljim prodorom u stijenku želuca (pT). Istu značajnu korelaciju pokazuje i NY-ESO-1 izražen u tumorskoj stromi.
5. Nema statistički značajne razlike izraženosti NY-ESO-1 i MAGE-A10 u epitelnoj komponenti karcinoma između karcinoma s i bez metastaza u limfne čvorove.
6. Bolesnici s izraženim NY-ESO-1 u karcinomu imaju lošije dvogodišnje preživljenje u odnosu na one koji nemaju izražen NY-ESO-1, što dodatno dolazi do izražaja kod bolesnika s negativnim regionalnim limfnim čvorovima
7. Analizom višestruke regresije utvrdili smo da je izraženost NY-ESO-1 antigena, uz T i N stadiji bolesti, neovisni prognostički pokazatelji dvogodišnjeg preživljenja bolesnika s karcinomom želuca

8. SAŽETAK

Karcinom želuca (GC) multifaktorijalna je bolest na koju utječu okolišni i genetski čimbenici. Sve više dokaza ukazuje na to da tumor-testis antigeni (CTA) igraju ključnu ulogu u metastatskom potencijalu raznih tumora. Nekoliko je studija povezalo izraženost CTA s većim metastatskim potencijalom i slabim odgovorom na kemoterapiju. Antigeni NY-ESO-1 i MAGE-A10 izraženi su u tumorskim tkivima, dok je njihova izraženost u normalnim tkivima ograničena na spermatogonije.

Ova studija imala je za cilj odrediti izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10 proteina u primarnom adenokarcinomu želuca i usporediti je s nodalnim statusom, TNM stadijem, dobi, spolom i preživljenjem. Analizirali smo uzorke adenokarcinoma želuca 53 bolesnika s negativnim i 55 bolesnika s pozitivnim limfnim čvorovima na izraženost NY-ESO-1 i MAGE-A10 antigena koristeći imunohistokemijski test. Bolesnici s pozitivnom izraženošću NY-ESO-1 u primarnim tumorima imali su medijan preživljenja od 19,0 mjeseci (raspon 14,1-24,0), za razliku od onih s negativnom ekspresijom, koji su imali medijan preživljenja od 52,0 mjeseca (raspon 0,0-133,3) (chi -kvadrat 7,99, P=0,005). T status, N status i izraženost NY-ESO-1 proteina bili su neovisno povezani s kraćim preživljenjem. Antigen MAGE-A10 nije pokazao povezanost s ispitivanim kliničko-patološkim parametrima.

Zaključno, naši rezultati sugeriraju da povećana izraženost NY-ESO-1 antigena potencijalno može poslužiti kao prognostički biomarker za karcinom želuca.

Ključne riječi: karcinom želuca, NY-ESO-1, MAGE-A10, preživljenje

9. SUMMARY

Immunohistochemical expression of MAGE-A10 and NY-ESO-1 proteins in primary gastric adenocarcinoma with and without regional lymph nodes metastases
Zvonimir Misir, 2024.

Gastric cancer (GC) is a multifactorial disease influenced by both environmental and genetic factors. Growing evidence suggests that cancer-testis antigens (CTAs) play a crucial role in the metastatic potential of various tumors. Several studies have linked CTA expression with higher metastatic potential, and poor chemotherapy response. NY-ESO-1 and MAGE-A10 antigens are expressed in tumor tissues, while its expression in normal tissues is restricted to spermatogonia.

This study aimed to determine the expression of NY-ESO-1 and MAGE-A10 in primary adenocarcinoma of the stomach and to compare it with nodal status, TNM stage, age, gender, and survival. We analyzed GC tissue from 53 node-negative and 55 node-positive primary gastric carcinoma patients for NY-ESO-1 and MAGE-A10 expression using immunohistochemical assay. Patients with positive NY-ESO-1 expression in primary tumors had a median survival of 19.0 months (range 14.1–24.0), in contrast to those with negative expression, who had a median survival of 52.0 months (range 0.0–133.3) (chi-square 7.99, $P=0.005$). T status, N status, and NY-ESO-1 expression were all independently associated with shorter survival. MAGE-A10 antigen did not show association with the investigated clinicopathological parameters.

In summary, our findings suggest that increased expression of NY-ESO-1 could potentially serve as a prognostic biomarker for GC.

Keywords: gastric cancer, NY-ESO-1, MAGE-A10, overall survival

10. LITERATURA

1. 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.
2. Morgan E, Arnold M, Camargo MC, Gini A, Kunzmann AT, Matsuda T, i sur. The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. *EClinicalMedicine.* 2022;47:101404.
3. Rosa F, Schena CA, Laterza V, Quero G, Fiorillo C, Strippoli A, i sur. The Role of Surgery in the Management of Gastric Cancer: State of the Art. *Cancers (Basel).* 2022;14(22):5542.
4. Tang S-Y, Zhou P-J, Meng Y, Zeng F-R, Deng G-T. Gastric cancer: An epigenetic view. *World J Gastrointest Oncol.* 2022;14(1):90–109.
5. Iwu CD, Iwu-Jaja CJ. Gastric Cancer Epidemiology: Current Trend and Future Direction. *Hygiene.* 2023;3(3):256–68.
6. Thrift AP, El-Serag HB. Burden of Gastric Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(3):534–42.
7. Soerjomataram I, Cabasag C, Bardot A, Fidler-Benaoudia MM, Miranda-Filho A, Ferlay J, i sur. Cancer survival in Africa, central and south America, and Asia (SURVCAN-3): a population-based benchmarking study in 32 countries. *Lancet Oncol.* 2023;24(1):22–32.
8. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of stomach cancer. *World J Gastroenterol.* 2022;28(12):1187–203.
9. He Y, Wang Y, Luan F, Yu Z, Feng H, Chen B, i sur. Chinese and global burdens of gastric cancer from 1990 to 2019. *Cancer Med.* 2021;10(10):3461–73.
10. Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Čukelj P, Lončar J, Štruc K, i sur. Registar za rak Republike Hrvatske. 2019;(41).
11. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;118(12):3030–44.
12. Powell J, McConkey C. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. *Br J Cancer.* 1990;62(3):440–3.
13. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):225–49.
14. Abdi-Rad A, Ghaderi-sohi S, Nadimi-Barfroosh H, Emami S. Trend in incidence of gastric adenocarcinoma by tumor location from 1969-2004; a study in one referral center in Iran. *Diagn Pathol.* 2006;1(1):5.

15. El-Serag HB, Mason AC, Petersen N, Key CR. Epidemiological differences between adenocarcinoma of the oesophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA. *Gut*. 2002;50(3):368–72.
16. Inoue M. Changing epidemiology of *Helicobacter pylori* in Japan. *Gastric Cancer*. 2017;20(S1):3–7.
17. Fock KM. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(3):250–60.
18. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64(1):31–49.
19. Laurén PA, Nevalainen TJ. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma a time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer*. 1993;71(10):2926–33.
20. Quante M, Bornschein J. Adenocarcinoma of the Stomach and Other Gastric Tumors. In: Sleisenger and Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 11th ed. Elsevier; 2020. p. 820–41.
21. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, et al. Gastric Precancerous Process in a High Risk Population: Cohort Follow-up. *Cancer Res*. 1990;50(15).
22. Gomceli I, Demiriz B, Tez M. Gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(37):5164–70.
23. Muñoz N, Matko I. Histological types of gastric cancer and its relationship with intestinal metaplasia. *Recent Results Cancer Res*. 1972;39:99–105.
24. Correa P. Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*. 1992;52(24).
25. Lee CW, Rickman B, Rogers AB, Ge Z, Wang TC, Fox JG. *Helicobacter pylori* eradication prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice. *Cancer Res*. 2008;68(9):3540–8.
26. Cai X, Carlson J, Stoicov C, Li H, Wang TC, Houghton J. *Helicobacter felis* eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology*. 2005;128(7):1937–52.
27. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Siu HC, Leung SY, Stratton MR. A mutational signature in gastric cancer suggests therapeutic strategies. *Nat Commun*. 2015;6.
28. Koepfel M, Garcia-Alcalde F, Glowinski F, Schlaermann P, Meyer TF. *Helicobacter pylori* Infection Causes Characteristic DNA Damage Patterns in Human Cells. *Cell Rep*. 2015;11(11):1703–13.

29. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006;12(3):354.
30. Devesa SS, Fraumeni JF. The Rising Incidence of Gastric Cardia Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(9):747–9.
31. Weaver JM, Ross-Innes CS, Shannon N, Lynch AG, Forshew T, Barbera M, et al. Ordering of mutations in preinvasive disease stages of esophageal carcinogenesis. *Nat Genet.* 2014;46(8):837–43.
32. Secrier M, Li X, De Silva N, Eldridge MD, Contino G, Bornschein J, et al. Mutational signatures in esophageal adenocarcinoma define etiologically distinct subgroups with therapeutic relevance. *Nat Genet.* 2016;48(10):1131–41.
33. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, Takashi S, et al. Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell.* 2011;19(2):257–72.
34. Jiang L, Gonda TA, Gamble M V., Salas M, Seshan V, Tu S, et al. Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. *Cancer Res.* 2008;68(23):9900–8.
35. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513(7517):202–9.
36. Kim J, Bowlby R, Mungall AJ, Robertson AG, Odze RD, Cherniack AD, et al. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature.* 2017;541(7636):169–74.
37. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med.* 2015;21(5):449–56.
38. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513(7517):202–9.
39. Nagaraja AK, Kikuchi O, Bass AJ. Genomics and Targeted Therapies in Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2019;9(12):1656–72.
40. Díaz del Arco C, Fernández Aceñero MJ, Ortega Medina L. Molecular Classifications in Gastric Cancer: A Call for Interdisciplinary Collaboration. *Int J Mol Sci.* 2024;25(5):2649.
41. Kim J, Bowlby R, Mungall AJ, Robertson AG, Odze RD, Cherniack AD, et al. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature.* 2017;541(7636):169–74.

42. De Vries AC, Kuipers EJ. Epidemiology of Premalignant Gastric Lesions: Implications for the Development of Screening and Surveillance Strategies. *Helicobacter*. 2007;12(s2):22–31.
43. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, i sur. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*. 2012;13(6):607–15.
44. Ishaq S, Nunn L. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a state of the art review. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2015;8(Suppl 1):S6–14.
45. Fagoonee S, Pellicano R. *Helicobacter pylori*: molecular basis for colonization and survival in gastric environment and resistance to antibiotics. A short review. *Infect Dis*. 2019;51(6):399–408.
46. Tempera PJ, Michael M, Tageldin O, Hasak S. Gastric Cancer Due to Chronic *H. pylori* Infection: What We Know and Where We Are Going. *Diseases*. 2022;10(3):57.
47. Cover TL. *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *mBio*. 2016;7(1).
48. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, de Martel C. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*. 2015;136(2):487–90.
49. Bravo D, Hoare A, Soto C, Valenzuela MA, Quest AF. *Helicobacter pylori* in human health and disease: Mechanisms for local gastric and systemic effects. *World J Gastroenterol*. 2018;24(28):3071–89.
50. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection Worldwide: A Systematic Review of Studies with National Coverage. *Dig Dis Sci*. 2014;59(8):1698–709.
51. Ding S-Z, Goldberg JB, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* Infection, Oncogenic Pathways and Epigenetic Mechanisms in Gastric Carcinogenesis. *Future Oncol*. 2010;6(5):851–62.
52. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, i sur. SHP-2 Tyrosine Phosphatase as an Intracellular Target of *Helicobacter pylori* CagA Protein. *Science (1979)*. 2002;295(5555):683–6.
53. Peek RM, Vaezi MF, Falk GW, Goldblum JR, Perez-Perez GI, Richter JE, i sur. Role of *Helicobacter pylori* cagA+ strains and specific host immune responses on the development of premalignant and malignant lesions in the gastric cardia. *Int J Cancer*. 1999;82(4):520–4.
54. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, i sur. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14428–33.

55. Chauhan N, Tay ACY, Marshall BJ, Jain U. *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview. *Helicobacter*. 2019;24(1).
56. Cover TL. *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *mBio*. 2016;7(1).
57. Maleki Kakelar H, Barzegari A, Dehghani J, Hanifian S, Saeedi N, Barar J, i sur. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* in cancer development and impacts of vaccination. *Gastric Cancer*. 2019;22(1):23–36.
58. Stoicov C, Saffari R, Cai X, Hasyagar C, Houghton J. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene*. 2004;341:1–17.
59. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, Jinushi M, Yoshiyama H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Viruses*. 2012;4(12):3420–39.
60. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Molecular Pathology*. 2000;53(5):255–61.
61. Tan P, Yeoh K-G. Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1153-1162.e3.
62. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin CS. Meta-analysis Shows That Prevalence of Epstein–Barr Virus-Positive Gastric Cancer Differs Based on Sex and Anatomic Location. *Gastroenterology*. 2009;137(3):824–33.
63. Kaneda A, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein–Barr Virus Infection as an Epigenetic Driver of Tumorigenesis. *Cancer Res*. 2012;72(14):3445–50.
64. Sun K, Jia K, Lv H, Wang S-Q, Wu Y, Lei H, i sur. EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Oncol*. 2020;10.
65. Wang Z, Liu L, Ji J, Zhang J, Yan M, Zhang J, i sur. ABO Blood Group System and Gastric Cancer: A Case-Control Study and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2012;13(12):13308–21.
66. Paré G, Chasman DI, Kellogg M, Zee RYL, Rifai N, Badola S, i sur. Novel Association of ABO Histo-Blood Group Antigen with Soluble ICAM-1: Results of a Genome-Wide Association Study of 6,578 Women. *PLoS Genet*. 2008;4(7):e1000118.
67. Kim J, Cho YA, Choi WJ, Jeong SH. Gene-diet interactions in gastric cancer risk: A systematic review. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9600–10.
68. Zhang Z, Zhang X. Salt taste preference, sodium intake and gastric cancer in China. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(5):1207–10.
69. Keszei AP, Goldbohm RA, Schouten LJ, Jakszyn P, van den Brandt PA. Dietary N-nitroso compounds, endogenous nitrosation, and the risk of

- esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(1):135–46.
70. Trédaniel J, Boffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A. Tobacco smoking and gastric cancer: Review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 1997;72(4):565–73.
 71. González CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, i sur. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2003;107(4):629–34.
 72. Sung NY, Choi KS, Park EC, Park K, Lee SY, Lee AK, i sur. Smoking, alcohol and gastric cancer risk in Korean men: The National Health Insurance Corporation Study. *Br J Cancer.* 2007;97(5):700–4.
 73. Sjødahl K, Lu Y, Nilsen TLL, Ye W, Hveem K, Vatten L, i sur. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: A population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer.* 2007;120(1):128–32.
 74. Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, Pinheiro-Torres T, Pinto I, Santos-Pereira R, i sur. Smoking and gastric cancer: Systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes and Control.* 2008;19(7):689–701.
 75. Kneller RW, You W-C, Chang Y-S, Liu W-D, Zhang L, Zhao L, i sur. Cigarette Smoking and Other risk Factors for progression of Precancerous Stomach Lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(16):1261–6.
 76. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet.* 2008;371(9612):569–78.
 77. Merry AHH, Schouten LJ, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA. Body mass index, height and risk of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia: A prospective cohort study. *Gut.* 2007;56(11):1503–11.
 78. Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL, Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, i sur. Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(2):150–5.
 79. Lindblad M, Rodríguez LAG, Lagergren J. Body mass, tobacco and alcohol and risk of esophageal, gastric cardia, and gastric non-cardia adenocarcinoma among men and women in a nested case-control study. *Cancer Causes and Control.* 2005;16(3):285–94.
 80. O'Doherty MG, Freedman ND, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. A prospective cohort study of obesity and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma in the NIH-AARP diet and health study. *Gut.* 2012;61(9):1261–8.
 81. MacInnis RJ, English DR, Hopper JL, Giles GG. Body size and composition and the risk of gastric and oesophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2006;118(10):2628–31.

82. Kant P, Hull MA. Excess body weight and obesity—the link with gastrointestinal and hepatobiliary cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(4):224–38.
83. van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, Guilford P, Huntsman D, Hoogerbrugge N, i sur. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline *CDH1* mutation carriers. *J Med Genet*. 2015;52(6):361–74.
84. Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. *Lancet*. 2016;388(10060):2654–64.
85. Pinheiro H, Oliveira C, Seruca R, Carneiro F. Hereditary diffuse gastric cancer – Pathophysiology and clinical management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(6):1055–68.
86. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, i sur. Early Gastric Cancer in Young, Asymptomatic Carriers of Germ-Line E-Cadherin Mutations. *N Engl J Med*. 2001;344(25):1904–9.
87. Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, Cole TRP, Evans DGR, Jankowski JA, i sur. Germline E-cadherin gene (*CDH1*) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 1999;8(4):607–10.
88. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, i sur. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998;392(6674):402–5.
89. Shinmura K, Kohno T, Takahashi M, Sasaki A, Ochiai A, Guilford P, i sur. Familial gastric cancer: Clinicopathological characteristics, RER phenotype and germline p53 and E-cadherin mutations. *Carcinogenesis*. 1999;20(6):1127–31.
90. Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, Senz J, De Luca A, Chun N, i sur. Founder and recurrent *CDH1* mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Am Med Assoc*. 2007;297(21):2360–72.
91. Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H, i sur. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome. *JAMA Oncol*. 2015;1(1):23.
92. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol*. 2015;16(2):e60–70.
93. Gigeck CO, Chen ES, Calcagno DQ, Wisnieski F, Burbano RR, Smith MAC. Epigenetic Mechanisms in Gastric Cancer. *Epigenomics*. 2012;4(3):279–94.
94. Busuttil RA, Boussioutas A. Intestinal metaplasia: A premalignant lesion involved in gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(2):193–201.

95. Capelle LG, de Vries AC, Haringsma J, Ter Borg F, de Vries RA, Bruno MJ, i sur. The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. *Gastrointest Endosc.* 2010;71(7):1150–8.
96. Altayar O, Davitkov P, Shah SC, Gawron AJ, Morgan DR, Turner K, i sur. AGA Technical Review on Gastric Intestinal Metaplasia—Epidemiology and Risk Factors. *Gastroenterology.* 2020;158(3):732-744.e16.
97. Huang RJ, Ende AR, Singla A, Higa JT, Choi AY, Lee AB, i sur. Prevalence, risk factors, and surveillance patterns for gastric intestinal metaplasia among patients undergoing upper endoscopy with biopsy. *Gastrointest Endosc.* 2020;91(1):70-77.e1.
98. Correa P, Piazuelo BM, Wilson KT. Pathology of Gastric Intestinal Metaplasia: Clinical Implications. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(3):493–8.
99. González CA, Sanz-Anquela JM, Companioni O, Bonet C, Berdasco M, López C, i sur. Incomplete type of intestinal metaplasia has the highest risk to progress to gastric cancer: results of the Spanish follow-up multicenter study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016;31(5):953–8.
100. González CA, Pardo ML, Liso JMR, Alonso P, Bonet C, Garcia RM, i sur. Gastric cancer occurrence in preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. *Int J Cancer.* 2010;127(11):2654–60.
101. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and Grading of Gastritis. *Am J Surg Pathol.* 1996;20(10):1161–81.
102. Lahner E, Bordi C, Cattaruzza MS, Iannoni C, Milione M, Delle Fave G, i sur. Long-term follow-up in atrophic body gastritis patients: Atrophy and intestinal metaplasia are persistent lesions irrespective of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22(5):471–81.
103. Siurala M, Lehtola J, Ihamäki T. Atrophic gastritis and its sequelae. Results of 19-23 years' follow-up examinations. *Scand J Gastroenterol.* 1974;9(5):441–6.
104. Kokkola A, Sjöblom SM, Haapiainen R, Sipponen P, Puolakkainen P, Järvinen H. The risk of gastric carcinoma and carcinoid tumours in patients with pernicious anaemia. A prospective follow-up study. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33(1):88–92.
105. De Vries AC, Haringsma J, Kuipers EJ. The Detection, Surveillance and Treatment of Premalignant Gastric Lesions Related to *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter.* 2007;12(1):1–15.
106. Tatsuta M, Iishi H, Nakaizumi A, Okuda S, Taniguchi H, Hiyama T, i sur. Fundal atrophic gastritis as a risk factor for gastric cancer. *Int J Cancer.* 1993;53(1):70–4.
107. Cassaro M, Rugge M, Gutierrez O, Leandro G, Graham DY, Genta RM. Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(6):1431–8.

108. Kato I, Tominaga S, Ito Y, Kobayashi S, Yoshii Y, Matsuura A, i sur. A Prospective Study of Atrophic Gastritis and Stomach Cancer Risk. *Jpn J Cancer Res.* 1992;83(11):1137–42.
109. Schafer LW, Larson DE, Melton LJ, Higgins JA, Zinsmeister AR. Risk of Development of Gastric Carcinoma in Patients With Pernicious Anemia: A Population-Based Study in Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* 1985;60(7):444–8.
110. Murphy JD, Gadalla SM, Anderson LA, Rabkin CS, Cardwell CR, Song M, i sur. Autoimmune conditions and gastric cancer risk in a population-based study in the United Kingdom. *Br J Cancer.* 2024;131(1):138–48.
111. Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, i sur. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology.* 2000;118(1):36–47.
112. Watson SA, Grabowska AM, El-Zaatari M, Takhar A. Gastrin — active participant or bystander in gastric carcinogenesis? *Nat Rev Cancer.* 2006;6(12):936–46.
113. Voutilainen M, Mäntynen T, Kunnamo I, Juhola M, Mecklin JP, Färkkilä M. Impact of clinical symptoms and referral volume on endoscopy for detecting peptic ulcer and gastric neoplasms. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38(1):109–13.
114. Burt RW. Gastric fundic gland polyps. *Gastroenterology.* 2003;125(5):1462–9.
115. Borch K, Skarsgård J, Franzén L, Mårdh S, Rehfeld JF. Benign gastric polyps: Morphological and functional origin. *Dig Dis Sci.* 2003;48(7):1292–7.
116. Jalving M, Koornstra JJ, Wesseling J, Boezen HM, De Jong S, Kleibeuker JH. Increased risk of fundic gland polyps during long-term proton pump inhibitor therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(9):1341–8.
117. Imura J, Hayashi S, Ichikawa K, Miwa S, Nakajima T, Nomoto K, i sur. Malignant transformation of hyperplastic gastric polyps: An immunohistochemical and pathological study of the changes of neoplastic phenotype. *Oncol Lett.* 2014;7(5):1459–63.
118. Attard TM, Cuffari C, Tajouri T, Stoner JA, Eisenberg MT, Yardley JH, i sur. Multicenter Experience with Upper Gastrointestinal Polyps in Pediatric Patients with Familial Adenomatous Polyposis. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(4):681–6.
119. Zea-Iriarte WL, Sekine I, Itsuno M, Makiyama K, Naito S, Nakayama T, i sur. Carcinoma in Gastric Hyperplastic Polyps: A Phenotypic Study. *Dig Dis Sci.* 1996;41(2):377–86.
120. Kamiya T, Morishita T, Asakura H, Miura S, Munakata Y, Tsuchiya M. Long-term follow-up study on gastric adenoma and its relation to gastric protruded carcinoma. *Cancer.* 1982;50(11):2496–503.

121. Goddard AF, Badreldin R, Pritchard DM, Walker MM, Warren B. The management of gastric polyps. *Gut*. 2010;59(9):1270–6.
122. Hansson L-E, Nyrén O, Hsing AW, Bergström R, Josefsson S, Chow W-H, i sur. The Risk of Stomach Cancer in Patients with Gastric or Duodenal Ulcer Disease. *N Engl J Med*. 1996;335(4):242–9.
123. Molloy RM, Sonnenberg A. Relation between gastric cancer and previous peptic ulcer disease. *Gut*. 1997;40(2):247–52.
124. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Winchester D, Osteen R. Cancer of the stomach: A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg*. 1993;218(5):583–92.
125. Barkun A, Leontiadis G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. *Am J Med*. 2010;123(4):358-66.e2.
126. Gururatsakul M, Holloway RH, Talley NJ, Holtmann GJ. Association between clinical manifestations of complicated and uncomplicated peptic ulcer and visceral sensory dysfunction. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(6):1162–9.
127. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Winchester D, Osteen R. Cancer of the stomach: A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg*. 1993;218(5):583–92.
128. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric Carcinoma. *N Engl J Med*. 1995;333(1):32–41.
129. Morgenstern L. The Virchow-Troisier node: A historical note. *Am J Surg*. 1979;138(5):703.
130. Taketa T, Ohigashi S, Suzuki K, Sudo K, Shiozaki H, Suzuki A, i sur. Paraneoplastic neurological syndromes associated with gastric cancer: a case report and review of the literature. *Clin J Gastroenterol*. 2012;5(5):355–60.
131. Graham DY, Schwartz JT, Cain GD, Gyorkey F. Prospective evaluation of biopsy number in the diagnosis of esophageal and gastric carcinoma. *Gastroenterology*. 1982;82(2):228–31.
132. Sleisenger MH, Fordtran JS, Brandt LJ, Friedman LS, Fiedman M. *Gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*. 2010. 2300 p.
133. Hallinan JTPD, Venkatesh SK. Gastric carcinoma: imaging diagnosis, staging and assessment of treatment response. *Cancer Imaging*. 2013;13(2):212–27.
134. Kochi M, Fujii M, Kanamori N, Kaiga T, Kawakami T, Aizaki K, i sur. Evaluation of serum CEA and CA19-9 levels as prognostic factors in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2000;3(4):177–86.
135. Zhang R, Chen X, Chen G, Zhao Z, Wei Y, Zhang F, i sur. Combined Use of Tumor Markers in Gastric Cancer: A Novel Method with Promising Prognostic Accuracy and Practicality. *Ann Surg Oncol*. 2023;30(13):8561–71.

136. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, i sur. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182–8.
137. Damjanov I, Lukić S, Nola M. *Patologija*. Medicinska naklada; 2011.
138. Gotoda T. Endoscopic resection of early gastric cancer: the Japanese perspective. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006;22(5):561–9.
139. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):251–61.
140. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, i sur. The vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. 2000;47(2):251–5.
141. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, i sur. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93–9.
142. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours. 5th ed. Vol 1. Lyon: IARC publications; 2019.
143. Ajani J, In H, Sano T. AJCC Cancer Staging Manual. In: Amin M, ed. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Chicago; 2017.
144. Ajani JA, D’Amico TA, Almhanna K, Bentrem DJ, Chao J, Das P, i sur. Gastric Cancer, Version 3.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(10):1286–312.
145. Smyth EC, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;27:v38–49.
146. Kim SJ, Kim HH, Kim YH, Hwang SH, Lee HS, Park DJ, i sur. Peritoneal metastasis: Detection with 16- or 64 -detector row CT in patients undergoing surgery for gastric cancer. *Radiology*. 2009;253(2):407–15.
147. Davies J, Chalmers AG, Sue-Ling HM, May J, Miller G V, Martin IG, i sur. Spiral computed tomography and operative staging of gastric carcinoma: a comparison with histopathological staging. *Gut*. 1997;41(3):314–9.
148. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, Chung RT, Rubin DT, Wilcox CM. *Sleisenger and Fordtran’s Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 11th ed. Elsevier; 2020.
149. Vreugdenburg TD, Ma N, Duncan JK, Riitano D, Cameron AL, Maddern GJ. Comparative diagnostic accuracy of hepatocyte-specific gadoxetic acid (Gd-EOB-DTPA) enhanced MR imaging and contrast enhanced CT for the

- detection of liver metastases: a systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis.* 2016;31(11):1739–49.
150. Borggreve AS, Goense L, Brenkman HJF, Mook S, Meijer GJ, Wessels FJ, i sur. Imaging strategies in the management of gastric cancer: current role and future potential of MRI. *Br J Radiol.* 2019;92(1097).
 151. Lordick F, Carneiro F, Cascinu S, Fleitas T, Haustermans K, Piessen G, i sur. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2022;33(10):1005–20.
 152. Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, Ajani J. Laparoscopic staging for gastric cancer. *Surgery.* 1996;119(6):611–4.
 153. Sarela AI, Lefkowitz R, Brennan MF, Karpeh MS. Selection of patients with gastric adenocarcinoma for laparoscopic staging. *Am J Surg.* 2006;191(1):134–8.
 154. Leake P-A, Cardoso R, Seevaratnam R, Lourenco L, Helyer L, Mahar A, i sur. A systematic review of the accuracy and indications for diagnostic laparoscopy prior to curative-intent resection of gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2012;15(S1):38–47.
 155. Kinami S, Saito H, Takamura H. Significance of Lymph Node Metastasis in the Treatment of Gastric Cancer and Current Challenges in Determining the Extent of Metastasis. *Front Oncol.* 2022;11.
 156. Japanese Gastric Cancer Treatment Guidelines 2021 (6th edition). *Gastric Cancer.* 2023;26(1):1–25.
 157. Foo M, Crosby T, Rackley T, Leong T. Role of (Chemo)-Radiotherapy in Resectable Gastric Cancer. *Clin Oncol.* 2014;26(9):541–50.
 158. Dan Longo, Anthony Fauci, Dennis Kasper SH, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine: Volumes 1 and 2, 19th Edition.* Mcgraw-hill. 2015.
 159. Bourke MJ, Neuhaus H, Bergman JJ. Endoscopic Submucosal Dissection: Indications and Application in Western Endoscopy Practice. *Gastroenterology.* 2018;154(7):1887-1900.e5.
 160. Shi Y, Zhou Y. The role of surgery in the treatment of gastric cancer. *J Surg Oncol.* 2010;101(8):687–92.
 161. Swan R, Miner TJ. Current role of surgical therapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006;12(3):372.
 162. Lian Y, Sang M, Gu L, Liu F, Yin D, Liu S, i sur. MAGE-A family is involved in gastric cancer progression and indicates poor prognosis of gastric cancer patients. *Pathol Res Pract.* 2017;213(8):943–8.
 163. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, i sur. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio

- are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(51):18538–43.
164. de Visser KE. Spontaneous immune responses to sporadic tumors: tumor-promoting, tumor-protective or both? *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(10):1531–9.
 165. Rahma OE, Khleif SN. Therapeutic vaccines for gastrointestinal cancers. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2011;7(8):517–64.
 166. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, i sur. A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma. *Science (1979)*. 1991;254(5038):1643–7.
 167. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci Ö, 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.
 168. Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun*. 2001;1:1.
 169. Scanlan MJ, Simpson AJG, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun*. 2004;4:1.
 170. Gordeeva O. Cancer-testis antigens: Unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2018;53:75–89.
 171. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(8):615–25.
 172. Esfandiary A, Ghafouri-Fard S. New York esophageal squamous cell carcinoma-1 and cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2015;7(4):411–39.
 173. 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):140.
 174. Kisseleva-Romanova E, Lopreiato R, Baudin-Baillieu A, Rousselle JC, Ilan L, Hofmann K, i sur. Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO J*. 2006;25(15):3576–85.
 175. Honda T, Tamura G, Waki T, Kawata S, Terashima M, Nishizuka S, i sur. Demethylation of MAGE promoters during gastric cancer progression. *Br J Cancer*. 2004;90(4):838–43.
 176. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(14):7149–53.
 177. Ohue Y, Wada H, Oka M, Nakayama E. Antibody response to cancer/testis (CT) antigens: A prognostic marker in cancer patients. *Oncoimmunology*. 2014;3(11):e970032.

178. Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, i sur. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer*. 2000;85(4):460–5.
179. Wang X, Gao X, Xu Y. *MAGED1*: Molecular insights and clinical implications. *Ann Med*. 2011;43(5):347–55.
180. De Plaen E, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora J-P, De Smet C, Brasseur F, i sur. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*. 1994;40(5):360–9.
181. Li S, Shi X, Li J, Zhou X. Pathogenicity of the MAGE family. *Oncol Lett*. 2021;22(6):844.
182. Schultz-Thater E, Piscuoglio S, Iezzi G, Le Magnen C, Zajac P, Carafa V, i sur. MAGE-A10 is a nuclear protein frequently expressed in high percentages of tumor cells in lung, skin and urothelial malignancies. *Int J Cancer*. 2011;129(5):1137–48.
183. Carrel S, Schreyer M, Spagnoli G, Cerottini JC, Rimoldi D. Monoclonal antibodies against recombinant-MAGE-1 protein identify a cross-reacting 72-kDa antigen which is co-expressed with MAGE-1 protein in melanoma cells. *Int J Cancer*. 1996;67(3):417–22.
184. Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjatic S, i sur. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(22):8055–62.
185. Zhang S, Zhai X, Wang G, Feng J, Zhu H, Xu L, i sur. High expression of MAGE-A9 in tumor and stromal cells of non-small cell lung cancer was correlated with patient poor survival. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):541–50.
186. Lian Y, Sang M, Ding C, Zhou X, Fan X, Xu Y, i sur. Expressions of MAGE-A10 and MAGE-A11 in breast cancers and their prognostic significance: A retrospective clinical study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(3):519–27.
187. Ayyoub M, Scarlata C-M, Hamai A, Pignon P, Valmori D. Expression of MAGE-A3/6 in primary breast cancer is associated with hormone receptor negative status, high histologic grade, and poor survival. *J Immunother*. 2014;37(2):73–6.
188. Pineda CT, Ramanathan S, Fon Tacer K, Weon JL, Potts MB, Ou Y-H, i sur. Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell*. 2015;160(4):715–28.
189. Liu W, Cheng S, Asa SL, Ezzat S. The Melanoma-Associated Antigen A3 Mediates Fibronectin-Controlled Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Res*. 2008;68(19):8104–12.

190. Nardiello T, Jungbluth AA, Mei A, DiLiberto M, Huang X, Dabrowski A, i sur. MAGE-A Inhibits Apoptosis in Proliferating Myeloma Cells through Repression of Bax and Maintenance of Survivin. *Clin Cancer Res.* 2011;17(13):4309–19.
191. Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KMR, i sur. MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C Proteins Form Complexes with KAP1 and Suppress p53-Dependent Apoptosis in MAGE-Positive Cell Lines. *Cancer Res.* 2007;67(20):9954–62.
192. Atanackovic D, Hildebrandt Y, Jadczyk A, Cao Y, Luetkens T, Meyer S, i sur. Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. *Haematologica.* 2010;95(5):785–93.
193. Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell.* 2010;39(6):963–74.
194. De Smet C, Lurquin C, Lethé B, Martelange V, Boon T. DNA Methylation Is the Primary Silencing Mechanism for a Set of Germ Line- and Tumor-Specific Genes with a CpG-Rich Promoter. *Mol Cell Biol.* 1999;19(11):7327–35.
195. Bricard G, Bouzourene H, Martinet O, Rimoldi D, Halkic N, Gillet M, i sur. Naturally Acquired MAGE-A10- and SSX-2-Specific CD8 + T Cell Responses in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *J Immunol.* 2005;174(3):1709–16.
196. Valmori D, Dutoit V, Rubio-Godoy V, Chambaz C, Liénard D, Guillaume P, i sur. Frequent cytolytic T-cell responses to peptide MAGE-A10(254-262) in melanoma. *Cancer Res.* 2001;61(2):509–12.
197. 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 Exp Med.* 1998;187(2):265–70.
198. Gjerstorff MF, Kock K, Nielsen O, Ditzel HJ. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Hum Reprod.* 2007;22(4):953–60.
199. Hudolin T, Kastelan Z, Derezić D, Basić-Jukić N, Cesare Spagnoli G, Juretić A, i sur. Expression of MAGE-A1, MAGE-A3/4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in fetal testis. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2009;17(2):103–7.
200. Canale M, Casadei-Gardini A, Ulivi P, Arechederra M, Berasain C, Lollini PL, i sur. Epigenetic Mechanisms in Gastric Cancer: Potential New Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):1–21.
201. Cartron P-F, Blanquart C, Hervouet E, Gregoire M, Vallette FM. HDAC1-mSin3a-NCOR1, Dnmt3b-HDAC1-Egr1 and Dnmt1-PCNA-UHRF1-G9a regulate the *NY-ESO1* gene expression. *Mol Oncol.* 2013;7(3):452–63.
202. Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, i sur. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res.* 2006;12(3 Pt 1):764–71.

203. Nicholaou T, Ebert L, Davis ID, Robson N, Klein O, Maraskovsky E, i sur. Directions in the immune targeting of cancer: lessons learned from the cancer-testis Ag NY-ESO-1. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(3):303–17.
204. Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, i sur. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res.* 2006;95:1–30.
205. Velazquez EF, Jungbluth AA, Yancovitz M, Gnjatic S, Adams S, O'Neill D, i sur. Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM)--correlation with prognostic factors. *Cancer Immun.* 2007;7:11.
206. 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(3):e17876.
207. Klein O, Davis ID, McArthur GA, Chen L, Haydon A, Parente P, i sur. Low-dose cyclophosphamide enhances antigen-specific CD4(+) T cell responses to NY-ESO-1/ISCOMATRIX™ vaccine in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(4):507–18.
208. Jungbluth AA, Chen YT, Stockert E, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, i sur. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer.* 2001;92(6):856–60.
209. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 2009;100(11):2014–21.
210. Nakamura S, Nouse K, Noguchi Y, Higashi T, Ono T, Jungbluth A, i sur. Expression and immunogenicity of NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(8):1281–5.
211. Long Y-Y, Wang Y, Huang Q-R, Zheng G-S, Jiao S-C. Measurement of serum antibodies against NY-ESO-1 by ELISA: A guide for the treatment of specific immunotherapy for patients with advanced colorectal cancer. *Exp Ther Med.* 2014;8(4):1279–84.
212. Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Takahashi T, Fujita J, i sur. NY-ESO-1 antibody as a novel tumour marker of gastric cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(5):1119–25.
213. Pastorcic-Grgic M, Sarcevic B, Dosen D, Juretic A, Spagnoli GC, Grgic M. Prognostic value of MAGE-A and NY-ESO-1 expression in pharyngeal cancer. *Head Neck.* 2010;32(9):1178–84.
214. Schultz-Thater E, Noppen C, Gudat F, Dürmüller U, Zajac P, Kocher T, i sur. NY-ESO-1 tumour associated antigen is a cytoplasmic protein detectable by specific monoclonal antibodies in cell lines and clinical specimens. *Br J Cancer.* 2000;83(2):204–8.

215. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987;8(3):138–40.
216. Kakimi K, Isobe M, Uenaka A, Wada H, Sato E, Doki Y, i sur. A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *Int J Cancer*. 2011;129(12):2836–46.
217. Wada H, Sato E, Uenaka A, Isobe M, Kawabata R, Nakamura Y, i sur. Analysis of peripheral and local anti-tumor immune response in esophageal cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int J Cancer*. 2008;123(10):2362–9.
218. Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. *Cancer Lett*. 2008;266(2):99–115.
219. Wang Y, Wu X-J, Zhao A-L, Yuan Y-H, Chen Y-T, Jungbluth AA, i sur. Cancer/testis antigen expression and autologous humoral immunity to NY-ESO-1 in gastric cancer. *Cancer Immun*. 2004;4:11.
220. Suzuki S, Sasajima K, Sato Y, Watanabe H, Matsutani T, Iida S, i sur. MAGE-A protein and MAGE-A10 gene expressions in liver metastasis in patients with stomach cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(2):350–6.
221. Rimoldi D, Salvi S, Reed D, Coulie P, Jongeneel VC, De Plaen E, i sur. cDNA and protein characterization of human MAGE-10. *Int J Cancer*. 1999;82(6):901–7.
222. Fujiya K, Terashima M, Ohshima K, Aizawa D, Sugino T, Serizawa M, i sur. MAGEA10 expression is a predictive marker of early hepatic recurrence after curative gastrectomy for gastric and gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer*. 2021;24(2):341–51.
223. Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, i sur. Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res*. 1997;17(5A):3559–63.
224. Jung EJ, Kim MA, Lee HS, Yang HK, Lee YM, Lee BL, i sur. Expression of family A melanoma antigen in human gastric carcinoma. *Anticancer Res*. 2005;25(3 B):2105–11.
225. Fukuyama T, Yamazaki T, Fujita T, Uematsu T, Ichiki Y, Kaneko H, i sur. *Helicobacter pylori*, a carcinogen, induces the expression of melanoma antigen-encoding gene (MAGE)-A3, a cancer/testis antigen. *Tumor Biology*. 2012;33(6):1881–7.
226. Futawatari N, Fukuyama T, Yamamura R, Shida A, Takahashi Y, Nishi Y, i sur. Early gastric cancer frequently has high expression of KK-LC-1, a cancer-testis antigen. *World J Gastroenterol*. 2017;23(46):8200–6.

227. 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. *Medicine*. 2019;98(48):e17990.
228. Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Yamaguchi H, Nagashima H, Inoue H, i sur. Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. *Br J Cancer*. 2001;85(5):713–20.
229. Fukuyama T, Futawatari N, Yamamura R, Yamazaki T, Ichiki Y, Ema A, i sur. Expression of KK-LC-1, a cancer/testis antigen, at non-tumour sites of the stomach carrying a tumour. *Sci Rep*. 2018;8(1):6131.
230. Shida A, Futawatari N, Fukuyama T, Ichiki Y, Takahashi Y, Nishi Y, i sur. Frequent High Expression of Kita-Kyushu Lung Cancer Antigen-1 (KK-LC-1) in Gastric Cancer. *Anticancer Res*. 2015;35(6):3575–9.
231. Rodolfo M, Luksch R, Stockert E, Chen Y-T, Collini P, Ranzani T, i sur. Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen. *Cancer Res*. 2003;63(20):6948–55.
232. Sharma P, Gnjatic S, Jungbluth AA, Williamson B, Herr H, Stockert E, i sur. Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. *Cancer Immun*. 2003;3:19.
233. Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, i sur. Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res*. 2001;61(12):4671–4.
234. Grah JJ, Katalinic D, Juretic A, Santek F, Samarzija M. Clinical significance of immunohistochemical expression of cancer/testis tumor-associated antigens (MAGE-A1, MAGE-A3/4, NY-ESO-1) in patients with non-small cell lung cancer. *Tumori*. 2014;100(1):60–8.
235. Szender JB, Papanicolau-Sengos A, Eng KH, Miliotto AJ, Lugade AA, Gnjatic S, i sur. NY-ESO-1 expression predicts an aggressive phenotype of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2017;145(3):420–5.
236. Pastorcic-Grgic M, Sarcevic B, Dosen D, Juretic A, Spagnoli GC, Grgic M. Prognostic value of MAGE-A and NY-ESO-1 expression in pharyngeal cancer. *Head Neck*. 2010;32(9):1178–84.
237. Ogata K, Aihara R, Mochiki E, Ogawa A, Yanai M, Toyomasu Y, i sur. Clinical Significance of Melanoma Antigen-Encoding Gene-1 (MAGE-1) Expression and its Correlation with Poor Prognosis in Differentiated Advanced Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(4):1195–203.
238. Wu J, Wang J, Shen W. Identification of MAGEA12 as a prognostic outlier gene in gastric cancers. *Neoplasma*. 2017;64(2):238–43.

239. Hoshino I, Nabeya Y, Takiguchi N, Gunji H, Ishige F, Iwatate Y, et al. Prognostic impact of p53 and/or NY-ESO-1 autoantibody induction in patients with gastroenterological cancers. *Ann Gastroenterol Surg.* 2020;4(3):275–82.

11. ŽIVOTOPIS

Pristupnik je rođen 25. kolovoza 1983. godine u Zagrebu gdje je pohađao osnovnu i srednju školu te je 2002. godine maturirao u prirodoslovno-matematičkoj gimnaziji Lucijana Vranjanina. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je 2008. godine. Nakon pripravničkog staža u KB Merkur i položenog državnog ispita, radio je kao liječnik hitne medicine u Bjelovaru. Godine 2015. položio je specijalistički ispit iz opće kirurgije, a 2018. godine je postao uži specijalist abdominalne kirurgije. Od 2011. godine radi na Klinici za kirurgiju KBC Sestre milosrdnice.

Upisao je poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2015., a temu doktorske disertacije obranio je 2019. godine. Sudjelovao je aktivno na više stručnih usavršavanja i znanstvenih skupova u Hrvatskoj i inozemstvu. Autor je više znanstvenih članaka i kongresnih sažetaka. Koautor je poglavlja u knjizi Kirurgija (Zdravstveno Veleučilište, 2017.).

Oženjen je i otac troje djece.