

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

lek. Katarzyna Marcisz-Grzanka

Czynniki prognostyczne i predykcyjne w leczeniu chorych z miejscowo zaawansowanym rakiem żołądka i połączenia przełykowo-żołądkowego

*Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne
w formie monotematycznego cyklu publikacji*

*Promotor: prof. dr hab. n. med. Lucjan S. Wyrwicz
Promotor pomocniczy: dr n. med. Agnieszka Kolasińska-Ćwikła*

SPIS TREŚCI

Spis treści.....	2
Streszczenie.....	3
Abstract	7
Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	10
Wykaz aktywności naukowych powiązanych z cyklem publikacji	11
Wstęp	12
Cel pracy.....	15
Materiał i metody	15
Wyniki.....	17
Wnioski.....	18
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.....	19
Artykuł 1	20
Artykuł 2	30
Artykuł 3	38
Podsumowanie.....	62
Piśmiennictwo	63
Oświadczenia współautorów publikacji tworzących rozprawę doktorską ...	66

STRESZCZENIE

WSTĘP

Rak żołądka należy do nowotworów o agresywnym przebiegu i powiązanych z tym złym rokowaniem, które przede wszystkim zależne jest od stopnia zaawansowania w momencie rozpoznania choroby. Leczenie chirurgiczne pozostaje najlepszą metodą leczenia potencjalnie radykalnego, którego skuteczność jest jednak ograniczona przez ryzyko rozsiewu nowotworu. Ponadto około 2/3 pacjentów w populacji zachodniej w momencie diagnozy ma chorobę miejscowo zaawansowaną. Badanie brytyjskie MAGIC i francuskie FNCLCC/FCD 970333 wykazały znaczną korzyść w zakresie całkowitego czasu przeżycia wynikającą z zastosowania chemioterapii okołoooperacyjnej, która jest obecnie złotym standardem postępowania w populacji zachodniej w chorobie miejscowo zaawansowanej. Według analizy Al-Batrana S. i wsp., opublikowanej w czasopiśmie Lancet w 2019 roku, schemat FLOT jest skuteczniejszym typem chemioterapii okołoooperacyjnej niż ECF/ECX. Niestety, odsetek odpowiedzi po chemioterapii neoadjuwantowej pozostaje ograniczony, a ponadto leczenie neoadjuwantowe i/lub adjuwantowe nie zmniejszyło znacząco częstości nawrotów w otrzewnej. Dyskusyjną kwestią pozostaje, czy należy skracać czas trwania leczenia przedoperacyjnego u chorych, którzy nie odpowiadają na to leczenie oraz jakie jest najwłaściwsze postępowanie u chorych z dodatnim wynikiem popłuczyn z otrzewnej. Co więcej, w praktyce klinicznej obecnie nie dysponujemy łatwo dostępnymi biomarkerami surowiczymi umożliwiającymi ocenę dynamiki rozwoju nowotworu, przewidywanie skuteczności terapeutycznej chemioterapii przedoperacyjnej, a tym samym identyfikację pacjentów o dużym ryzyku złej odpowiedzi na to leczenie.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena przydatności obecności komórek nowotworowych w popłuczynach z otrzewnej jako czynnika prognostycznego w długoterminowej ob-

serwacji, identyfikacja surowiczych biomarkerów wczesnej odpowiedzi na chemioterapię neoadjuwantową oraz ocena bezpieczeństwa i skuteczności schematu FLOT w populacji polskiej.

MATERIAŁ I METODY

W pierwszym artykule przedstawiono wyniki prospektywnej, długoterminowej analizy 157 pacjentów, u których przed resekcją żołądka wykonano płukanie otrzewnej z oceną immunocytochemiczną obecności wolnych komórek nowotworowych. Wszystkich pacjentów obserwowano pod kątem punktów końcowych, czyli progresji choroby i śmiertelności. Pozytywny wynik popłuczyn z otrzewnej powiązano z klinicznym stopniem zaawansowania raka żołądka, przeżyciem całkowitym (OS – *Overall Survival*) i przeżyciem wolnym od progresji (PFS – *Progression-Free Survival*).

W drugiej i trzeciej publikacji przedstawiono wyniki prospektywnego badania przeprowadzonego w celu identyfikacji surowiczych biomarkerów wczesnej odpowiedzi na chemioterapię neoadjuwantową oraz oceny bezpieczeństwa i skuteczności schematu FLOT w populacji polskiej. Grupę badaną stanowiło 71 pacjentów i 15 zdrowych ochotników. Na początku badania i przed każdym cyklem w krwi obwodowej oceniono morfologię, parametry biochemiczne, antygen rakowo-embrionalny (CEA), antygen raka 125 (CA125), antygen raka 19.9 (CA19.9) i fibrynogen (F). Krążące komórki nowotworowe (CTCs – *circulating tumour cells*), interleukinę-1 β (IL-1 β), interleukinę-6 (IL-6), interleukinę-8 (IL-8) i interleukinę-10 (IL-10) mierzono w pilotażowej grupie 40 pacjentów na początku leczenia oraz przed cyklem drugim (C2) i cyklem trzecim (C3). Przed każdym podaniem chemioterapii raportowano zdarzenia niepożądane (AEs – *Adverse Events*) zgodnie z CTCAE 5.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, wersja 5.0, 27 listopada 2017). Wszyscy chorzy w profilaktyce pierwotnej gorączki neutropenicznej i neutropenii G3/4 otrzymali czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (GCS-F – *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*). Po resekcji w materiale pooperacyjnym oceniano stopień regresji guza według klasyfikacji

Beckera. Wszystkich pacjentów obserwowano pod kątem punktów końcowych, czyli nawrotu choroby i śmiertelności.

WYNIKI

Analiza statystyczna ujawniła związek pomiędzy obecnością wolnych komórek nowotworowych (FCCs – *free cancer cells*) w popłuczynach z otrzewnej a charakterystyką kliniczną badanych chorych. 5-letni OS i 10-letni OS oraz 5-letni PFS i 10-letnie PFS u pacjentów z ujemnym wynikiem popłuczyn z otrzewnej był dłuższy niż u pacjentów z dodatnim wynikiem.

W sumie 93,4 % (57) pacjentów ukończyło cztery cykle chemioterapii przedoperacyjnej, a 78,7 % (48) otrzymało chemioterapię pooperacyjną. U wszystkich wystąpiła toksyczność G1/2. Jedynie u 24,6 % (15) pacjentów odnotowano działania niepożądane G3/4 podczas chemioterapii przedoperacyjnej oraz u 20,8 % (10) podczas chemioterapii pooperacyjnej. Neutropenia G1/2 wystąpiła odpowiednio u 3 % w porównaniu z 6 % pacjentów, a G3/4 u 5 % w porównaniu z 2 % pacjentów w leczeniu odpowiednio przed- i pooperacyjnym. Nie odnotowano przypadków gorączki neutropenicznej ani infekcji.

Szacowany odsetek 3-letniego czasu wolnego od nawrotu choroby wyniósł 53 % (95 % CI: 40,5; 66,1), podczas gdy szacowany odsetek 3-letniego czasu całkowitego przeżycia wyniósł 60,2 % (95 % CI: 45,1; 72,3).

Spośród wszystkich zmierzonych parametrów jedynie poziom IL-6 w surowicy krwi okazał się potencjalnym biomarkerem odpowiedzi patologicznej na chemioterapię neoadjuwantową. Poziom IL-6 przed C2 chemioterapii był istotnie niższy w grupie całkowitej odpowiedzi patologicznej (pCR – *pathological complete response*) w porównaniu z grupą, w której nie stwierdzono pCR (3,71 pg/ml vs. 7,63 pg/ml, $p=0,004$). Podobna zależność wystąpiła w przypadku podgrupy z niezajętymi węzłami chłonnymi w ocenie patomorfologicznej po zastosowanym leczeniu neoadjuwantowym (ypN0)

w porównaniu z podgrupą z dodatnimi węzłami (ypN+). Poziom IL-6 przed C1 chemioterapii był istotnie wyższy w grupie ypN+ w porównaniu z ypN0 (7,69 pg/ml vs. 2,89 pg/ml, $p=0,022$).

PODSUMOWANIE

Wyniki niniejszej pracy doktorskiej wykazały dobrą skuteczność oraz akceptowalny profil toksyczności chemioterapii okołooperacyjnej według FLOT w populacji polskiej oraz zasadność stosowania w tym schemacie chemioterapii GCS-F jako profilaktyki pierwotnej gorączki neutropenicznej i neutropenii G3/4. Dzięki przeprowadzonym badaniom można potencjalnie uznać IL-6 za czynnik predykcyjny odpowiedzi histopatologicznej na chemioterapię neoadjuwantową, natomiast obecność wolnych komórek nowotworowych w popłuczynach z otrzewnej jako czynnik prognostyczny.

ABSTRACT

BACKGROUND

Gastric cancer is associated with poor prognosis, which is highly dependent on tumour stage at presentation. Surgical treatment remains the best treatment modality for a potential cure. However, the efficacy of this procedure may be substantially limited by the risk of dissemination. Moreover, approximately 2/3 of the Western patients are diagnosed with locally advanced disease. Gastroesophageal junction and gastric cancer treatment no longer involves surgery alone but over the past decade has become multimodality treatment. Most notably, the MAGIC trial and the French FNCLCC/FCD 970333 trial demonstrate a significant survival benefit of perioperative treatment, which is currently a gold standard in the Western population. According to the report by Al-Batran S. et al. published in The Lancet in 2019 the FLOT regimen is more effective type of perioperative chemotherapy than ECF/ECX. Unfortunately, the response rate after neoadjuvant chemotherapy (NAC) remains limited, furthermore adjuvant and/or neoadjuvant treatment did not significantly reduce the rate of peritoneal recurrence. It is debatable whether the duration of preoperative treatment should be shortened in non-responding patients and what is the most appropriate procedure in patients with positive peritoneal washing. Moreover, there are currently no biomarkers enabling an individual prediction of therapeutic efficacy, real tumour dynamics or identifying patients at increased risk of a poor pathological response.

OBJECTIVE

The aim of this study was evaluation of the utility of peritoneal washing immunocytochemistry as a prognostic factor in long-term observation, identification of serum biomarkers of an early response to the neoadjuvant chemotherapy and assessment of safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population.

MATERIALS AND METHODS

In the first article we presented results of a prospective, long-term analysis of 157 patients who underwent peritoneal lavage with immunocytochemistry assessment prior to gastrectomy. All patients were followed up with endpoints of cancer progression and mortality. Positive peritoneal washing immunocytochemistry was associated with clinical staging of gastric cancer, overall survival (OS) and progression-free survival (PFS).

In the second and third publications we presented results of a prospective study conducted in order to identify serum biomarkers of early response to NAC as well as safety and efficacy of FLOT regimen in the Polish population. The study group consisted of 71 patients and 15 healthy volunteers. Complete blood count, blood chemical test, carcinoembryonic antigen (CEA), carcinoma antigen 125 (CA125), carcinoma antigen 19.9 (CA19.9) and fibrinogen (F) were measured at baseline and before every cycle. Circulating tumour cells (CTCs), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) were measured in a pilot group of 40 patients at baseline and before cycle two (C2) and cycle three (C3). We graded adverse events (AEs) according to CTCAE 5.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 5.0, 27 November 2017) before each cycle. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) was used for primary prophylaxis of febrile neutropenia. Pathological tumour regression grade (TRG) of the primary tumour to NAC was evaluated according to the Becker classification. All patients were followed up with endpoints of cancer recurrence and mortality.

RESULTS

Statistical analysis revealed the associations between the presence of free cancer cells (FCCs) in peritoneal washings and clinical characteristics of the study subjects. 5-year OS and 10-year OS as well as 5-year PFS and 10-year PFS of patients with negative peritoneal washing were longer than in patients with positive peritoneal washing.

A total of 93.4% (57) patients completed four cycles of preoperative chemotherapy and 78.7% (48) received postoperative chemotherapy. All of them experienced G1/2 toxicities. Only 24.6% (15) patients had G 3/4 AEs during preoperative chemotherapy and only 20.8% (10) during postoperative chemotherapy. Neutropenia G1/2 occurred in 3% vs. 6% and G3/4 was observed in 5% vs. 2% of patients in preoperative and postoperative treatment, respectively. There were no cases of febrile neutropenia or infections.

The estimated DFS at 3 years was 53% (95% CI: 40.5–66.1%) and the estimated OS at 3 years was 60.2% (95% CI: 45.1–72.3%).

Of all the measured parameters, only the IL-6 serum level was found to be a potential biomarker of the pathological response to NAC. The IL-6 level before C2 of chemotherapy was significantly decreased in the complete pathological response (pCR) vs. the non-pCR group (3.71 pg/mL vs. 7.63 pg/mL, $p=0.004$). A similar relationship was found in the ypN0 (yp – pathological data following systemic therapy, N – nodus) vs. ypN+. The IL-6 level before C1 of chemotherapy was significantly elevated in ypN+ vs. ypN0 (7.69 pg/mL vs. 2.89 pg/mL, $p=0.022$).

CONCLUSIONS

The results of this doctoral thesis showed good effectiveness and an acceptable toxicity profile of perioperative chemotherapy according to FLOT in the Polish population and the validity of using GCS-F chemotherapy as primary prevention of febrile neutropenia in this regimen. Thanks to the conducted research, IL-6 can potentially be considered as a predictive factor of the histopathological response to NAC, while the presence of free tumor cells in peritoneal washings can be considered as a prognostic factor.

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- Artykuł 1: Marcisz-Grzanka K, Wieszczy P, Malinowska M, Wyrwicz LS, Olesinski T. Long-term observation of gastric patients with positive immunocytochemistry of peritoneal washing. *Neoplasma*. **2022**, 69(1), 216-223.
doi: 10.4149/neo_2021_210329N417 PMID: 34881624
Impact Factor: 3,0
- Artykuł 2: Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Palucki J, Wieszczy P, Olesinski T, Jozwiak M, Samsel R, Sulkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population – an analysis of the prospective trial. *Neoplasma*. **2022**, 69(6), 1445-1450.
doi: 10.4149/neo_2022_220720N734 PMID: 36353936
Impact Factor: 3,0
- Artykuł 3: Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Palucki J, Sulkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients. *Cancers*. **2024**, 16(4), 757.
doi: 10.3390/cancers16040757 PMID: 38398148
Impact Factor: 5,2

WYKAZ AKTYWNOŚCI NAUKOWYCH POWIĄZANYCH Z CYKLEM PUBLIKACJI

1. The role of serum tumour markers, inflammation-based markers and circulating tumour cells as surrogate biomarkers of early response to neoadjuvant systemic treatment in patients with resectable gastric cancer. K. Marcisz-Grzanka, T. Olesinski, J. Palucki, M. Fuksiewicz, M. Kowalska, B. Kotowicz, A. Tysarowski, J. Krynski, A. Cencelewicz-Lesikow, J. Zwolinski, E. Kosakowska, D. Czyzewska, K. Seliga, L.S. Wyrwicz. Sesja plakatowa World Congress on Gastrointestinal Cancer 2017, Barcelona. doi: 10.1093/annonc/mdx261.134
2. Long-term survival of gastric cancer patients with positive immunocytochemistry peritoneal washings. K. Marcisz-Grzanka, P. Wieszczy, M. Malinowska, L.S. Wyrwicz, T. Olesinski. Sesja plakatowa ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium 2018, San Francisco. doi: 10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.134
3. Safety and efficacy of FLOT regimen neoadjuvant treatment in Polish population: Interim analysis of prospective biomarker study. K. Marcisz-Grzanka, M. Winiarek, M. Mydlowska, A. Kolasinska-Cwikla, T. Olesinski, R. Samsel, M. Jozwiak, L.S. Wyrwicz. Sesja plakatowa World Congress on Gastrointestinal Cancer 2020, Barcelona. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.1946
4. Efficacy of FLOT regimen in the Polish population – real-world data from a prospective biomarker study. K. Marcisz-Grzanka, M. Winiarek, J. Palucki, P. Wieszczy, T. Olesinski, R. Samsel, U. Sulkowska, A. Kolasinska-Cwikla, M. Jozwiak, L.S. Wyrwicz. Sesja plakatowa World Congress on Gastrointestinal Cancer 2022, Barcelona. doi: 10.1016/j.annonc.2022.04.346
5. IL-1 β and IL-6 as predictors of ypN and early response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced GC and GEJ cancer. K. Marcisz-Grzanka, M. Fuksiewicz, B. Kotowicz, P. Wieszczy, M. Kowalska, M. Winiarek, J. Palucki, T. Olesinski, L.S. Wyrwicz. Sesja plakatowa ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium 2023, San Francisco. doi: 10.1200/JCO.2023.41.4_suppl.454

WSTĘP

Rozprawa doktorska powstała w oparciu o trzy tematycznie powiązane artykuły opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych z impact factor w latach 2022-2024, których uzupełnieniem są doniesienia konferencyjne. Projekt był finansowany z funduszy statutowych Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego (grant naukowy SN/GW24/2017 z dnia 13 lutego 2017 roku) oraz uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Instytutu (zgoda 51/2016/2017 z dnia 5 stycznia 2017 roku).

Rak żołądka i połączenia przełykowo-żołądkowego należy do nowotworów o agresywnym przebiegu i powiązanych z tym złym rokowaniem, które przede wszystkim zależne jest od stopnia zaawansowania w momencie rozpoznania choroby [1,2]. W populacji zachodniej około 2/3 pacjentów w momencie rozpoznania ma miejscowo zaawansowaną chorobę [3]. Z licznych analiz wiemy, że pomimo pierwotnie miejscowego zaawansowania raka żołądka i połączenia przełykowo-żołądkowego należy rozpatrywać jako chorobę mikro-przerzutową. Nawrót po pierwotnie radykalnym leczeniu operacyjnym występuje przede wszystkim w postaci przerzutów odległych. W około 22–54 % przypadków częstym miejscem nawrotu po radykalnej gastrektomii z limfadenektomią D2 jest otrzewna [4,5]. Od ponad dekady w Europie, na podstawie wyników randomizowanych badań klinicznych III fazy (MAGIC, ACCORD-007, EORTC 40954), standardem postępowania terapeutycznego w pierwotnie operacyjnym, miejscowo zaawansowanym raku żołądka i połączenia przełykowo-żołądkowego jest zastosowanie chemioterapii okołoperacyjnej opartej na związkach platyny [6,7]. W świetle nowszych doniesień, zgodnie z wynikami randomizowanego badania III fazy FLOT-AIO/NCT01216644, mediana czasu całkowitego przeżycia (OS – *Overall Survival*) wyniosła 35 miesięcy u chorych otrzymujących leczenie według ECF/ECX vs. 50 miesięcy u chorych otrzymujących leczenie według FLOT. Badany schemat także znacząco wydłużył czas do nawrotu choroby (DFS – *Disease-Free Survival*), 30 miesięcy vs. 18

miesiący. Obecnie za standard leczenia okołooperacyjnego w chorobie miejscowo zaawansowanej uważa się schemat FLOT [8]. Zastosowanie okołooperacyjnego leczenia systemowego wiąże się ze zmniejszeniem wielkości guza pierwotnego, stopnia zaawansowania klinicznego, a także istotnym statystycznie wydłużeniem czasu wolnego od nawrotu choroby (DFS) oraz czasu całkowitego przeżycia (OS), w porównaniu do podgrupy otrzymującej wyłącznie leczenie operacyjne [6-8]. Zastosowanie chemioterapii neoadjuwantowej i/lub adjuwantowej nie zmniejszyło znacząco występowania nawrotów w otrzewnej, które powstają w wyniku wysiania wolnych komórek nowotworowych (FCCs – *free cancer cells*) z pierwotnego guza żołądka [4,9-12]. Wiadomo, że szczególnie rak gruczołowy żołądka o niskim stopniu zróżnicowania oraz rak o niskiej kohezji (*poorly cohesive carcinoma*), w tym *signet ring cell*, ma znacznie większą skłonność do rozwoju przerzutów do otrzewnej [13]. Rokowanie w przypadku nawrotu raka żołądka po leczeniu radykalnym jest niekorzystne [1,2].

Obecnie nie ma ustalonego standardu postępowania u chorych po gastrektomii z dodatnią popłuczyną z otrzewnej. Wprowadzenie dootrzewnowej chemioterapii perfuzyjnej w hipertermii (HIPEC – *hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*) może mieć wpływ na odległe wyniki leczenia w tej grupie pacjentów, jednak związane z tą procedurą dość wysokie ryzyko powikłań uzasadnia określenie właściwej populacji pacjentów do HIPEC.

Kwestią dyskusyjną pozostaje także optymalne postępowanie u 10–15 % chorych, którzy nie odpowiadają na systemowe leczenie przedoperacyjne.

Badania naukowe przeprowadzone w ostatniej dekadzie wyjaśniły podstawowe mechanizmy molekularne i tym samym dostarczyły niezbite dowody na to, że stan zapalny odgrywa kluczową rolę w procesie nowotworzenia. Mikrośrodowisko guza, w skład którego wchodzi komórki zapalne czy mediatory zapalenia takie jak cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu, prostaglandyny, a także aktywacja zrębu, może wywoływać zmiany genetyczne, epigenetyczne, w tym mutacje punktowe w genach supresorowych, metylację DNA, a także post-translacyjne modyfikacje [14-16]. Mają one wpływ na kluczowe szlaki sygnałowe

odpowiedzialne za zachowanie homeostazy komórkowej. Zatem mikrośrodowisko guza odgrywa decydującą rolę w różnych stadiach rozwoju nowotworu, w tym inicjacji, złośliwej transformacji, promocji, inwazji oraz w powstawaniu przerzutów [14-16]. Cytokiny prozapalne: interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6), interleukina-8 (IL-8) oraz czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α – *tumour necrosis factor α*) odgrywają rolę w promocji przerzutowania i kacheksji, podczas gdy cytokiny przeciwzapalne mające działanie immunosupresyjne, takie jak interleukina-10 (IL-10), opisywane są jako marker większego zaawansowania choroby [17,18]. IL-6 oraz IL-8 są istotnym czynnikiem proangiogennym w raku żołądka poprzez indukcję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF – *vascular endothelial growth factor*) [19,20]. Obok cytokin prozapalnych, za czynniki powiązane z rozwojem nowotworu uważa się aktywację układu krzepnięcia i angiogenezy [21].

Niestety, nie dysponujemy obecnie łatwo dostępnymi dla praktyki klinicznej markerami, na podstawie których możliwe byłoby wczesne przewidywanie dynamiki rozwoju nowotworu oraz odpowiedzi na leczenie indukcyjne, a tym samym identyfikowanie pacjentów o dużym ryzyku złej odpowiedzi patologicznej ocenianej w materiale pooperacyjnym według klasyfikacji Beckera TRG (stopień regresji guza [*tumour regression grade*]). Odsetek 5-letniego czasu całkowitego przeżycia (OS) w podgrupie ypN0 i TRG1a wynosi 82 % i jest znacznie dłuższy w porównaniu z podgrupą chorych ypN+ i TRG1a<0, w której wynosi 46 % ($p<0,001$) [22]. Analiza wieloczynnikowa przeprowadzona przez Smyth E. i wsp. wykazała, że obecność przerzutów do węzłów chłonnych w materiale pooperacyjnym (ypN+) jest jedynym niezależnym czynnikiem predykcyjnym OS u pacjentów po chemioterapii przedoperacyjnej [23]. Zależność ta została również potwierdzona przez ostatnio przeprowadzoną analizę Athauda A. i wsp. [24]. Odpowiedź na chemioterapię neoadjuwantową stanowi istotny czynnik prognostyczny dotyczący czasu przeżycia wolnego od choroby (DFS) i czasu przeżycia całkowitego (OS) [22-25]. Jak wykazało badanie przeprowadzone w ośrodku MD Anderson Cancer Center Uniwersytetu Teksasńskiego, stopień patomorfologiczny zaawansowania choroby oceniony na podstawie materiału pooperacyjnego ypTNM

(T – guz [*tumour*], N – węzeł [*nodus*], M – przerzuty [*metastases*]) pozwala na przewidywanie przeżycia, podczas gdy nie ma takiej zależności dla stopnia zaawansowania klinicznego cTNM [26]. U pacjentów ze zmniejszeniem stopnia zaawansowania choroby DFS i OS są dłuższe niż u pacjentów bez odpowiedzi na przedoperacyjną chemioterapię a najlepsze wyniki obserwuje się u pacjentów z całkowitą odpowiedzią patologiczną (pCR – *pathological complete response*) [22-25].

Powyższe obserwacje wskazują na konieczność rozwijania markerów wczesnej odpowiedzi, aby w przyszłości umożliwić klinicyście zastosowanie bardziej zindywidualizowanego podejścia, m.in. uniknięcia narażenia pacjentów na potencjalną toksyczność niepotrzebnej chemioterapii, poprawiając w ten sposób jakość życia, obniżając koszty leczenia a także umożliwiając rozważenie wcześniejszego wykonania zabiegu operacyjnego.

CEL PRACY

Celem pracy była:

- ocena przydatności obecności komórek nowotworowych w popłuczynach z otrzewnej jako czynnika prognostycznego w długoterminowej obserwacji;
- ocena przydatności surowiczych markerów nowotworowych, wykładników nasilenia stanu zapalnego oraz krążących komórek nowotworowych jako markerów wczesnej odpowiedzi na neoadjuwantowe leczenie systemowe według schematu FLOT;
- ocena bezpieczeństwa i skuteczności schematu FLOT w populacji polskiej.

MATERIAŁ I METODY

W pierwszym artykule przedstawiono wyniki prospektywnej, długoterminowej analizy pacjentów, u których przed gastrektomią wykonano laparotomię i śródoperacyjne płukanie otrzewnej (*lavage*) w celu uzyskania materiału do oceny immunocytochemicznej. Wszystkich pacjentów obserwowano pod kątem progresji nowotworu

i śmiertelności. Pozytywny wynik popłuczyn z otrzewnej powiązano z klinicznym stopniem zaawansowania raka żołądka, przeżyciem całkowitym (OS) i przeżyciem wolnym od progresji (PFS).

W drugiej i trzeciej publikacji przedstawiono wyniki prospektywnego badania przeprowadzonego w celu identyfikacji surowiczych biomarkerów wczesnej odpowiedzi na chemioterapię przedoperacyjną oraz w celu oceny bezpieczeństwa i skuteczności schematu FLOT w populacji polskiej. Grupę badaną stanowiło 71 chorych z potwierdzonym histopatologicznie, miejscowo zaawansowanym rakiem żołądka lub połączenia przełykowo-żołądkowego, którzy zostali zakwalifikowani przez zespół wielodyscyplinarny do chemioterapii okołooperacyjnej według schematu FLOT oraz 15 zdrowych ochotników. Na początku badania i przed każdym cyklem oceniono pełną morfologię krwi z rozmazem, parametry biochemiczne, antygen rakowo-płodowy (CEA), antygen raka 125 (CA125), antygen raka 19.9 (CA19.9) i fibrynogen (F). Krążące komórki nowotworowe (CTCs – *circulating tumour cells*), interleukinę-1 β (IL-1 β), interleukinę-6 (IL-6), interleukinę-8 (IL-8) i interleukinę-10 (IL-10) oceniono w pilotażowej grupie 40 pacjentów na początku leczenia oraz przed cyklem drugim (C2) i cyklem trzecim (C3). Zdarzenia niepożądane oceniono zgodnie z CTCAE 5.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, wersja 5.0, 27 listopada 2017) przed każdym podaniem leczenia.

Wszyscy pacjenci otrzymywali w profilaktyce pierwotnej gorączki neutropenicznej i neutropenii G3/4 czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF – *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*). Po resekcji żołądka w materiale pooperacyjnym oceniano regresję patologiczną guza według klasyfikacji Beckera. Wszystkich pacjentów obserwowano pod kątem punktów końcowych, czyli nawrotu choroby i śmiertelności.

WYNIKI

Analiza statystyczna ujawniła związek pomiędzy obecnością wolnych komórek nowotworowych (FCCs) w popłuczynach z otrzewnej a charakterystyką kliniczną badanych chorych. 5-letni OS i 10-letni OS pacjentów z ujemnym wynikiem popłuczyn z otrzewnej był dłuższy niż u pacjentów z dodatnim wynikiem (94,2 miesiące [95 % CI: 88,7–97,12] vs. 94,7 miesiące [95 % CI: 68,1–99,2] oraz 85,5 miesiące [95 % CI: 68,1–99,2] vs. 57,9 miesiące [95 % CI: 33,2–76,3]) odpowiednio. Także 5-letni PFS i 10-letni PFS u pacjentów z ujemnym wynikiem popłuczyn z otrzewnej był dłuższy niż u pacjentów z dodatnim wynikiem (87,7 miesiące [95 % CI: 80,9–92,2] vs. 84,2 miesiące [95 % CI: 58,7–94,6] oraz 76,1 miesiące [95 % CI: 58,7–94,6] vs. 31,6 [95 % CI: 12,9–52,3]) odpowiednio.

W sumie 93,4 % (57) pacjentów ukończyło cztery cykle chemioterapii przedoperacyjnej a 78,7 % (48) otrzymało chemioterapię pooperacyjną. U wszystkich wystąpiła toksyczność G1/2 wg CTCAE. Częstymi zdarzeniami niepożądanymi (AEs) G1/2 w chemioterapii przed- i pooperacyjnej odpowiednio były: zmęczenie (75 % vs. 60 %), niedokrwistość (64 % vs. 62 %), nudności (60 % vs. 60 %), neuropatia obwodowa (60 % vs. 60 %) i zapalenie błony śluzowej jamy ustnej (59 % vs. 50 %). Jedynie 24,6 % (15) pacjentów miało AE G3/4 podczas chemioterapii przedoperacyjnej i jedynie 20,8 % (10) podczas chemioterapii pooperacyjnej. W wyniku pierwotnej profilaktyki GCS-F neutropenia G1/2 wystąpiła odpowiednio u 3 % vs. 6 % pacjentów a G3/4 odpowiednio u 5 % vs. 2 % pacjentów w leczeniu przed- i pooperacyjnym. Nie odnotowano przypadków gorączki neutropenicznej ani infekcji.

Szacowany odsetek 3-letniego czasu wolnego od nawrotu choroby wyniósł 53 % (95 % CI: 40,5; 66,1), podczas gdy szacowany odsetek 3-letniego czasu całkowitego przeżycia wyniósł 60,2 % (95 % CI: 45,1; 72,3).

Spośród wszystkich zmierzonych parametrów, jedynie poziom IL-6 w surowicy krwi okazał się potencjalnym biomarkerem odpowiedzi patologicznej na chemioterapię neoadjuwantową. Poziom IL-6 przed C2 chemioterapii był istotnie niższy w grupie

całkowitej odpowiedzi patologicznej (pCR – *pathological complete response*) w porównaniu z grupą, w której nie stwierdzono pCR (3,71 pg/ml vs. 7,63 pg/ml, $p=0,004$). U wszystkich pacjentów z poziomem IL-6 poniżej 5,0 pg/ml w C2 w pooperacyjnym materiale histopatologicznym wykryto regresję guza TRG1a/1b według klasyfikacji Beckera i ypN0. Poziom IL-6 przed C1 chemioterapii był istotnie wyższy w grupie ypN+ w porównaniu z ypN0 (7,69 pg/ml vs. 2,89 pg/ml, $p=0,022$).

WNIOSKI

Wyniki niniejszej pracy doktorskiej wykazały dobrą skuteczność oraz akceptowalny profil toksyczności chemioterapii okołooperacyjnej wg FLOT w populacji polskiej oraz zasadność stosowania w tym schemacie chemioterapii GCS-F jako profilaktyki pierwotnej.

Dzięki przeprowadzonym badaniom można potencjalnie uznać IL-6 za czynnik predykcyjny odpowiedzi histopatologicznej na chemioterapię przedoperacyjną. Oznaczenie poziomu IL-6 w surowicy krwi przed rozpoczęciem leczenia i przed podaniem C2 chemioterapii neoadjuwantowej prawdopodobnie umożliwia szybką identyfikację chorych ypN+ i non-pCR o złym rokowaniu. Badanie jednak wymaga potwierdzenia na większej grupie chorych.

Długoterminowa obserwacja wykazała przydatność oceny obecności komórek nowotworowych w popłuczynach z otrzewnej jako czynnika prognostycznego, a tym samym wstępną identyfikację chorych, u których zastosowanie procedury HIPEC może mieć wpływ na odległe wyniki leczenia.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

ARTYKUŁ 1

Long-term observation of gastric cancer patients with positive immunocytochemistry of peritoneal washing

Długoterminowa obserwacja chorych z rakiem żołądka z dodatnim wynikiem popłuczyn otrzewnej w ocenie immunocytochemicznej

Celem pracy była ocena długoterminowej wartości prognostycznej badania immunocytochemicznego popłuczyn z otrzewnej jako czynnika prognostycznego u chorych na raka żołądka.

W okresie od czerwca 2002 r. do listopada 2004 r. przeprowadzono prospektywne nierandomizowane badanie akademickie. Głównymi kryteriami włączenia do badania były: histopatologiczne potwierdzenie raka gruczołowego żołądka, wykluczenie w badaniach obrazowych przerzutów odległych, w tym rozsiewu do otrzewnej, kwalifikacja do gastrektomii totalnej lub subtotalnej z limfadenektomią D2. W czasie prowadzenia badania leczenie okołooperacyjne nie było rutynowym podejściem, dlatego tylko 49 chorych otrzymało leczenia adjuwantowe (16 chorych: McDonald CRT, 33 pacjentów: chemioterapię wg różnych protokołów). Po otwarciu jamy brzusznej metodą otrzewnowego lavage uzyskano materiał do oceny cytopatologicznej u 157 chorych. Materiał oceniono w barwieniach hematoksyliną-eozyną (HE), a także w barwieniach immunocytochemicznych przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko cytokeratynie 19 (CK19), cytokeratynie AE1/AE3 (CK-AE1/AE3) i markerowi międzybłonniaka. Oceny dokonało dwóch niezależnych patologów.

W badanej grupie u 12,1 % pacjentów w ocenie immunocytochemicznej popłuczyn z otrzewnej wykryto wolne komórki nowotworowe (FCCs – *Free Cancer Cells*). Najczęściej wynik pozytywny uzyskano u chorych z rakiem rozlanym wg Laurena (73,7 %), oraz o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego G3 (84 %), a także

u chorych ze wskaźnikiem węzłowym $\geq 0,20$ (węzły dodatnie/wszystkie zbadane węzły) (78,9 %). Analiza czasu przeżycia u chorych wykazała dłuższy zarówno 5-letni OS, jak i 10-letni OS u pacjentów z wynikiem negatywnym lavage, w porównaniu z podgrupą chorych z wynikiem pozytywnym lavage (94,2 miesiące [95 % CI: 88,7–97,12] vs. 94,7 miesiące [95 % CI: 68,1–99,2] i 85,5 miesiące [95 % CI: 78,4–90,4] vs. 57,9 miesiące [95 % CI: 33,2–76,3]). Podobną zależność wykazano także dla 5-letniego oraz 10-letniego czasu wolnego od progresji choroby (PFS) (87,7 miesiące [95 % CI: 80,9–92,2] vs. 84,2 miesiące [95 % CI: 58,7–94,6] i 76,1 miesiące [95 % CI: 68,1–82,4] vs. 31,6 miesiące [95 % CI: 12,9–52,3]). Dodatni wynik popłuczyn z otrzewnej stanowił niezależny czynnik złego rokowania.

Mając na uwadze, że otrzewna jest preferencyjnym miejscem rozsiewu gruczolakoraka żołądka oraz iż nie ma do tej pory ustalonego standardu leczenia u chorych z rakiem żołądka z obecnością wolnych komórek nowotworowych w popłuczynach z otrzewnej, w ośrodkach o dużym doświadczeniu należy rozważyć procedurę HIPEC. Ograniczeniem tego badania jest brak zastosowania chemioterapii indukcyjnej, która od 2007 roku stanowi standard postępowania. Obecnie, patrząc na dostępność od 2017 roku bardziej aktywnej chemioterapii wg schematu FLOT, należy rozważyć powtórzenie badania po zastosowaniu chemioterapii indukcyjnej według ww. protokołu.

Long-term observation of gastric cancer patients with positive immunocytochemistry of peritoneal washing

Katarzyna MARCISZ-GRZANKA^{1,*}, Paulina WIESZCZY², Małgorzata MALINOWSKA³, Lucjan Stanisław WYRWICZ¹, Tomasz OLESINSKI⁴

¹Department of Clinical Oncology and Radiotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland; ²The Medical Centre for Postgraduate Education, Warsaw, Poland; ³Department of Histopathology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland; ⁴Department of Gastrointestinal Oncology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland

*Correspondence: marcisz.grzanka@gmail.com

Received March 29, 2021 / Accepted June 29, 2021

Prognosis in gastric cancer patients is highly dependent on the tumor stage at presentation. Surgery still remains the main therapeutic option in gastric cancer patients. However, the efficacy of this treatment may be substantially limited by the risk of peritoneal dissemination. The introduction of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) may affect the long-term outcomes in this group of patients, but high morbidity associated with this procedure provides the rationale to identify the correct population of patients for HIPEC. The aim of the study was to evaluate a long-term prognostic value of peritoneal washing immunocytochemistry as a prognostic factor in patients with gastric cancer. This is a prospective, long-term analysis of patients who underwent peritoneal lavage with immunocytochemistry assessment in the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, in Warsaw, Poland. Between January 2002 and November 2004, a total of 157 patients with histologically confirmed gastric cancer were enrolled in the study. Laparotomy and intra-operative peritoneal lavage for immunocytochemistry examination were performed prior to gastrectomy. All patients were followed up with endpoints of cancer recurrence and mortality. Positive peritoneal washing immunocytochemistry was associated with clinical staging of gastric cancer, overall survival, and progression-free survival. It is an independent poor outcome prognostic factor.

Key words: gastric cancer, peritoneal washing, HIPEC, immunocytochemistry, CTCs

Gastric cancer has been reported as the fourth most common cancer and the second leading cause of cancer deaths worldwide [1, 2]. Adenocarcinoma constitutes 90% of all gastric malignancies [3]. Approximately 2/3 of the western patients are diagnosed with locally advanced disease [4]. Prognosis in gastric cancer patients is highly dependent on the tumor stage at presentation [4]. Surgical treatment remains the best treatment modality for a potential cure.

Despite developments in surgical treatment, the efficacy of gastrectomy with extended lymph node dissection may be substantially limited by the risk of peritoneal dissemination [5, 6]. It is caused by the seeding of free cancer cells from primary gastric cancer [5]. This is one of the most common types of metastases for gastric cancer, ranging from 22–54%. An especially poorly differentiated type or signet ring cell type is known to have a much higher tendency to develop peritoneal metastasis [7]. The prognosis of recurrent gastric cancer is still dismal. The introduction of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) may affect the long-

term outcomes in this group of patients, but high morbidity associated with this procedure provides the rationale to identify the correct population of patients for HIPEC. The aim of the study was to evaluate a long-term prognostic value of peritoneal washing immunocytochemistry as a prognostic factor in patients with gastric cancer.

Patients and methods

Study. This nonrandomized, prospective study was conducted in the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland. The study was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki for medical research and was approved by the Local Bioethics Committee at the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology in Warsaw.

Inclusion criteria. The patients were enrolled between June 2002 and November 2004. The main inclusion criteria were as follows: diagnosis of gastric cancer with no sign

of metastasis including the peritoneal spread of disease, patients who were qualified for gastrectomy with D2 lymphadenectomy.

The procedures of total or subtotal gastrectomy with D2 lymphadenectomy and peritoneal lavage were performed in 157 gastric cancer patients aged 29–86 years (median 65 years), including 47 females and 110 males. The results of HE and immunocytochemistry of peritoneal washes were analyzed in all 157 patients who underwent surgery during the study period.

Peritoneal washing with cellblock and IHC is a routine procedure in diagnostic laparoscopy, which is highly recommended in T2-T4 and/or N+ gastric cancer, in accordance with the ESMO guidelines.

Perioperative treatment was not a routine approach at the time of the study. 49 patients underwent postoperative treatment alone (16 patients – McDonald CRT, 33 patients – chemotherapy according to different protocols). HIPEC procedure was not applied in the study. Demographic characteristics of patients are presented in Table 1.

After opening the abdominal cavity, 250 ml of normal (0.9%) saline was infused intraperitoneally, left for several minutes, and aspirated. The fluid recovered was centrifuged and the sediment was fixed in 10% buffered formalin for 24 h, embedded in paraffin, and cut into 4 µm thick sections. Aside from HE staining, microscopic slides were also labeled with monoclonal antibodies against cytokeratin 19 (CK-19), cytokeratin AE1/AE3 (CK-AE1/AE3) (cytokeratin staining manufacturer: DAKO, catalog number IR053), and mesothelioma marker (mesothelial cells staining manufacturer: DAKO, catalog number M 3505-clone HBME-1), and examined by two independent pathologists.

Results

In 12.1% of patients whose peritoneal washes were examined, free cancer cells (FCCs) were detected by immunocytochemical analysis (Figures 1A–1C).

Statistical analysis revealed the associations between the presence of FCCs in peritoneal washings and clinical characteristics of the study subjects: clinical stage at presentation according to the 7th AJCC TNM system, lymph node ratio (positive nodes/total nodes examined), vessel and nerve involvement, histopathological grade, and completeness of resection. The positive peritoneal washing was most frequently observed in the diffuse type (73.7%) according to Lauren classification and in tumor grade G3 (84.2%). Lymph node ratio ≥ 0.20 was also associated with positive peritoneal washing (78.9%). These values are presented in Table 2.

Even when the clinical stage according to the TNM system was known, the ratio of lymph nodes, completeness of resection, and immunocytochemistry of peritoneal washing were an important predictor of progression-free time (PFS, Table 3). P-values in multivariable models showed the same correlation of these parameters to overall survival (OS, Table 4).

Table 1. Demographic characteristic of study group.

Parameter	N=157	Results of immunocytochemistry of peritoneal washing		p-value
		Negative N=138	Positive N=19	
Age				0.001
29–49	22	13 (9.4)	9 (47.4)	
50–64	56	50 (36.2)	6 (31.6)	
65–69	34	32 (23.2)	2 (10.5)	
70–86	45	43 (31.2)	2 (10.5)	
Sex				0.435
Female	47	43 (31.2)	4 (21.1)	
Male	110	95 (68.8)	15 (78.9)	

Table 2. Clinicopathological characteristic of study group.

Parameter	N=157	Results of immunocytochemistry of peritoneal washing		p-value
		Negative N=138	Positive N=19	
Completeness of resection				0.480
Yes	152	134 (97.1)	18 (94.7)	
No	5	4 (2.9)	1 (5.3)	
Lymph node ratio				0.007
< 0.20	80	76 (55.1)	4 (21.1)	
≥ 0.20	77	62 (44.9)	15 (78.9)	
Tumor grade				0.296
G1	11	11 (8.0)	0	
G2	41	38 (27.5)	3 (15.8)	
G3	105	89 (64.5)	16 (84.2)	
Involvement of blood vessels				0.007
No	108	100 (72.5)	8 (42.1)	
Yes	49	38 (27.5)	11 (57.9)	
Involvement of nerves				0.745
No	130	115 (83.3)	15 (78.9)	
Yes	27	23 (16.7)	4 (21.1)	
Lauren classification				0.001
Intestinal type	56	55 (39.9)	1 (5.3)	
Mixed type	42	38 (27.5)	4 (21.1)	
Diffuse type	59	45 (32.6)	14 (73.7)	
TNM stage				0.003
IA	22	22 (15.9)	0	
IB	16	16 (11.6)	0	
IIA	18	17 (12.3)	1 (5.3)	
IIB	16	13 (9.4)	3 (15.8)	
IIIA	22	21 (15.2)	1 (5.3)	
IIIB	42	36 (26.1)	6 (31.6)	
IIIC	17	10 (7.2)	7 (36.8)	
IV	4	3 (2.2)	1 (5.3)	

The median follow-up time of patients with negative peritoneal washing was longer than in patients with positive peritoneal washing (38.4 [range 1–170] vs. 11 [range 2–55] and 30.5 [range 1–170] vs. 8 [range 1–50.9]), respectively.

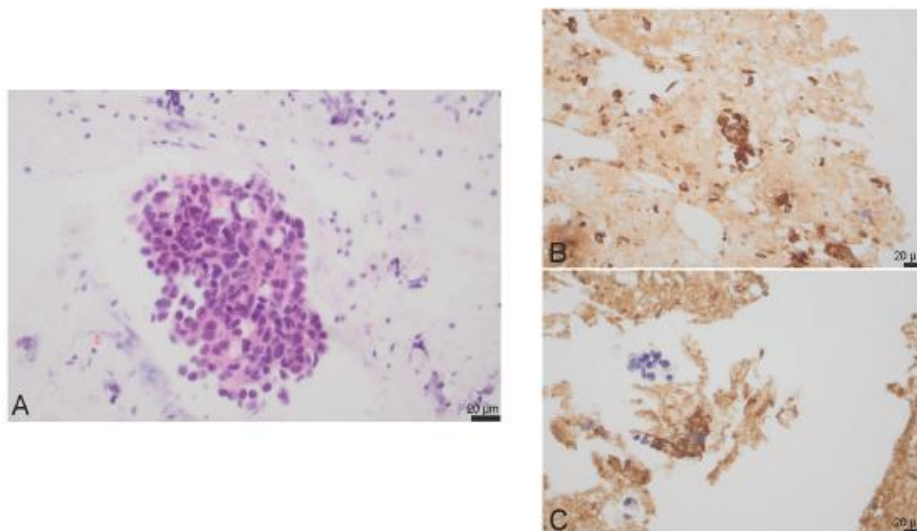


Figure 1. Cancer cells in cytology. A) HE $\times 400$, B) cyokeratin positive staining $\times 400$, C) mesothelial cells negative staining $\times 400$ (courtesy of Professor A. Mróz, Department of Histopathology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland)

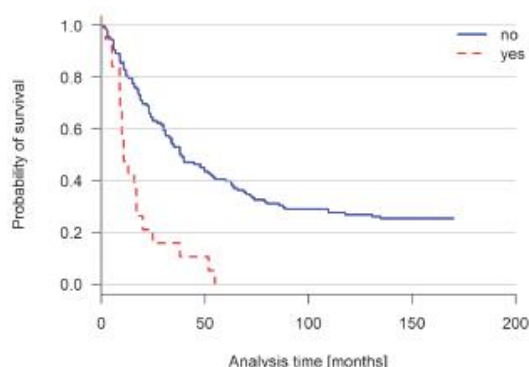


Figure 2. Kaplan-Meier probability of overall survival (OS) in gastric cancer patients with positive (yes) and negative (no) results of immunocytochemical of peritoneal washing.

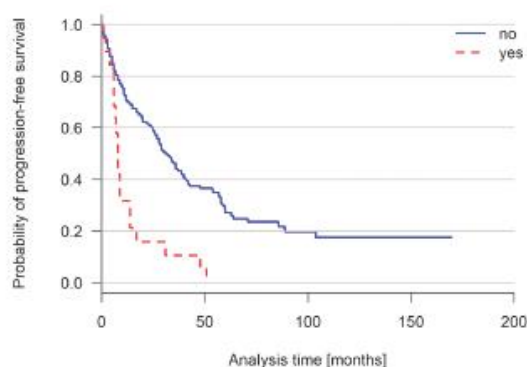


Figure 3. Kaplan-Meier probability of progression-free survival (PFS) in gastric cancer patients with positive (yes) and negative (no) results of immunocytochemical of peritoneal washing.

5-year OS and 10-year OS of patients with negative peritoneal washing was longer than in patients with positive peritoneal washing (94.2 [95% CI 88.7–97.12] vs. 94.7 [95% CI 68.1–99.2] and 85.5 [95% CI 78.4–90.4] vs. 57.9 [95% CI 33.2–76.3]), respectively (Figure 2).

5-year PFS and 10-year PFS of patients with negative peritoneal washing was longer than in patients with positive peritoneal washing (87.7 [95% CI 80.9–92.2] vs. 84.2 [95%

CI 58.7–94.6] and 76.1 [95% CI 68.1–82.4] vs. 31.6 [95% CI 12.9–52.3]), respectively (Figure 3).

Chi-square test and exact Fisher test were used to compare categorical variables. Follow-up time was initiated in June 2002 and censored in November 2018. Univariable and multivariable Cox proportional-hazard models were used to estimate hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals. Forward stepwise regression at 0.1 signifi-

Table 3. Progression-free survival (PFS) of study group.

Variable	N	Progression	Univariable model HR (95% CI)	p-value	Multivariable model HR (95% CI)	p-value
Age						
29–49	22	14 (63.6)	1.00		1.00	
50–64	56	41 (73.2)	1.15 (0.63–2.11)	0.657	1.38 (0.63–3.03)	0.424
65–69	34	29 (85.3)	1.33 (0.70–2.53)	0.375	1.90 (0.85–4.25)	0.117
70–86	45	39 (86.7)	1.83 (0.99–3.38)	0.052	3.00 (1.39–6.46)	0.005
Sex						
Female	47	33 (70.2)	1.00			
Male	110	90 (81.8)	1.21 (0.81–1.81)	0.352		
Results of immunocytochemistry of peritoneal washing						
Negative	138	104 (75.4)	1.00		1.00	
Positive	19	19 (100)	3.10 (1.86–5.15)	<0.001	2.31 (1.15–4.63)	0.018
Completeness of resection						
Yes	152	118 (77.6)	1.00			
No	5	5 (100)	4.56 (1.83–11.35)	0.001	3.41 (1.33–8.77)	0.011
Lymph node ratio						
<0.20	80	49 (61.3)	1.00		1.00	
≥0.20	77	74 (69.1)	3.61 (2.49–5.24)	<0.001	2.15 (1.42–3.25)	<0.001
Tumor grade						
G1	11	4 (36.4)	1.00			
G2	41	33 (80.5)	3.71 (1.31–10.50)	0.014		
G3	105	86 (81.9)	3.69 (1.35–10.06)	0.011		
Involvement of nerves						
No	108	79 (73.2)	1.00			
Yes	49	44 (89.8)	1.90 (1.31–2.75)	0.001		
Involvement of blood vessels						
No	130	98 (75.4)	1.00			
Yes	27	25 (92.6)	1.78 (1.14–2.78)	0.012		
Lauren classification						
Intestinal type	56	38 (67.9)	1.00			
Mixed type	42	35 (83.3)	1.51 (0.95–2.39)	0.079		
Diffuse type	59	50 (84.8)	1.51 (0.99–2.30)	0.058		
TNM classification						
T1	23	6 (26.1)	1.00		1.00	
T2	31	23 (74.2)	4.05 (1.64–10.02)	0.002	3.92 (1.54–9.98)	0.004
T3	75	66 (88.0)	8.26 (3.55–19.21)	<0.001	5.31 (2.13–13.24)	<0.001
T4	28	28 (100)	14.72 (5.95–36.38)	<0.001	7.60 (2.87–20.12)	<0.001
TNM classification						
N0	48	25 (52.1)	1.00			
N1	21	17 (81.0)	2.01 (1.07–3.78)	0.029		
N2	34	29 (85.3)	2.70 (1.58–4.64)	<0.001		
N3	54	52 (96.3)	6.07 (3.69–9.98)	<0.001		
TNM classification						
M0	153	119 (77.8)	1.00		1.00	
M1	4	4 (100)	2.57 (0.94–7.07)	0.067	2.86 (0.94–8.67)	0.064

cance level was used for variable selection in multivariable models. Kaplan-Meier estimators were used to calculate the survivor function. $p < 0.05$ was considered to denote a statistically significant difference. All analyses were performed with Stata software, version 13.1 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

Discussion

The results of our study revealed associations between the presence of FCCs in peritoneal washings and clinical characteristics of the study subjects: clinical stage according to the 7th AJCC TNM system, lymph node ratio (positive nodes/

Table 4. Overall survival (OS) of study group.

Variable	N	Progression	Univariable model HR (95% CI)	p-value	Multivariable model HR (95% CI)	p-value
Age						
29–49	22	13 (59.1)	1.00		1.00	
50–64	56	41 (73.2)	1.32 (0.71–2.47)	0.378	1.89 (0.89–3.99)	0.096
65–69	34	29 (85.3)	1.66 (0.86–3.20)	0.131	2.64 (1.19–5.86)	0.017
70–86	45	39 (86.7)	2.13 (1.13–3.99)	0.019	3.94 (1.83–8.50)	<0.001
Sex						
Female	47	32 (68.1)	1.00			
Male	110	90 (81.8)	1.32 (0.88–1.98)	0.179		
Results of immunocytochemistry of peritoneal washing						
Negative	138	103 (74.6)	1.00		1.00	
Positive	19	19 (100)	3.48 (2.09–5.81)	<0.001	2.95 (1.50–5.79)	0.002
Completeness of resection						
Yes	152	117 (77.0)	1.00		1.00	
No	5	5 (100)	5.48 (2.20–13.67)	<0.001	3.92 (1.52–10.10)	0.005
Lymph node ratio						
<0.20	80	48 (60.0)	1.00		1.00	
≥0.20	77	74 (96.1)	4.09 (2.79–5.99)	<0.001	2.47 (1.63–3.73)	<0.001
Tumor grade						
G1	11	4 (36.4)	1.00			
G2	41	32 (78.1)	3.56 (1.26–10.09)	0.017		
G3	105	86 (81.9)	3.81 (1.40–10.42)	0.009		
Involvement of nerves						
No	108	79 (73.2)	1.00			
Yes	49	43 (87.8)	1.68 (1.16–2.44)	0.006		
Involvement of blood vessels						
No	130	97 (74.6)	1.00			
Yes	27	25 (92.6)	1.70 (1.09–2.65)	0.019		
Lauren classification						
Intestinal type	56	37 (66.1)	1.00			
Mixed type	42	35 (83.3)	1.62 (1.02–2.58)	0.041		
Diffuse type	59	50 (84.8)	1.75 (1.14–2.68)	0.010		
TNM classification						
T1	23	6 (26.1)	1.00		1.00	
T2	31	22 (71.0)	5.05 (2.02–12.60)	0.001	2.81 (1.12–7.05)	0.027
T3	75	66 (88.0)	9.01 (3.84–21.12)	<0.001	4.31 (1.76–10.56)	0.001
T4	28	28 (100)	13.41 (5.41–33.24)	<0.001	7.37 (2.81–19.37)	<0.001
TNM classification						
N0	48	25 (52.1)	1.00			
N1	21	16 (76.2)	2.43 (1.30–4.53)	0.005		
N2	34	29 (85.3)	2.88 (1.68–4.94)	<0.001		
N3	54	52 (96.3)	5.73 (3.48–9.43)	<0.001		
TNM classification						
M0	153	118 (77.1)	1.00			
M1	4	4 (100)	3.16 (1.14–8.74)	0.026		

total nodes examined), vessel and nerve involvement, histopathological grade, and completeness of resection. Moreover, we verified whether the presence of FCCs documented by an immunocytochemical analysis was a predictor of overall survival and progression-free survival. Despite the fact that we used more advanced surgical techniques and periopera-

tive chemotherapy, the outcome of gastric cancer treatment was still unsatisfactory. Cumulative recurrence rates of the patients with recurrence were 28.9% at 6 months, 53.5% at 1 year, 73.5% at 1 year and 6 months, 80% at 2 years, 89% at 3 years, 94.7% at 4 years [8]. Over half of the patients with recurrence had an initial single recurrence. Taking single

and multiple recurrences together, more recurrences (86.9%) were distant. Among the patients with distant metastasis, 38.2% had peritoneal dissemination, 26.8% hematogenous metastases, and 8.9% distant lymphatic spread [9]. Patients who had paraaortic lymph node metastasis were at high risk of developing distant lymphatic recurrence [9].

Although adjuvant and/or neoadjuvant treatment can improve survival after curative surgery in GC, it does not significantly reduce the rate of peritoneal recurrence [10, 11, 12]. Peritoneal recurrence after curative resection for gastric cancer is thought to originate from intraperitoneal free cancer cells (IFCCs), which in turn arise from two potential sources: spontaneous exfoliation of cancer cells from the primary tumor from the serosal surface and iatrogenic dissemination of cancer cells resulting from the surgical trauma [13]. Scirrhous-type stromal reaction, serosa invasion, and female gender were factors negatively related to peritoneal recurrence [9]. Recurrence rate ranged from 11.1% to 100% for patients positive for IFCC and from 0% to 51% for those negative for IFCC [14]. Wu et al. identified two factors with statistically significant associations with peritoneal dissemination following curative resection: N stage ($p < 0.001$) and the ratio of lymph node metastasis ($p < 0.001$). Both variables were included in a multivariate logistic regression to adjust for the effects of covariates. In that model, only N stage showed a significant correlation with peritoneal dissemination following a curative resection [15]. Deng et al. also demonstrated that the N3 category was an independent factor of peritoneal dissemination and distant metastases [8]. 100% of the patients with positive peritoneal lavage cytology (PLC) had an N-positive tumor, which is in agreement with our data. Even when the clinical stage according to the TNM system is known, the ratio of lymph nodes, completeness of resection, and immunocytochemistry of peritoneal washing are important predictors of progression-free time (PFS) and overall survival (OS). The detailed mechanism behind the correlation between lymph node metastasis and peritoneal dissemination from gastric cancer is still unclear. The peritoneum may therefore be associated with affluent lymphatic systems [16]. In patients with serosa involvement, the peritoneal recurrence reached 50% even if curative resection was performed. Overall, 86% of patients with positive PLC had pT3/T4 tumors. The OS of patients T3/T4 with negative PLC was longer than those with a positive PLC (27 months vs. 18 months, $p = 0.06$). In 73.9% of patients with positive PLC, the tumor grade was G3/G4 [17]. We revealed that subjects with a positive result of FCCs in the peritoneal cavity suffered from G2/G3 tumor in 100%. According to the 7th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging, positive cytology i.e., stage IV disease was the most negative preoperative prognostic factor. The median OS (mOS) in patients with positive cytology undergoing microscopically radical gastrectomy was 15 months vs. 98 months for the group of patients with negative cytology [18]. Mezhrir et al. revealed that there was no differ-

ence in the mOS between a group of patients with positive cytology undergoing resection and a group without resection. The 5-year survival of patients (Cy+/P0) treated with surgery and adjuvant systemic chemotherapy is only approximately 2%, similar to those with established peritoneal metastases [19]. Although the surgical treatment for gastric carcinoma is well established, patients with the advanced disease still have a poor prognosis. The recent REGATTA trial concluded that gastrectomy followed by chemotherapy does not improve survival in advanced gastric cancer when compared with chemotherapy alone [20]. This result implies that patients with positive cytology should avoid gastrectomy followed by adjuvant chemotherapy and instead undergo intensive multimodal treatment. Several authors reported that hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC), which eliminates free cancer cells from the peritoneal cavity, significantly reduced the incidence of peritoneal recurrence and increased the survival rate. Yonemura et al. randomized 139 patients into 3 arms: surgery alone, surgery with HIPEC, and intraperitoneal chemotherapy without hyperthermia. The 5-year survival rate was 61% in the HIPEC group, as opposed to 43% and 42% in the other two groups [21]. Yan et al. published a meta-analysis, which also demonstrated that using HIPEC as an adjuvant treatment significantly improved the survival rates of patients with stomach cancer (HR=0.60; CI 95%=0.43 to 0.83; $p=0.002$) [22]. However, an increased risk of intra-abdominal abscess and neutropenia were also demonstrated. An ongoing phase III randomized European multicenter study (GASTRICHIP) is evaluating the role of HIPEC in patients with gastric cancer who have either serosal infiltration and/or lymph nodal involvement and/or positive peritoneal cytology treated with curative gastrectomy. The primary endpoint of the study is 5-year overall survival while the secondary endpoints include recurrence-free survival, patterns of recurrence, quality of life, and morbidity [23].

In 1896 Thomas Ashworth first proposed the concept of CTCs and recognized malignant cells similar to the ones of the primary tumor in the blood vessels of an autopsied patient with metastatic cancer. At the time, CTCs analyses shed light on the biological mechanism of cancer progression and metastasis. CTCs have been identified in various types of cancer and have been recognized for their clinical value in the prediction of overall survival and progression-free survival [24]. Hairawa et al. pointed out that measurement of CTCs in gastric cancer patients could be applicable as a tool for assessing tumor stage, predicting the presence of peritoneal dissemination and patient survival. A significant correlation of two or more CTCs with peritoneal dissemination of gastric or colorectal cancer was observed ($p=0.0007$) [25]. Nevertheless, clinical applications have been challenging due to several limitations, principally the rarity of CTCs in the bloodstream and their heterogeneous characteristics, which makes detection and isolation difficult. Unfortunately, there is no validated method to detect CTCs in gastric cancer patients. The clinical utility of CTCs is still unknown.

In the light of the above considerations, it should be borne in mind that the peritoneum is a preferential site for gastric adenocarcinoma dissemination. To date, there is no established treatment for GC with the presence of FCCs in peritoneal washings. In the highly experienced centers, HIPEC procedure should be considered for this group of patients. However, in view of the reports by Al-Batran et al. presented at ASCO 2017 concerning a more active chemotherapy regimen (FLOT) than applied to date, repeating the study with a new systemic treatment regimen should be taken into account.

In conclusion, positive peritoneal washing immunocytochemistry was associated with the clinical staging of gastric cancer, OS, and PFS. It is an independent poor outcome prognostic factor.

Acknowledgments: An academic clinical study financed by the statutory funds of the Institute.

References

- [1] CHAU I, NORMAN AR, CUNNINGHAM D, WATERS JS, OATES J et al. Multivariate prognostic factor analysis in locally advanced and metastatic esophago-gastric cancer: Pooled analysis from three multicenter, randomized, controlled trials using individual patient data. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2395–2403. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.154>
- [2] SIEWERT JR, BOTTCHER K, STEIN HJ, RÖDER JD. Relevant prognostic factors in gastric cancer: Ten-year results of the German Gastric Cancer study. *Ann Surg* 1998; 228: 449–461. <https://doi.org/10.1097/0000658-199810000-00002>
- [3] FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: BLOBOCAN. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893–2917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>
- [4] GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDEN S, WINGO PA. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 2000; 50: 7–33. <https://doi.org/10.3322/canjclin.50.1.7>
- [5] FUJIIWARA Y, DOKI Y, TANIGUCHI H, SOHMA I, MIYATA H et al. Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of the patient with gastric cancer: present status and future perspectives. *Gastric Cancer* 2007; 10: 197–204. <https://doi.org/10.1007/s10120-007-0436-5>
- [6] BOKU T, NAKANE Y, MINOURA T, TAKADA H, YAMAMURA M et al. Prognostic significance of serosal invasion and free intraperitoneal cancer cells in gastric cancer. *Br J Surg* 1990; 77: 436–439. <https://doi.org/10.1002/bjs1800770425>
- [7] PIESSEN G, MESSENGER M, LETEURTRE E, JEAN-PIERRE T, MARIETTE CH. Signet ring cell histology is an independent predictor of poor prognosis in gastric adenocarcinoma regardless of tumoral clinical presentation. *Ann Surg* 2009; 250: 878–887. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181b21c7b>
- [8] DENG J, LIANG H, WANG D, SUN D, PAN Y et al. Investigation of Recurrence Patterns of Gastric Cancer Following a Curative Resection *Surg Today* 2011; 41: 210–215. <https://doi.org/10.1007/s00595-009-4251-y>
- [9] LIANG JW, ZHENG ZC, YU T, WANG X, ZHANG JJ. Is postoperative adjuvant chemoradiotherapy efficacious and safe for gastric cancer patients with D2 lymphadenectomy? A meta-analysis of the literature. *Eur J Surg Oncol* 2014; 40: 1614–1621. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2014.04.009>
- [10] XIONG B, MA L, CHENG Y, ZHANG C. Clinical effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Surg Oncol* 2014; 40: 1321–1330. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2014.01.006>
- [11] CAO J, QI F, LIU T. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer: a meta-analysis. *Scand J Gastroenterol* 2014; 49: 690–704. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.907337>
- [12] LITSUKA Y, KANESHIMA S, TANIDA O, TAKEUCHI T, KOGA S. Intraperitoneal free cancer cells and their viability in gastric cancer. *Cancer* 1979; 44: 1476–1480. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197910\)44:4<1476::aid-cnrcr2820440442>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197910)44:4<1476::aid-cnrcr2820440442>3.0.co;2-r)
- [13] LEAKE PA, CARDOSO R, SEEVARATNAM R, LOURENCO L, HEIYER L et al. A systemic review of the accuracy and utility of peritoneal cytology in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2012; 15: 27–37. <https://doi.org/10.1007/s10120-011-0071-z>
- [14] COCCOLINI F, CATENA F, GLEHEN O, YONEMURA Y, SUGARBAKER PH et al. Effect of intraperitoneal chemotherapy and peritoneal lavage in positive peritoneal cytology in gastric cancer. Systematic review and meta-analysis *Eur J Surg Oncol* 2016; 42: 1261–1267. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.03.035>
- [15] WU CHW, LO SS, SHEN KH, HSIEH MCH, CHEN JH et al. Incidence and factors associated with recurrence patterns after intended curative surgery for gastric cancer. *World J Surg* 2003; 27: 153–158. <https://doi.org/10.1007/s00268-002-6279-7>
- [16] HIGAKI E, YANAGI S, GOTOHDA N, KINOSHITA T, KUWATA T et al. Intraoperative peritoneal lavage cytology offers prognostic significance for gastric cancer patients with curative resection. *Cancer Sci* 2017; 108: 978–986. <https://doi.org/10.1111/cas.13219>
- [17] LA TORRE M, FERRI M, GIOVAGNOLI MR, SFORZA N, COSENZA G et al. Peritoneal wash cytology in gastric carcinoma. Prognostic significance and therapeutic consequences. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 982–986. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2010.06.007>
- [18] SOBIN LH, GOSPODAROWICZ MK, WITTEKIND CH (Eds.) *TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th Edition. Wiley-Blackwell, 2011. ISBN: 978-1-444-35896-4
- [19] MEZHIR JJ, SHAH MA, LINDSAY MJ, BRENNAN ME, COIT DG et al. Positive peritoneal cytology in patients with gastric cancer: natural history and outcome of 291 patients. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3173–3180. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1183-0>

- [20] FUJITANI K, YANG HK, MIZUSAWA J, KIM YW, TERASHIMA M et al. Gastrectomy plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric cancer with a single non-curable factor (REGATTA): a phase 3, randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 309–318. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00553-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00553-7)
- [21] YONEMURA Y, DE ARETXABALA X, FUJIMURA T, FUSHIDA S, KATAYAMA K et al. Intraoperative chemohyperthermic peritoneal perfusion as an adjuvant to gastric cancer: final results of a randomized controlled study. *Hepatology* 2001; 48: 1776–1782.
- [22] YAN TD, BLACK D, SUGARBAKER PH, ZHU J, YONEMURA Y et al. A systematic review and meta-analysis of the randomized controlled trials on adjuvant intraperitoneal chemotherapy for resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 2702–2713. <https://doi.org/10.1245/s10434-007-9487-4>
- [23] GLEHEN O, PASSOT G, VILLENEUVE L, VAUDOYER D, BIN-DOREL S et al. GASTRICHIP: D2 resection and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in locally advanced gastric carcinoma: a randomized and multicenter phase III study. *BMC Cancer* 2014;14: 183. <https://doi.org/10.1186/1471-24-07-14-183>
- [24] TSUJIURA M, ICHIKAWA D, KONISHI H, KOMATSU S, SHIOZAKI A. Liquid biopsy of gastric cancer patients: circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 3265–3286. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i12.3265>
- [25] HIRAIWA K, TAKEUCHI H, HASEGAWA H, SAIKAWA Y, SUDA K et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 2008;15: 3092–3100. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0122-9>

ARTYKUŁ 2

Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population – an analysis of the prospective trial

Bezpieczeństwo i skuteczność schematu FLOT w populacji polskiej – analiza badania prospektywnego

Celem pracy była ocena skuteczności i toksyczności chemioterapii okołoooperacyjnej wg FLOT w populacji polskiej, w prospektywnej kohorcie.

W okresie od stycznia 2018 r. do listopada 2019 r. w badaniu wzięło udział łącznie 71 pacjentów z histopatologicznie potwierdzonym, resekcyjnym rakiem żołądka oraz połączenia przełykowo-żołądkowego. Chorzy zostali zakwalifikowani przez zespół wielodyscyplinarny do leczenia okołoooperacyjnego. Zdarzenia niepożądane zostały ocenione zgodnie z CTCAE 5.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, wersja 5.0, 27 listopada 2017) przed każdym cyklem chemioterapii. Wszyscy pacjenci otrzymywali w profilaktyce pierwotnej czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF). Po resekcji żołądka w materiale pooperacyjnym oceniano regresję patologiczną guza według klasyfikacji Beckera.

Łącznie 93,4 % (57) pacjentów ukończyło cztery cykle chemioterapii przedoperacyjnej a 78,7 % (48) otrzymało chemioterapię pooperacyjną. U wszystkich pacjentów wystąpiła toksyczność G1/2. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi G1/2 w chemioterapii przedoperacyjnej i pooperacyjnej odpowiednio były: zmęczenie (75 % vs. 60 %), niedokrwistość (64 % vs. 62 %), nudności (60 % vs. 60 %), neuropatia obwodowa (60 % vs. 60 %) i zapalenie błony śluzowej jamy ustnej (59 % vs. 50 %). Jedynie u 16,4 % (12) pacjentów odnotowano jakiejkolwiek działania niepożądane G3/4 podczas chemioterapii przedoperacyjnej oraz u 8,3 % (8) pacjentów podczas chemioterapii pooperacyjnej. W wyniku pierwotnej profilaktyki GCS-F neutropenia G1/2 wystąpiła u 3 % vs. 6 % pacjentów a neutropenia G3/4 u 5 % vs. 2 % pacjentów odpo-

wiednio w leczeniu przed- i pooperacyjnym. Nie zaobserwowano przypadków gorączki neutropenicznej ani infekcji. Odroczenie podania dawki ≤ 7 dni wystąpiło u 26 % (16) pacjentów, a opóźnienie >7 dni u 2 % (1) pacjentów z powodu gromadzenia się płynu w obszarze portu naczyniowego. Ze względu na skutki uboczne, hospitalizacji wymagało 13 % (8) pacjentów. W badaniu Al-Batrana S. i wsp. neutropenię G3/4 stwierdzono aż u 51 % a zakażenia G3/4 aż u 18 % chorych.

Cechy patologiczne wskazujące na dobre rokowanie, takie jak histopatologiczna regresja nowotworu według klasyfikacji Beckera TRG1a/b, stwierdzono u 21 % (13) chorych a ypN0 stwierdzono u 56 % (34) chorych. Szacowany odsetek 3-letniego czasu wolnego od nawrotu choroby wyniósł 53 % (95 % CI: 40,5; 66,1), podczas gdy szacowany odsetek 3-letniego czasu całkowitego przeżycia wyniósł 60,2 % (95 % CI: 45,1; 72,3).

Schemat FLOT znacząco poprawił rokowanie u pacjentów z miejscowo zaawansowanym rakiem żołądka oraz połączenia przełykowo-żołądkowego. Wyniki naszego badania pokazują podobną skuteczność leczenia co w badaniu oryginalnym przy akceptowalnym profilu toksyczności. Wskazują także na zasadność stosowania w profilaktyce pierwotnej gorączki neutropenicznej i neutropenii G3/4 czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów. Umożliwia to zmniejszenie częstości odraczania cykli chemioterapii.

Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial

Katarzyna MARCISZ-GRZANKA^{1,*}, Mariola WINIAREK², Jakub PAŁUCKI³, Paulina WIESZCZY³, Tomasz OLESIŃSKI⁴, Mariusz JÓŹWIAK⁴, Radosław SAMSEŁ⁴, Urszula SUŁKOWSKA⁵, Agnieszka KOLASIŃSKA-ĆWIKŁA¹, Lucjan Stanisław WYRWICZ^{2,*}

¹Department of Clinical Oncology and Radiotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland; ²Department of Imaging Diagnostics, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland; ³The Medical Centre for Postgraduate Education, Warsaw, Poland; ⁴Department of Oncological Surgery and Neuroendocrine Tumor, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland; ⁵National Registry of Cancer, Warsaw, Poland

*Correspondence: katarzyna.marcisz-grzanka@pib-nio.pl; lucjan.wyrwicz@pib-nio.pl

Received July 20, 2022 / Accepted November 2, 2022

As gastric cancer is associated with poor prognosis, the preferred management of locally advanced gastric cancer (GC) and gastroesophageal junction (GEJ) cancer in European patients is perioperative chemotherapy using the FLOT regimen. Previously published data demonstrate that such treatment is associated with improved disease-free survival (DFS) as well as overall survival (OS) compared to ECF/ECX regimen. In order to collect biomaterial for the identification of serum biomarkers of an early response to neoadjuvant chemotherapy, we performed a prospective study and here, we report the safety and clinical efficacy of this prospective cohort. It was an academic, nonrandomized, prospective study, conducted at Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology in Warsaw, Poland. Between January 2018 and November 2019, we analyzed a total of 61 patients aged 30–77 (median 63 years, 52.5% males and 47.5% females) with histologically confirmed GC or GEJ cancer. The patients were qualified by a multidisciplinary team for perioperative treatment (FLOT regimen). All cases of reported adverse events were recorded and analyzed. All patients received G-CSF prophylactically. After gastrectomy, an assessment of pathological regression was performed according to the Becker classification. A total of 93.4% (57) patients completed four cycles of preoperative chemotherapy and 78.7% (48) received postoperative chemotherapy. All of them experienced grade 1/2 toxicities. The common AE G1/G2 in preoperative versus postoperative chemotherapy were: fatigue (75% vs. 60%), anemia (64% vs. 62%), nausea (60% vs. 60%), peripheral neuropathy (60% vs. 60%), and oral mucositis (59% vs. 50%), respectively. Only 24.6% (15) had G3/4 adverse events during preoperative chemotherapy and only 20.8% (10) during postoperative chemotherapy. The estimated DFS at 3 years was 53% (95% CI 40.5–66.1%) and the estimated OS at 3 years was 60.2% (95% CI 45.1–72.3%). FLOT regimen significantly improved GC and GEJ cancer patients' prognosis with acceptable side-effect profiles.

Key words: gastric cancer, safety, efficacy, chemotherapy, FLOT, DFS, OS

Gastric cancer (GC) is an important problem influencing life expectancy and has a significant impact on overall health globally. GC has been reported as the fifth most common cancer and the fourth leading cause of cancer deaths worldwide [1, 2]. According to the World Health Organization GLOBOCAN 2020 database, the total number of newly diagnosed cases of GC was estimated at 1,089,103, which was 5.6% of all newly detected malignancies, and GC-related mortality was estimated at 768,793, which was 7.7% of cancer-related deaths. The age-standardized world incidence rate was 11.1/100,000 and the age-standardized world mortality rate was 7.7/100,000. Central and Eastern Europe had the second highest rate of GC after East Asia, with an estimated age-standardized incidence rate (ASIR)

of 11.3/100,000 and an age-standardized mortality rate (ASMR) of 7.7/100,000. Medium levels of gastric cancer were observed in Western and Southern Europe (ASIR: 5.9 and 7.4/100,000, respectively).

GC most commonly occurs over the age of 60, with the incidence in men twice as frequent as in women [2]. Locally advanced disease is diagnosed in approximately 2/3 of western patients and prognosis is highly dependent on the tumor stage at presentation [3]. In addition, molecular heterogeneity is associated with clinical phenotype and plays a prognostic role. The best overall prognosis and the lowest frequency of recurrence (22%) have microsatellite-unstable and EBV-positive tumors, which is probably less frequent in the western population [4]. The worst prognosis and the

highest recurrence frequency (63%) has mesenchymal-like tumor [4]. Surgical treatment remains the best treatment modality for a potential cure. Despite developments in the surgical treatment, the efficacy of gastrectomy with extent lymph node dissection may be substantially limited by the risk of micrometastasis and peritoneal dissemination [5, 6]. Curative resection alone leads to a dismal outcome of gastric and GEJ adenocarcinoma, which points to the necessity of the application of perioperative chemotherapy. This approach in locally advanced, primary resectable GC and GEJ cancer has been established since both the MAGIC trial and the French FNCLCC/FPCD 97033 study. These studies revealed down-staging of the tumor, eliminating radiologically occult micrometastases, rapidly improving tumor-related symptoms, and significantly improving the OS (13–14%) [7, 8]. According to the report by Al-Batran et al. published in Lancet 2019, the FLOT regimen is a more effective type of chemotherapy, inducing more tumor responses than other regimens and improving the margin-free resection rate. FLOT is superior to ECF/ECX with respect to the complete pathological response (15% vs. 6%) and median OS (50 months vs. 35 months) with an acceptable toxicities profile [9].

Patients and methods

This nonrandomized, prospective study was conducted at the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, in Warsaw, Poland. We aimed at a prospective study in order to collect biomaterial for the identification of serum biomarkers of early response to neoadjuvant chemotherapy. Here we report the safety and clinical efficacy of this prospective cohort. The trial was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Local Bioethics Committee at the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology in Warsaw (approval number 51/2016/2017).

Inclusion and exclusion criteria. The main inclusion criteria were as follows: written informed consent for participation in the trial, age ≥ 18 years old, patients with histopathologically confirmed gastric or gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma of a clinical stage cT2–T4/cN-any or cT-any/cN+, no evidence of distant metastasis, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance status ≤ 2 , adequate liver, kidney, and hematologic function. The main exclusion criteria were: prior chemotherapy or radiotherapy, active or documented prior autoimmune or inflammatory disorder, history of other primary malignancies, current or prior use of immunosuppressive medication or corticosteroids exceeding 10 mg/day of prednisone or its equivalent, allergy to an iodine contrast agent, concomitant disease (coronary heart disease, arrhythmia, stroke) preventing the administration of chemotherapy according to protocol, pregnancy, and breastfeeding.

Patient treatment. The clinical stage at the baseline was evaluated by physical examination, esophago-duodenoscopy, computed tomography (CT), or magnetic resonance imaging (MRI) scan of the chest, abdomen, and pelvis. In accordance with the Polish standards of care, diagnostic laparoscopy was recommended but was not mandatory and was not performed on any patient. FLOT administration consisted of four preoperative cycles and four postoperative cycles. During each 2-week cycle of the FLOT regimen, the following were administered: docetaxel 50 mg/m² on day 1, oxaliplatin 85 mg/m² on day 1, leucovorin 200 mg/m² on day 1, and 5-FU 2,600 mg/m² as a 24 h infusion on day 1. Patients were assessed according to their medical history, physical examination, weight, ECOG, performance status, complete blood count and blood chemical tests at baseline and before the start of every cycle. Adverse events were graded according to CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) v 4.03 before each cycle. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) was used for primary prophylaxis of febrile neutropenia. All the patients received 6 mg of pegfilgrastim subcutaneously 24–72 h after the completion of each cycle of chemotherapy infusion. Chemotherapy was continued unless written informed consent was withdrawn, unacceptable toxicity occurred or progression of disease was observed. CT or MRI scan of the chest, abdomen, and pelvis was performed between 2 and 4 weeks following the completion of the last cycle of preoperative chemotherapy in order to confirm the absence of progression and metastasis. Surgery was scheduled for 4 to 6 weeks after the completion of the last cycle of chemotherapy. Subtotal or total distal gastrectomy with D2 lymphadenectomy was performed for gastric tumor. Transthoracic esophagectomy with resection of the proximal stomach and 2-field lymphadenectomy for type 1 GEJ cancers and gastrectomy with transhiatal distal esophagectomy plus D2 lymphadenectomy for type 2 and type 3 GEJ cancer were performed.

Statistical analysis. The pathological response of the primary tumor to neoadjuvant chemotherapy was evaluated according to Becker classification. This system classifies pathologic response as follows: TGR1a – no residual tumor/tumor bed, TGR1b – $<10\%$ residual tumor/tumor bed, TGR2 – 10–50% residual tumor/tumor bed, TGR3 – $>50\%$ residual tumor/tumor bed. Follow-up occurred every three months for 2 years and then every six months for 3 years, with chest, abdomen, pelvic CT or MRI scan, tumor marker (CEA, Ca 19.9), and clinical examination. Tumor response was determined according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST 1.1). Overall survival and progression-free survival were calculated from the date of randomization until the date of death and the date of documentation of disease progression or death in patients without disease progression, respectively. Kaplan-Meier method was used to estimate overall survival and progression-free survival with 95% confidence intervals (CI). All analyses and figures were prepared using Stata ver. 15.

Results

The patients were enrolled in the study between January 2018 and November 2019. A total of 71 patients signed informed consent and started treatment. Two patients, having received two cycles of chemotherapy, failed to report to the center again and there was no further contact with them. Three patients, after four cycles of preoperative chemotherapy, did not report to surgery. Five patients were excluded from the final analysis (two patients did not consent to gastrectomy and were qualified for Macdonald radio-chemotherapy, two patients did not meet inclusion criteria as they were not primary resectable and were qualified for the CROSS protocol and one patient did not consent to continue treatment due to a poor response to preoperative chemotherapy and was qualified for Macdonald by MDT). The final data analysis was conducted on 61 patients aged 30–77 (median 63 years, 52.5% males and 47.5% females). The baseline characteristics of the patients are presented in Table 1. Full pre-operative treatment of four cycles of the FLOT regimen was administered to 93.4% (57) patients. A total of 6.6% (4) patients received three cycles of the FLOT regimen (2 due to toxicity and 2 at the patients' request). Dose reduction during one or more of the pre-operative cycles of chemotherapy was required in 54% (33) patients. Dose delays ≤ 7 days occurred in 26% (16) and dose delays > 7 days occurred in 2% (1) patients due to fluid accumulation in the venous access port area. Hospitalization was required in 13% (8) patients as a result of the side effects of chemotherapy. No deaths occurred during preoperative chemotherapy. All patients experienced grade 1/2 toxicities. Adverse events associated with preoperative treatment are presented in Table 2. The most frequent of them were as follows: fatigue 75% (46), anemia 64% (39), nausea 60% (37), peripheral neuropathy 60% (37), and oral mucositis (59%). Only 24.6% (15) patients had any G3/4 adverse events. The most common of them were: nausea 11% (7), vomiting 10% (6), fatigue 6% (4), and diarrhea 5% (3). A preoperative CT scan was not performed in 11% (7) patients. The median time before the first cycle of preoperative chemotherapy and surgery was 13.1 weeks (9.1–20.9 weeks). A total of 87% (53) patients were resectable after preoperative chemotherapy. Margin-free resection (R0) was achieved in 85% (52) patients whereas R1 resection was achieved in 2% (1) patients. Surgical and pathology results of treatment are presented in Table 3. Pathological features indicating good prognosis such as histopathological tumor regression according to Becker classification TRG1a/b were found in 21 % (13) patients and ypN0 according to TNM AJCC 8th edition were found in 56% (34) patients. No response to preoperative chemotherapy was revealed in 13% (8) patients – 5% (3) patients as progression disease in CT and 8% (5) patients during surgery. Only palliative surgery was performed in the latter group. A total of 9.4% (5) patients were not qualified for postoperative chemotherapy due to postoperative complications (pancre-

Table 1. Baseline characteristics of the treatment group (n = 61).

Age (years)	
Median	63 (30–77)
<60	20 (33%)
60–69	30 (49%)
≥ 70	11 (18%)
Sex	
Male	32 (52.5%)
Female	29 (47.5%)
ECOG	
0	11 (18%)
1	50 (82%)
Location of tumor	
GEJ	14 (23%)
Stomach	47 (77%)
cT-stage	
T1	1 (2%)
T2	28 (46%)
T3	27 (44%)
T4	5 (8%)
cN-stage	
N0	30 (49%)
N1	11 (18%)
N2	11 (18%)
N3	9 (15%)
N-	30 (49%)
N+	31 (51%)
TNM according to AJCC – the 8th edition	
IIA	27 (44%)
IIB	18 (30%)
IIIA	5 (8%)
IIIB	7 (11%)
IIIC	4 (7%)
Lauren's type	
diffuse	17 (28%)
intestinal	23 (38%)
mixed	12 (19%)
Not evaluable according to Lauren	9 (15%)
Signed ring cell/poorly cohesive	22 (36%)
Grading according to WHO	
G1	1 (2%)
G2	21 (34%)
G3	28 (46%)
Not evaluable	11 (18%)

atitis, duodenal stump blowout, gastric remnant necrosis, anastomotic leak, abscess, or postoperative bleeding) and four of them required reoperation. A total of 78.7% (48) received postoperative chemotherapy. Four cycles of the postoperative FLOT regimen were administered to 59% (28) patients, 4% (2) patients received 1 cycle of FLOT, 37% (18) patients received 2 or 3 cycles of postoperative chemotherapy due to late postoperative complications, lack of recovery after surgery, refusal to continue treatment, toxicity, and concomi-

Table 2. Adverse events associated with perioperative treatment.

	Preoperative chemotherapy (n=61)		Postoperative chemotherapy (n=48)	
	any G1/G2 61 (100%)	any G3/G4 15 (24.6%)	any G1/G2 48 (100%)	any G3/G4 10 (20.8%)
	Grade 1 or 2	Grade 3 or 4	Grade 1 or 2	Grade 3 or 4
Nausea	37 (60%)	7 (11%)	29 (60%)	4 (8%)
Vomiting	10 (16%)	6 (10%)	10 (21%)	4 (8%)
Diarrhea	19 (31%)	3 (5%)	14 (29%)	3 (6%)
Constipation	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Stomatitis/mucositis	36 (59%)	1 (2%)	24 (50%)	2 (4%)
Peripheral neuropathy	37 (60%)	2 (3%)	29 (60%)	1 (2%)
Fatigue	46 (75%)	4 (6%)	29 (60%)	6 (12%)
Thrombocytopenia	11 (18%)	0 (0%)	4 (8%)	0 (0%)
Thromboembolic	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)
Anemia	39 (64%)	0 (0%)	30 (62%)	0 (0%)
Neutropenia	2 (3%)	3 (5%)	3 (6%)	1 (2%)
Leukopenia	5 (8%)	0 (0%)	3 (6%)	0 (0%)
Serum AST	22 (36%)	0 (0%)	12 (25%)	0 (0%)
Serum ALT	18 (29%)	0 (0%)	11 (23%)	1 (2%)
Serum creatinine	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Serum total bilirubin	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

tant disease. Scheme modification (FOLFOX, FLOT without docetaxel or oxaliplatin) was required in 12.5% (6) patients. Dose reduction during one or more of the postoperative cycles of chemotherapy was required in 54% (33) patients. Dose delays ≤ 7 days occurred in 26% (16) and delays > 7 days occurred in 2% (1) patients. Adverse events associated with postoperative treatment are presented in Table 2. The most frequent of them included: anemia 62% (30), nausea 60% (29), peripheral neuropathy 60% (29), and fatigue 60% (29). Only 20.8% (10) patients had any G3/4 adverse events. The most common of them were: fatigue 12% (6), nausea 8% (4), vomiting 8% (4), and diarrhea 6% (3). Only 14.6% (7) of patients required hospitalization. No deaths occurred during postoperative chemotherapy. The estimated disease-free survival at 1-, 2-, and 3-year was 73.7% (95% CI 60.2–83.2%), 57.9% (95% CI 44.1–69.5%), and 54.2% (95% CI 40.5–66.1%) (Table 4). The estimated overall survival at 1-, 2-, and 3-year was 93.3% (95% CI 83.2–97.4%), 73.3% (95% CI 60.2–82.7%), and 60.2% (95% CI 45.1–72.3%) (Table 4).

Discussion

In our trial we achieved satisfactory survival data in patients with GC or GEJ cancer, with acceptable side effects. It should be noted that there were differences in analyzed patients (ITT analysis vs. selected analysis) with regard to tumor clinical stages.

Adverse event grade 3 or 4 were observed in only 24.6% of patients in preoperative chemotherapy and in only 20.8% of patients in postoperative treatment. Due to GCS-F primary prophylaxis, neutropenia G1/G2 occurred in 3% vs. 6% and G3/G4 was observed in 5% vs. 2% in preopera-

tive and postoperative treatment, respectively. There were no cases of febrile neutropenia or infections. In the study by Al-Batran et al. neutropenia G3/4 was as high as 51% and infections G3/4 occurred in as many as 18% of patients but GCS-F prophylaxis was not mandatory [9]. In future trial, G-CSF prophylaxis could be considered a standard of care during the FLOT regimen chemotherapy. We reported an estimated 2- and 3-year disease-free survival of 57.9% (95% CI 44.1–69.5%) and 54.2% (95% CI 40.5–66.1%) as well as estimated 2- and 3-year overall survival of 73.3% (95% CI 60.2–82.7%) and 60.2% (95% CI 45.1–72.3%), respectively. We achieved a higher estimated overall survival rate than Al-Batran et al., who reported an estimated 2- and 3-year overall survival of 68.0% (95% CI 63.0–73.0%) and 57% (95% CI 52.0–62.0%), respectively. The difference might result from different baseline clinical stages of tumors of the enrolled patients. Comparing the group analyzed in our study with the FLOT4-AIO trial, we included more patients with tumor stage T2 (46% vs. 16%) and nodal negative stage N0 (49% vs. 22%), and fewer patients with tumor stage T3 (44% vs. 75%). The dominant localization in our study was stomach 77% while in Al-Batran's study it was GEJ tumor 56% [9]. We should bear in mind that the overall survival rate and disease-free survival rate are an estimation and could change with longer follow-up. A total of 85% of patients underwent margin-free surgical resection (R0), which was comparable with the results of the FLOT4-AIO trial and significantly exceeded the results of the MAGIC trial (79.3%). Complete histopathological tumor regression TGR1a according to the Becker et al. system (which was designed specifically for assessment in chemotherapy-treated patients with gastric cancer) was achieved in 11% and subtotal histopathological

SAFETY AND EFFICACY OF FLOT REGIMEN

1449

Table 3. Surgical and pathology results of treatment.

Variable	
Surgery	
Tumor curative surgery R0-margin free	52 (85%)
Tumor surgery R1	1 (2%)
Palliative surgery	5 (8%)
No surgery	3 (5%)
Histopathological tumor regression according to Becker classification	
Complete-TRG1a	7 (11%)
Subtotal-TRG1b	6 (10%)
Complete or subtotal-TRG1a/b	13 (21%)
Partial-TRG2	14 (23%)
Minimal or none-TRG3	26 (43%)
Palliative surgery-not evaluated TGR	5 (8%)
Tumor stage (ypT)	
Tx	7 (11%)
T1	11 (18%)
T2	9 (15%)
T3	23 (38%)
T4	3 (5%)
ypT no available	8 (13%)
Nodal status (ypN)	
N0	34 (56%)
N1	5 (8%)
N2	6 (10%)
N3	8 (13%)
ypN no available	8 (13%)
Maximum tumor diameter	
0.0-3.9 cm	29 (47%)
4.0-7.9 cm	13 (21%)
8.0-11.9 cm	2 (3%)
12.0-15.9 cm	1 (2%)
> 16.0 cm	0 (0%)
No available	16 (26%)
Lympho-vascular invasion-LVI	
Yes	20 (33%)
No	32 (52%)
No available	9 (15%)
Perineural invasion-PNI	
Yes	7 (11%)
No	45 (74%)
No available	9 (15%)

tumor regression TGR1b in 10% of patients. The results were lower than in the FLOT4-AIO trial, which were 16% and 21%, respectively [9]. The ECF/ECX regimen achieved only 6–11% pathological complete response. Node-negative ypNO was reported in 56% of cases in the postoperative histopathological report, which was similar to the FLOT4-AIO trial, where it was 59%. As is known from the analysis by Smyth et al., high TRG and lymph node metastases are negatively related to survival (Mandard TRG 3, 4, or 5: hazard ratio [HR], 1.94; 95% CI, 1.11–3.39; $p=0.0209$; lymph node

Table 4. Efficacy of the perioperative FLOT regimen-DFS and OS.

Disease-free survival-DFS		
Sample size (n)	57	
Progression	24	42.1%
Progression or death	26	45.6%
Observation time [year]		
Median	2.4 (0.1–3.8)	
Interquartile range	0.9–2.8	
1-year DFS 73.7%	95% CI 60.2–83.2%	
2-year DFS 57.9%	95% CI 44.1–69.5%	
3-year DFS 54.2%	95% CI 40.5–66.1%	
Overall survival - OS		
Sample size (n)	60	
Death	24	40.0%
Observation time [year]		
Median	2.6 (0.5–3.8)	
Interquartile range	1.8–3.0	
1-year OS 93.3%	95% CI 83.2–97.4%	
2-year OS 73.3%	95% CI 60.2–82.7%	
3-year OS 60.2%	95% CI 45.1–72.3%	

metastases: HR, 3.63; 95% CI, 1.88–7.0; $p=0.001$) [9, 10]. Node-positive non-responders' prognosis is relatively poor. On multivariate analysis, lymph node status but not tumor regression is independently predictive of OS (HR, 3.36; 95% CI, 1.70–6.63; $p=0.001$) [10]. Ever since both the MAGIC trial and the French FNCLCC/FFCD 97033 study, perioperative chemotherapy has been an established standard of care due to the survival benefits that it provides. Despite the fact that currently we have more effective chemotherapy, i.e., FLOT regimen, the 5-year recurrence rate remains high and the 5-year estimated overall survival (OS) is 45% (95% CI 38–51%), which is still dismal for patients with resectable GC and GEJ tumor. More than half of the patients will develop recurrence despite margin-free surgical resection. Moreover, despite the use of preoperative chemotherapy, no surgery or only palliative surgery can be performed in 10–15% of patients due to the progression of the disease [9]. Therefore, it is extremely important to research a new therapeutic approach for patients with locally advanced, resectable GC and GEJ tumors. The European Organization for Research and Treatment of Cancer is currently conducting the phase II randomized EORTC VESTIGE trial (NCT03443856) for patients with a poor response to neoadjuvant chemotherapy and an incomplete (R1) resection or metastatic lymph nodes in the resection specimen (N+). The group of patients with a high risk of recurrence will be randomized to either adjuvant chemotherapy (the same as prior to surgery) or to immunotherapy with nivolumab and low dose ipilimumab (nivolumab 3 mg/kg IV Q2W plus Ipilimumab 1 mg/kg IV Q6W for 1 year). Furthermore, studies are being conducted which combine the use of perioperative chemotherapy with immunotherapy [11]. The randomized, double-

blind, placebo-controlled, phase 3 MATTERHORN study will analyze the efficacy and safety of neoadjuvant-adjuvant durvalumab and the FLOT regimen chemotherapy in resectable gastric and gastroesophageal junction cancer [12]. The phase III KEYNOTE-585 study will assess the safety and efficacy of pembrolizumab with chemotherapy compared to placebo with chemotherapy as a neoadjuvant/adjuvant treatment for GC or GEJ adenocarcinoma [13].

It is crucial to conduct studies on the application of biomarkers in GC and GEJ cancer. There are currently no biomarkers that would allow clinical practitioners to predict early response to the induction treatment. In a situation when treatment is not effective such markers could enable clinicians to avoid exposing patients to the potential toxicity of unnecessary chemotherapy and perform earlier surgery.

In our trial, we achieved satisfactory benefits of perioperative chemotherapy FLOT regimen in patients with GEJ or GC cancer with acceptable side effects.

Acknowledgments: An academic clinical study financed by the statutory funds of the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland (grant number SN/GW24/2017).

References

- [1] CHAU I, NORMAN AR, CUNNINGHAM D, WATERS JS, OATES J et al. Multivariate prognostic factor analysis in locally advanced and metastatic esophago-gastric cancer-pooled analysis from three multicenter, randomized, controlled trials using individual patient data. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2395–2403. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.154>
- [2] GLOBOCAN 2020 database <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data/> <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf>
- [3] GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDEN S, WINGO PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7–33. <https://doi.org/10.3322/canjclin.50.1.7>
- [4] THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014; 513: 202–209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
- [5] FUJIWARA Y, DOKI Y, TANIGUCHI H, SOHMA I, TAKIGUCHI S et al. Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of the patient with gastric cancer: present status and future perspectives. *Gastric Cancer* 2007; 10: 197–204. <https://doi.org/10.1007/s10120-007-0436>
- [6] BOKU T, NAKANE Y, MINOURA T, TAKADA H, YAMAMURA M et al. Prognostic significance of serosal invasion and free intraperitoneal cancer cells in gastric cancer. *Br J Surg* 1990; 77: 436–439. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800770425>
- [7] CUNNINGHAM D, ALLUM WH, STENNING SP, THOMPSON JN, VAN DE VELDE CJ et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 11–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055531>
- [8] YCHOU M, BOIGE V, PIGNON JP, CONROY T, BOUCHE O et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1715–1721. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.0597>
- [9] AL-BATRAN SE, HOMANN N, PAULIGK C, GOETZE TO, MEILER J et al. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet* 2019; 393: 1948–1957. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32557-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32557-1)
- [10] SMYTH EC, FASSAN M, CUNNINGHAM D, ALLUM WH, OKINES AF et al. Effect of Pathologic Tumor Response and Nodal Status on Survival in the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy Trial. *J Clin Oncol* 2016; 34: 2721–2727. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.7692>
- [11] SMYTH E, KNODLER M, GIRAUT A, MAUER M, NILSSON M et al. VESTIGE: Adjuvant Immunotherapy in Patients With Resected Esophageal, Gastroesophageal Junction and Gastric Cancer Following Preoperative Chemotherapy With High Risk for Recurrence (N+ and/or R1): An Open Label Randomized Controlled Phase-2-Study. *Front Oncol* 2020; 9: 1320. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01320>
- [12] JANJIGIAN Y, VAN CUTSEM E, MURO K, WAINBERG ZA, AL-BATRAN SE et al. MATTERHORN: Efficacy and safety of neoadjuvant-adjuvant durvalumab and FLOT chemotherapy in resectable gastric and gastroesophageal junction cancer-A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *J Clin Oncol* 2021; 39: TPS4151–TPS4151. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.TPS4151
- [13] BANG YJ, VAN CUTSEM E, FUCHS CS, OHTSU A, TABERNERO J et al. KEYNOTE-585: Phase III study of perioperative chemotherapy with or without pembrolizumab for gastric cancer. *Future Oncol* 2019; 15: 943–952. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0581>

ARTYKUŁ 3

Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients

Interleukina-6 jako czynnik predykcyjny odpowiedzi patologicznej na leczenie systemowe według schematu FLOT u pacjentów z miejscowo zaawansowanym rakiem połączenia przełykowo-żołądkowego lub żołądka

Praca miała charakter eksploracyjny. Celem tego prospektywnego, nierandomizowanego, jednoośrodkowego badania była ocena przydatności surowiczych markerów nowotworowych, wykładników nasilenia stanu zapalnego oraz krążących komórek nowotworowych jako markerów wczesnej odpowiedzi na neoadjuwantowe leczenie systemowe według schematu FLOT.

Głównymi kryteriami kwalifikacyjnymi były: pisemna świadoma zgoda na udział w badaniu, potwierdzenie histopatologicznie gruczolakoraka żołądka lub połączenia przełykowo-żołądkowego w stadium klinicznym cT2-T4 oraz jakiegokolwiek cN lub jakiegokolwiek cT oraz cN+, stan sprawności ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) ≤ 2 , prawidłowa czynność wątroby, nerek i szpiku kostnego, wiek ≥ 18 lat. Głównymi kryteriami wykluczenia były: obecność odległych przerzutów, inne pierwotne nowotwory złośliwe w wywiadzie, wcześniejsza chemioterapia lub radioterapia, aktywna bądź udokumentowana wcześniejsza choroba autoimmunologiczna lub zapalna, obecnie lub w wywiadzie stosowanie leków immunosupresyjnych lub kortykosteroidów w dawce przekraczającej 10 mg/dobę prednizonu lub jego równoważnika, alergia na jodowy środek kontrastowy, choroby współistniejące (choroba wieńcowa, zaburzenia rytmu, udar mózgu) uniemożliwiające podanie chemioterapii zgodnie z protokołem, ciąża, karmienie piersią. W sumie 71 pacjentów i 15 zdrowych ochotników podpisało świadomą zgodę. Na początku badania i przed każdym cyklem oceniono morfologię

krwi z rozmazem, badania biochemiczne, antygen rakowo-embrionalny (CEA), antygen raka 125 (CA125), antygen raka 19.9 (CA19.9), d-dimer, fibrynogen (F), stosunek liczby limfocytów do monocytów LMR (*lymphocyte to monocyte ratio*), neutrofili do limfocytów NLR (*neutrophil to lymphocyte ratio*), płytek krwi do limfocytów PLR (*platelet to lymphocyte ratio*). Krążące komórki nowotworowe (CTCs) oraz interleukinę-1 β (IL-1 β), interleukinę-6 (IL-6), interleukinę-8 (IL-8), interleukinę-10 (IL-10) mierzono w grupie pilotażowej składającej się z 40 pacjentów na początku badania oraz przed cyklem drugim (C2) i cyklem trzecim (C3) chemioterapii.

Spośród wszystkich mierzonych parametrów statystycznie istotne było jedynie stężenie IL-6 w surowicy krwi. Poziom IL-6 przed C2 chemioterapii był istotnie niższy w grupie całkowitej odpowiedzi patologicznej (pCR) w porównaniu do grupy bez pCR (3,71 pg/ml vs. 7,63 pg/ml, $p=0,004$). U wszystkich pacjentów ze stężeniem IL-6 poniżej 5,0 pg/ml w C2 w pooperacyjnym materiale histopatologicznym wykryto regresję guza TRG1a/1b według klasyfikacji Beckera i ypN0. Poziom IL-6 przed C1 chemioterapii był istotnie wyższy w ypN+ vs. ypN0 (7,69 pg/ml vs. 2,89 pg/ml, $p=0,022$). Optymalny próg rozpoznania ypN0 w C1 wyniósł 5,0 pg/ml (AUC=0,751, 95 % CI: 0,568–0,934, $p=0,017$) oraz dla pCR w C2 wyniósł 5,0 pg/mL (AUC=0,826, 95 % CI: 0,698–0,954, $p=0,001$).

Badanie wykazało, że podwyższony poziom IL-6 przed leczeniem i cyklem drugim może być predyktorem patologicznej odpowiedzi na chemioterapię przedoperacyjną.

Coraz więcej danych sugeruje, że IL-6 odgrywa kluczową rolę w modulacji funkcji i aktywności komórek odpornościowych związanych z nowotworem [27]. IL-6 jest białkiem wydzielniczym specyficznym dla fibroblastów rekrutowanych przez nowotwór (CAFs – *cancer associated fibroblasts*). Przyczynia się do dynamicznej interakcji między komórkami nowotworowymi a mikrośrodowiskiem guza, która jest niezbędna do wzrostu nowotworu, inwazji i powstawania przerzutów. Przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT – *epithelial mesenchymal transition*) komórek raka żołądka jest indukowane przez IL-6 wydzielaną przez CAFs. IL-6 wydzielana przez CAFs powoduje

hiperaktywację szlaku IL-6/JAK/STAT3 (JAK – kinazy janusowe [*Janus-activated kinase*], STAT - białka będące przetwornikami sygnału i aktywatorami transkrypcji [*signal transducer and activator of transcription proteins*]), która powiązana jest ze złym rokowaniem klinicznym [28-30]. Interakcja CAFs z komórkami nowotworowymi może indukować bardziej agresywny fenotyp komórek nowotworowych i przyczyniać się do indukowania oporności linii komórkowych raka żołądka na 5-fluorouracyl poprzez hamowanie apoptozy [31]. Jest to niezwykle ważne z punktu widzenia klinicznego, ponieważ 5-fluorouracyl jest głównym cytostatykiem, szeroko stosowanym zarówno w leczeniu okołoooperacyjnym, jak i paliatywnym raka żołądka oraz połączenia przełykowo-żołądkowego[6-8].

Jeżeli wyniki badania zostaną potwierdzone na większej grupie pacjentów, oznaczenie poziomu IL-6 w surowicy przed rozpoczęciem leczenia i przed podaniem cyklu drugiego chemioterapii neoadjuwantowej umożliwi szybką identyfikację chorych ypN+ i non-pCR o złym rokowaniu. Po uwzględnieniu wpływu IL-6 na indukowanie oporności na chemioterapię, może stworzyć to podstawę do badania skuteczności łączenia chemioterapii okołoooperacyjnej z hamowaniem receptora interleukiny-6 (IL-6R). Obecnie trwa już badanie kliniczne EMPOWER (NCT04333706) dotyczące połączenia inhibitora IL-6R (sarilumabu) z kapecytabiną u chorych na potrójnie ujemnego raka piersi w I-III stopniu zaawansowania z chorobą resztkową wysokiego ryzyka.



Article

Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients

Katarzyna Marcisz-Grzanka ^{1,*}, Beata Kotowicz ², Aleksandra Nowak ³, Mariola Winiarek ¹,
Małgorzata Fuksiewicz ², Maria Kowalska ², Andrzej Tysarowski ³, Tomasz Olesinski ⁴, Jakub Palucki ⁵,
Urszula Sulkowska ⁶, Agnieszka Kolasinska-Cwikla ¹ and Lucjan Stanisław Wyrwicz ^{1,*}

¹ Department of Clinical Oncology and Radiotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology (MSCNRIO), Wawelska 15, 02-034 Warsaw, Poland; mariola.winiarek@nio.gov.pl (M.W.); agnieszka.kolasinska-cwikla@nio.gov.pl (A.K.-C.)

² Cancer Biomarker and Cytokines Laboratory Unit, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology (MSCNRIO), W.K. Roentgena 5, 02-781 Warsaw, Poland; beata.kotowicz@nio.gov.pl (B.K.); malgorzata.fuksiewicz@nio.gov.pl (M.F.); maria.kowalska@nio.gov.pl (M.K.)

³ Department of Molecular and Translational Oncology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology (MSCNRIO), W.K. Roentgena 5, 02-781 Warsaw, Poland; aleksandra.nowak2@nio.gov.pl (A.N.); andrzej.tysarowski@nio.gov.pl (A.T.)

⁴ Department of Oncological Surgery and Neuroendocrine Tumors, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology (MSCNRIO), W.K. Roentgena 5, 02-781 Warsaw, Poland; tomasz.olesinski@nio.gov.pl

⁵ Department of Radiology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology (MSCNRIO), W.K. Roentgena 5, 02-781 Warsaw, Poland; jakub.palucki@nio.gov.pl

⁶ National Cancer Registry, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology (MSCNRIO), Wawelska 15B, 02-034 Warsaw, Poland; urszula.sulkowska@nio.gov.pl

* Correspondence: katarzyna.marcisz-grzanka@nio.gov.pl (K.M.-G.); lucjan.wyrwicz@nio.gov.pl (L.S.W.); Tel.: +48-22-570-92-93 (K.M.-G.); Fax: +48-22-570-92-23 (K.M.-G.)



Citation: Marcisz-Grzanka, K.;

Kotowicz, B.; Nowak, A.; Winiarek, M.; Fuksiewicz, M.; Kowalska, M.; Tysarowski, A.; Olesinski, T.; Palucki, J.; Sulkowska, U.; et al. Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients. *Cancers* 2024, 16, 757. <https://doi.org/10.3390/cancers16040757>

Academic Editor: Jesús García-Foncillas

Received: 30 December 2023

Revised: 6 February 2024

Accepted: 6 February 2024

Published: 12 February 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The response rate after neoadjuvant chemotherapy (NAC) remains limited. Moreover, there are currently no biomarkers enabling an individual prediction of therapeutic efficacy. The aim of this study was the identification of serum biomarkers of early response to NAC. The elevated level of IL-6 prior to treatment and cycle 2 of the FLOT regimen might be a predictor of pathological response to NAC in locally advanced gastric cancer (GC) or gastroesophageal junction (GEJ) cancer. The results were obtained from a small group of patients and currently cannot be used in everyday clinical practice. Confirmation of the results in a larger group of patients seems to be essential from a clinical point of view, bearing in mind that IL-6 plays a significant role in gastric cancer biology, particularly in metastasis formation and in the mechanism of chemotherapeutic resistance.

Abstract: Background: Perioperative treatment is a gold standard in locally advanced gastric cancer or GEJ cancer in the Western population. Unfortunately, the response rate after neoadjuvant chemotherapy (NAC) remains limited. Moreover, there are currently no biomarkers enabling an individual prediction of therapeutic efficacy. The aim of this study was the identification of serum biomarkers of early response to NAC. Methods: We conducted this prospective study in the MSCNRIO in Warsaw, Poland. A total of 71 patients and 15 healthy volunteers gave informed consent. Complete blood count, carcinoembryonic antigen (CEA), carcinoma antigen 125 (CA125), carcinoma antigen 19.9 (CA19.9), and fibrinogen (F) were measured at baseline and before every cycle. Circulating tumour cells (CTCs) and interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and interleukin-10 (IL-10) were measured in a pilot group of 40 patients at baseline and before cycle two (C2) and cycle three (C3). Results: Of all the measured parameters, only the IL-6 serum level was statistically significant. The IL-6 level before C2 of chemotherapy was significantly decreased in the complete pathological response (pCR) vs. the non-pCR group (3.71 pg/mL vs. 7.63 pg/mL, $p = 0.004$). In all patients with an IL-6 level below 5.0 pg/mL in C2, tumour regression TRG1a/1b according to the Becker classification and ypN0 were detected in postoperative histopathological specimens. The IL-6 level before C1 of chemotherapy was significantly elevated in ypN+ vs. ypN0 (7.69 pg/mL vs.

2.89 pg/mL, $p = 0.022$). Conclusions: The trial showed that an elevated level of IL-6 prior to treatment and C2 might be a predictor of pathological response to NAC.

Keywords: gastric cancer; gastroesophageal junction cancer; IL-6; FLOT regimen; predictive biomarker

1. Introduction

Gastric cancer is a major problem influencing life expectancy due to its aggressive nature [1]. It is associated with a poor prognosis dependent on the tumour stage at presentation [2]. According to GLOBOCAN 2020, gastric cancer is the fifth most common cancer and the fourth leading cause of mortality worldwide [3]. The outcome of GC and GEJ adenocarcinoma following curative resection alone is predominantly dismal, which points to the necessity of the application of perioperative chemotherapy [4,5]. This approach in Western patients with locally advanced primary resectable GC and GEJ cancer has been a gold standard since both the MAGIC trial and the French FNCLCC/FFCD 97033 study [4,5]. The most effective type of chemotherapy, as reported by Al-Batran S. et al. in The Lancet in 2019, is the FLOT regimen, which induces more tumour responses than other regimens and improves the margin-free resection rate. FLOT is superior to ECF/ECX with respect to the complete pathological response (15% vs. 6%) and median overall survival (50 months vs. 35 months) [6]. As approximately 10–15% of patients fail to respond to this treatment, it is vital to conduct studies on the application of biomarkers in GC and GEJ cancer [6]. There are currently no biomarkers enabling the prediction of therapeutic efficacy and real-time tumour dynamics or the identification of patients at an increased risk of a poor pathological response. In non-responding patients to neoadjuvant chemotherapy, such markers could allow clinicians to apply a more individualised approach, e.g., avoiding exposition to the potential toxicity of unnecessary chemotherapy, thus improving the quality of life and making it possible to perform earlier surgery as well as reduce the cost of treatment.

Scientific research over the last decade has explained the fundamental molecular mechanisms and provided conclusive evidence that inflammation is now established as a hallmark of cancer. The tumour microenvironment, which includes inflammatory cells or inflammatory mediators such as cytokines, chemokines, growth factors, prostaglandins, and stromal activation, plays a decisive role at various stages of tumour development, including initiation, malignant transformation, promotion, and invasion, as well as metastasis formation [7–9]. Pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) are responsible for metastasis promotion and cachexia, while anti-inflammatory immunosuppressive cytokines such as IL-10 are reported to be a marker of a higher stage of the disease [10,11]. Interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) are important pro-angiogenic factors in gastric cancer through the induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) [12,13]. Both IL-1 and IL-6 are involved in the growth of neoplastic cells in gastric cancer and the metastasis formation [14,15]. In addition to pro-inflammatory cytokines, activation of the coagulation and angiogenesis systems is believed to be associated with the development of cancer [16]. Activated platelets are the source of VEGF, which is responsible for the promotion of neoangiogenesis. Lymphocytes participate in both humoral and cellular anti-tumour immune response [17].

In numerous studies on patients with various types of cancer, the lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR), neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) were assessed as prognostic markers for overall survival (OS), disease-free survival (DFS), and progression-free survival (PFS) [17–19]. The study by Lian L. et al. conducted on patients with primary operable gastric cancer showed that preoperative low levels of PLR and NLR were correlated with better clinicopathological features, including a lower depth of tumour invasion, fewer lymph node metastases, and an early-stage cancer based on the TNM classification according to the AJCC [20].

Additionally, low levels of leukocytes and lymphocytes prior to systemic adjuvant therapy were a predictor of poor outcome in response to this treatment [21]. Patients with primary metastatic gastric cancer undergoing palliative systemic treatment who had a low NLR level before treatment had a statistically significantly better disease control rate (DCR), longer progression-free survival (PFS), and longer overall survival compared to patients with an initially high NLR level [21,22]. Arigami T. et al. developed a new scoring system (F-NLR) based on fibrinogen concentration (F) and the NLR ratio as a predictive and prognostic factor to chemotherapy or chemoradiotherapy in patients with advanced gastric cancer. Higher F-NLR values were significantly more frequent in the subgroup of patients with disease progression during treatment [23].

In 1869, during the autopsy of a patient with metastatic cancer, Thomas Ashworth first observed that cells similar to those of the primary tumour were present in peripheral blood. These cells are circulating tumour cells (CTCs): rare cancer cells released from the tumour into the bloodstream, which are thought to play a key role in cancer metastasis. Many studies have shown the identification of CTCs in patients with various types of cancer and their usefulness as a marker of response to systemic treatment [24].

In view of the above considerations, we selected the parameters as potential predictive factors of neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced GC and GEJ cancer.

2. Materials and Methods

We conducted this prospective study in the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology in Warsaw, Poland, in order to identify serum biomarkers of early response to NAC from collected biomaterial. The trial was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Local Bioethics Committee at the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology (MSCNRIO) in Warsaw (approval number 51/2016/2017). A total of 71 patients and 15 healthy volunteers gave their informed consent.

2.1. Inclusion and Exclusion Criteria

The main eligibility criteria included the following: written informed consent for participation in the trial, patients with histopathologically confirmed GC or GEJ adenocarcinoma of a clinical stage cT2-T4/cN-any or cT-any/cN+, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance status < 2, adequate liver, kidney, and hematologic function, and age ≥ 18 years old. The main exclusion criteria were the following: evidence of distant metastasis, history of other primary malignancies, prior chemotherapy or radiotherapy, active or documented prior autoimmune or inflammatory disorder, current or prior use of immunosuppressive medication or corticosteroids exceeding 10 mg/day of prednisone or its equivalent, allergy to iodine contrast agent, concomitant disease (coronary heart disease, arrhythmia, stroke) preventing administration of chemotherapy according to protocol, pregnancy, and breastfeeding.

2.2. Patient Treatment and Procedure

Clinical stage at baseline was evaluated with oesophagogastrroduodenoscopy (OGD), computed tomography (CT), or magnetic resonance imaging (MRI) scan of the chest, abdomen, and pelvis and physical examination. Diagnostic laparoscopy was not performed in any patient as the Polish standards of care state that it is recommended but not mandatory. We administered treatment according to the original protocol without modification. FLOT administration consisted of four preoperative and four postoperative cycles (during each 2-week cycle, we administered docetaxel 50 mg/m² on day 1, oxaliplatin 85 mg/m² on day 1, leucovorin 200 mg/m² on day 1, and 5-FU 2600 mg/m² as 24 h infusion on day 1). Patients were assessed according to their medical history, physical examination, weight, ECOG performance status, complete blood count, CEA, CA125, CA19.9, and fibrinogen at baseline and before the start of every cycle. CTCs and IL-1 β , IL-6, IL-8, and IL-10 were measured in a pilot group of 40 patients at baseline and before the start of C2 and C3. We graded adverse

events according to CTCAE 5.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events v5.0, 27 November 2017) before each cycle, and we used granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for primary prophylaxis of febrile neutropenia. Chemotherapy was continued according to protocol unless written informed consent was withdrawn, unacceptable toxicity occurred, or progression of the disease was observed. In order to confirm the absence of progression of disease or occurrence of metastases, a CT or MRI scan of the chest, abdomen, and pelvis was performed between 2 and 4 weeks following the completion of the last cycle of preoperative chemotherapy. Tumour response was determined according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumours 1.1 (RECIST v1.1). Surgery was scheduled for 4–6 weeks following the completion of the last cycle of chemotherapy. Pathological tumour regression (TRG) of the primary tumour to NAC was evaluated according to the Becker classification, which classifies pathological response as follows: TGR1a, no residual tumour/tumour bed; TGR1b, <10% residual tumour/tumour bed; TGR2, 10–50% residual tumour/tumour bed; and TGR3, >50% residual tumour/tumour bed.

2.3. Biochemical Analysis

Venous blood collection VACUETTE® was performed using the VACUETTE® system (Greiner, Kremsmünster, Austria). The Sysmex XN-550 haematology analyser (Sysmex, Kobe, Japan) was used for the analysis of differential white blood cell count following the manufacturer's protocol. The lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) was calculated by dividing an absolute count of lymphocytes ($10^9/L$) by an absolute count of monocytes ($10^9/L$). The platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) was calculated by dividing an absolute count of platelets ($10^9/L$) by an absolute count of lymphocytes ($10^9/L$), and derived NLR (dNLR) was calculated by dividing an absolute count of neutrophils ($10^9/L$) by an absolute leukocyte number ($10^9/L$) minus absolute neutrophil number ($10^9/L$) (neutrophil absolute number/(leucocyte absolute number—neutrophil absolute number)). The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) was calculated by dividing an absolute count of neutrophils ($10^9/L$) by an absolute count of lymphocytes ($10^9/L$). Plasma fibrinogen (F) was determined from blood plasma collected on sodium edetate (EDTA) using the Clauss method with Fibrinogen-C XL reagent in the ACL TOP 500 (Werfen, Barcelona, Spain) coagulation analyser according to the manufacturer's recommendations. F-NLR score was based on plasma fibrinogen (F) and NLR. Patients with hyperfibrinogenaemia (>400 mg/dL) and high NLR (>3.0) received 2 points. Patients with only one of the above-mentioned abnormalities in biochemical parameters received 1 point, while those with a fibrinogen concentration <400 mg/dL and low NLR (<3.0) received 0 points. We established cut-off values for NLR and plasma fibrinogen concentration based on previously published data [22,23,25,26]. The tumour marker levels (CEA, CA125, CA19.9) were determined with electrochemiluminescence with Roche kits in the Cobas E601 system (Roche, Basel, Switzerland). The cut-off points for the markers were set according to the manufacturer's recommendations. The serum concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-8, and IL-10 were determined by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's recommendations.

2.4. Molecular Detection of Circulating Tumour Cells (CTCs)

Molecular detection of CTCs was performed by assessing the mRNA expression of tumour-associated markers (CEA, CK19, *survivin*). The VACUETTE® system was used for venous blood collection. A 2.5 mL sample of peripheral venous blood from all of the patients and healthy volunteers was collected into PAXgene Blood RNA tubes (Qiagen, Hilden, Germany). Micro-centrifuge was used for purification and isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The RNA isolation was performed using the PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and the QIAcube automatic nucleic acid isolation apparatus (Qiagen, Hilden, Germany). The amount of RNA was measured using a Quantus Fluorometer (Promega, Madison, WI, USA). The measurement was performed by using a fluorescent RNA-specific dye—QuantiFluor

RNA System (Promega, Madison, WI, USA). The amount of RNA was expressed in ng/ μ L. A spectrophotometric test was performed in order to check the purity of the isolated RNA, with absorbance measured at 260 and 280 nm. The NanoDrop ND2000 device was used for the measurement (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then, on the basis of the ratio of A260 and A280, the instrument determined the degree of RNA purity. RNA was considered sufficiently purified material for further analysis if this ratio was approximately 2. Reverse transcription reactions were performed with the SuperScript IV VILO kit Master Mix with ezDNase enzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Measurement of the expression of reference genes (*TBP*, *HPRT*, *SDHA*, *YWHAZ*, *HPRT*, *GAPDH*, *ZNF410*) and marker genes (*CK19*, *CEA*, *survivin*) was performed using the real-time polymerase chain reaction method (real-time PCR, qPCR); it is presented in Appendix A (Table A1). Quantitative PCR reaction was performed using the ABI PRISM 7500 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System instrument (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The reaction mixture consisted of TaqMan[®] Gene Expression Master Mix 38 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), TaqMan[®] probes specific for selected genes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and cDNA matrix. Based on the qualitative assessment, three reference genes were selected and served as internal controls for further studies. The three selected genes were as follows: *TBP*, *HPRT*, and *ZNF410*. These genes were characterised by the highest stability of all the tested genes and showed constant expression in both patients and healthy volunteers. Where possible, quantitative analysis of the expression of *CK19* and *CEA* marker genes and survivin was performed. The expression value was calculated according to the comparative method. The value of the relative expression levels allowed us to estimate the changes in the expression of selected marker genes in patients with gastric cancer as compared to healthy volunteers.

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in R software (version 4.1.2). Age was described with median and range; the level of IL-6 was described with mean and standard deviation or median and interquartile range, depending on distribution normality. Categorical variables were presented as the absolute frequency and proportion of the group. Distribution normality was verified with the Shapiro–Wilk test, accompanied by skewness and kurtosis. Variance homogeneity was assessed with Levene’s test. Comparisons between prognosis groups were performed with *t*-Student test, Mann–Whitney U test, one-way ANOVA analysis, and Kruskal–Wallis test, as appropriate. Post hoc multiple comparison was conducted with the Dunn test with Bonferroni adjustment. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was conducted in order to identify parameters with high potential to predict prognosis group. Optimal thresholds were calculated with Youden index.

3. Results

Between January 2018 and November 2019, a total of 71 patients gave their informed consent and started treatment. However, the final data analysis was conducted on 61 patients at the age of 30–77 (median 63 years; 52.5% male and 47.5% female). Two patients did not meet the inclusion criteria as they were not primary resectable, and we lost eight patients during preoperative treatment. The full preoperative treatment of four cycles of the FLOT regimen was administered to 93.4% (57) of the patients. CTCs and ILs were measured in a pilot group of 40 patients. The baseline characteristics of the patients, body mass index (BMI), and surgical and pathology results of the treatment are presented in Appendix A (Tables A2–A4).

We did not find any statistical significance of CEA, CA19.9, CA125, IL-1 β , IL-8, IL-10, LMR, NLR, dNLR, PLR, or CTCs in the complete pathologic response (pCR) vs. non-pCR group and ypN0 vs. ypN+ group, so we decided not to perform statistical analysis for the TRG–Becker subgroup. The data are presented in Appendix A (Tables A5 and A6).

As NLR was not statistically significant in this subgroup, we did not take F-NLR under consideration in further analysis. Due to the fact that only eight patients had positive

CTC-CEA, which was below ten cases, CTCs measured by the expression level for CEA were not taken into account in the statistical calculations.

Only the IL-6 serum level was found to be a potential biomarker of the pathological response to NAC. The IL-6 serum level before C2 of chemotherapy was significantly elevated in the non-pCR vs. the complete pathological response (pCR) group (7.63 pg/mL vs. 3.71 pg/mL, $p = 0.004$), see Figure 1.

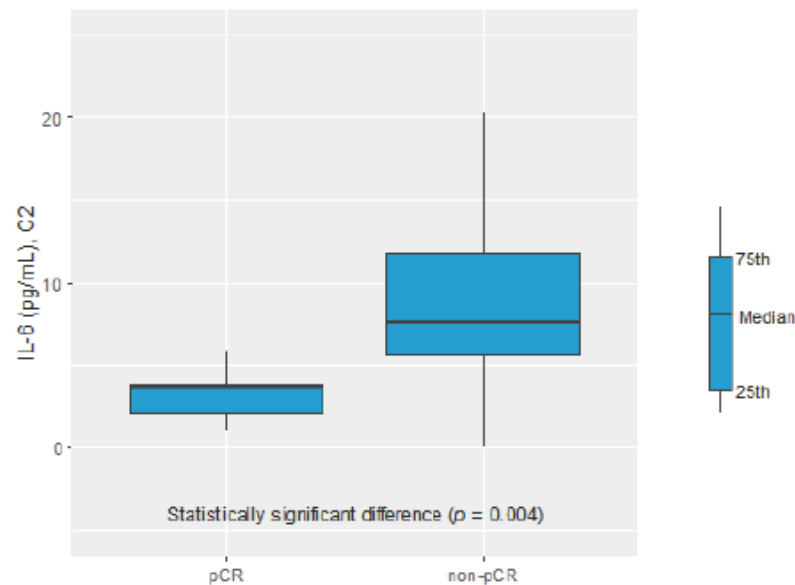


Figure 1. IL-6 in C2 in prognosis pCR and non-pCR group.

The receiver operating characteristic (ROC) curve showed the predictive power of IL-6. The optimal threshold for diagnosing pCR was 5.0 pg/mL (AUC = 0.826, 95% CI: 0.698–0.954, $p = 0.001$), see Table 1 and Figure 2.

Table 1. Optimal thresholds for diagnosing pCR vs. non-pCR group ¹.

	Optimal Threshold	AUC (95% CI)	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV	<i>p</i>
Measurement C2								
IL-6 [pg/mL]	5.00	0.826 (0.698–0.954)	0.89	0.77	0.79	0.53	0.96	0.001

¹ pCR group: $n = 12$; non-pCR group: $n = 28$.

In all patients with an IL-6 serum level below 5.0 pg/mL in C2, tumour regression TRG1a/1b according to the Becker classification was detected in postoperative histopathological specimens. Due to the small sample size, the pCR group was defined as TGR-1a/1b and ypN0. A similar relationship was found in the ypN0 vs. the ypN+ group. The IL-6 serum level before C1 of chemotherapy was significantly elevated in ypN+ vs. ypN0 (7.69 pg/mL vs. 2.89 pg/mL, $p = 0.022$). The ROC curve showed the predictive power of IL-6. The optimal threshold for diagnosing ypN0 was 5.0 pg/mL (AUC = 0.751, 95% CI: 0.568–0.934, $p = 0.017$), see Table 2 and Figure 3.

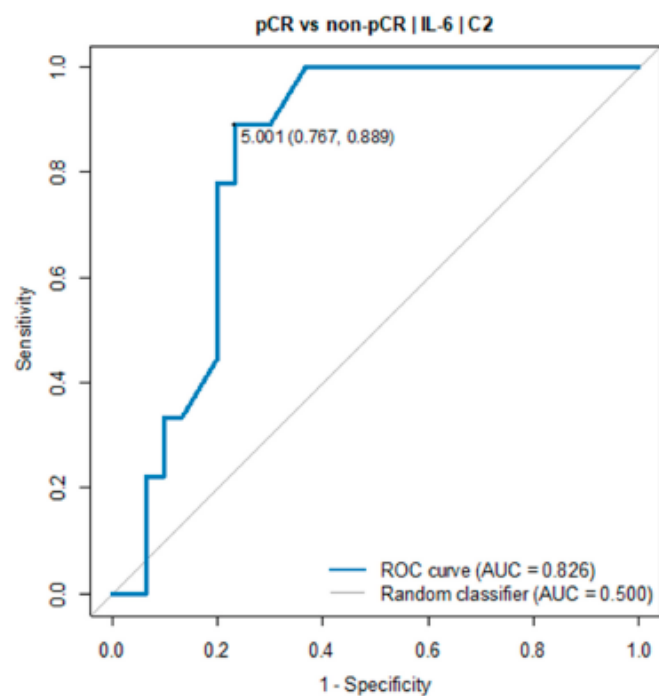


Figure 2. ROC curve for IL-6 (C2) as a diagnostic test between pCR and non-pCR group.

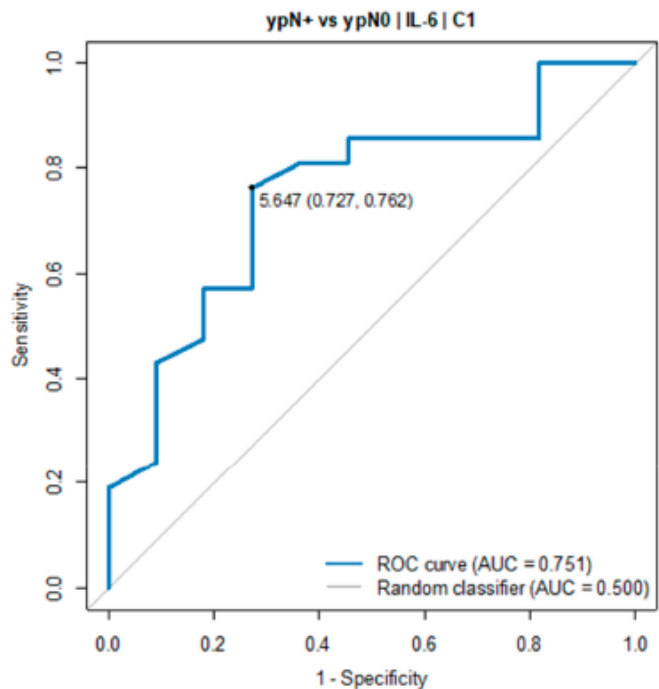


Figure 3. ROC curve for IL-6 (C1) as a diagnostic test between ypN+ and ypN0 group.

Table 2. Optimal thresholds for diagnosing ypN+ vs. ypN0 group ².

	Optimal Threshold	AUC (95% CI)	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV	<i>p</i>
Measurement C2								
IL-6 [pg/mL]	5.65	0.751 (0.568–0.934)	0.73	0.76	0.75	0.62	0.84	0.017
Measurement: delta C3 vs. C1								
IL-6 [pg/mL]	1.09	0.764 (0.569–0.959)	0.82	0.76	0.78	0.64	0.89	0.018

² ypN+ group: *n* = 12; ypN0 group: *n* = 28.

A significant difference in the IL-6 serum level before C2 of chemotherapy was recognised comparing the TGR1, TGR2, and TGR3 groups (3.76 pg/mL vs. 7.07 pg/mL vs. 9.43 pg/mL, respectively, *p* = 0.016), see Figure 4.

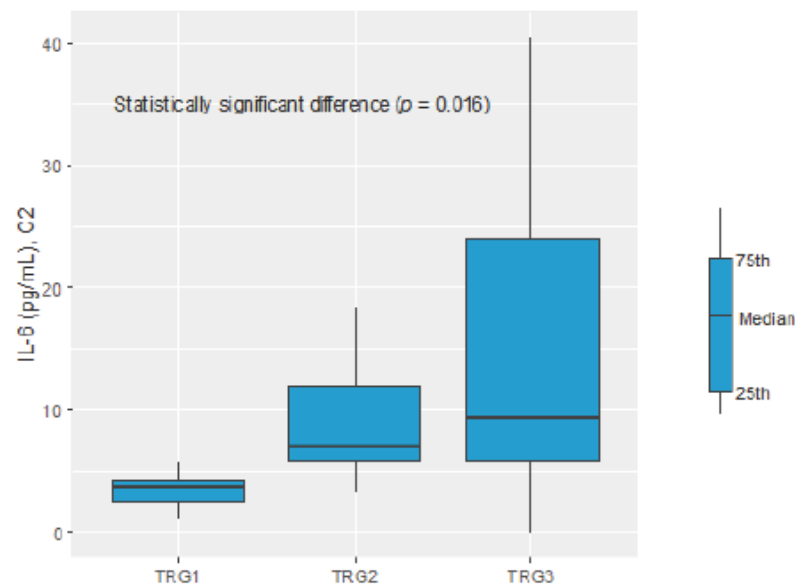


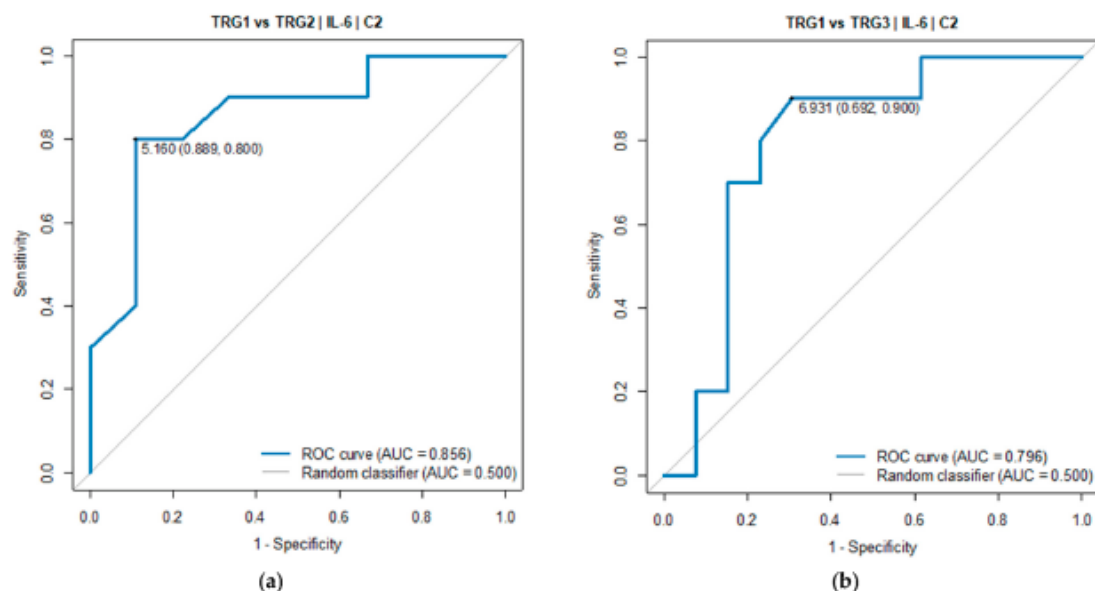
Figure 4. IL-6 in C2 within prognosis groups: TGR1, TGR2, and TGR3.

Pairwise comparisons indicated TGR1 and TGR3 as the groups with a significant difference in the IL-6 serum level. The ROC analysis was performed to verify the predictive power of IL-6 for diagnosing TGR groups against each of the two other groups. Good diagnostic quality was identified when IL-6 was used to differentiate TGR1 from TGR2 and TGR1 from TGR3. The optimal threshold for diagnosing TGR1 vs. TGR2 was 5.16 pg/mL (AUC = 0.856, 95% CI: 0.674–1.000, *p* = 0.005). The optimal threshold for diagnosing TGR1 vs. TGR3 was 6.93 pg/mL (AUC = 0.796, 95% CI: 0.596–0.997, *p* = 0.004), see Table 3 and Figure 5.

The ROC analysis did not show a significant outcome of using IL-6 as a prognosis parameter for the TGR2 vs. TGR3 groups (*p* > 0.05), which means that IL-6 had good ability to predict that patients belonged to the TGR1 group, while its ability to distinguish the TGR2 group from the TGR3 group was not proved.

Table 3. Parameters diagnosing groups: TRG1 vs. TRG2 and TRG1 vs. TRG3³.

	Optimal Threshold	AUC (95% CI)	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV	<i>p</i>
Measurement: TRG1 vs. TRG2								
IL-6 [pg/mL]	5.16	0.856 (0.674–1.000)	0.80	0.89	0.84	0.89	0.80	0.005
Measurement: TRG1 vs. TRG3								
IL-6 [pg/mL]	6.93	0.796 (0.596–0.997)	0.90	0.69	0.78	0.69	0.90	0.004

³ TRG1 group: *n* = 13; TRG2 group: *n* = 12; TRG3 group: *n* = 15.**Figure 5.** ROC curve for IL-6 (C2) as a diagnostic test between (a) TRG1 and TRG2 groups and between (b) TRG1 and TRG3 groups.

4. Discussion

Gastric cancer treatment no longer involves surgery alone but over the past decade has become a multimodality treatment. Most notably, the MAGIC trial and the French FNCLCC/FFCD 97033 trial demonstrated a significant survival benefit of perioperative treatment, which is currently a gold standard in the Western population [4–6]. The response to neoadjuvant chemotherapy constitutes a substantial prognostic factor for disease-free survival and overall survival [27–29]. As was demonstrated by the University of Texas MD Anderson Cancer Center, the ypStage provides reasonable survival prediction based on TNM grouping, whereas the clinical stage is not useful [30]. In patients with tumour downstaging, disease-free survival and overall survival are longer than in patients without response to preoperative chemotherapy, and the best outcome is observed in patients with pathological complete tumour regression [27–29]. Unfortunately, the response rate after NAC remains limited [4–6]. Moreover, there are currently no biomarkers enabling an individual prediction of therapeutic efficacy and real-time tumour dynamics or identifying patients at increased risk of a poor pathological response. In patients non-responsive to

neoadjuvant chemotherapy, such markers could make it possible to determine the optimal balance between the risks and benefits of avoiding NAC in patients with locally advanced GC or GEJ cancer.

We know from previous analyses that both preoperative and postoperative serum levels of CEA, CA19.9, and CA125 are good prognostic factors in the surgical treatment of non-metastatic gastric cancer [31–33]. We did not demonstrate the usefulness of these markers as predictive biomarkers of early response to neoadjuvant treatment, probably due to the fact that more time is required to observe changes in the serum levels of these markers.

It was not possible to achieve statistical significance for LMR, NLR, dNLR, PLR, and CTCs as biomarkers, which are usually associated with the prognosis and response to treatment in advanced disease [20–22,34–36]. The cases included in this study were also less advanced: only 8% of the patients were cT4, and 26% of the patients were clinical stage III-A-C (TNM according to the AJCC—the 8th edition). This may also be the reason why we did not observe the usefulness of IL-10, which is mainly associated with a higher stage of the disease [11,37].

IL1 β and IL-8 are important pro-angiogenic factors which participate in the growth of cancer cells, play a role in metastasis promotion, and have a pleiotropic effect on immune cells [12,14,38,39]. However, a better understanding of these mechanisms is needed in order to attempt to use them as markers of treatment response.

With regard to circulating cancer cells, we should bear in mind that they rarely occur in peripheral blood and that there are technical limitations of various assay methods. Currently, there is no well-established method available for determining CTCs in gastric cancer [40,41]. Based on previous data, we chose tumour-related mRNA (CEA, *CK19*, *survivin*) for the detection of circulating tumour cells in gastric cancer patients with the use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction (real-time PCR) method [42–44].

In our prospective, single-institution trial, we showed that out of all the measured parameters, only the elevated level of IL-6 prior to the start of treatment and C2 might be a predictor of pathological response to neoadjuvant chemotherapy. A significant difference in the IL-6 serum level before C2 of chemotherapy was recognised comparing the TGR1, TGR2, and TGR3 groups (3.76 pg/mL vs. 7.07 pg/mL vs. 9.43 pg/mL, respectively, $p = 0.016$). We had previously presented data suggesting that tumour regression grade after neoadjuvant treatment could be a prognostic factor in patients with locally advanced GC or GEJ cancer patients undergoing radical treatment. According to the Becker classification, 12% TRG1a (27), 14% TRG1b (31), 31% TRG2 (69), and 38% TRG3 (84) patients were reported, and the median overall survival (mOS) was 53.7 (95% CI; 48.0–59.3), 51.9 (95% CI; 45.9–57.9), 42.7 (95% CI; 36.2–49.2), and 28.3 (95% CI; 37.7–44.7), respectively ($p < 0.001$) [45]. This indicates a similarity with the results of other researchers (e.g., Athauda A. et al., Davarzani N. et al.) [29,46], although more investigation of this issue seems to be required.

Patients who did not experience pathological complete response (pCR) had statistically significantly higher serum levels in C2 than non-pCR patients. Similarly, node-positive (ypN+) patients had statistically significantly higher serum levels before the start of treatment than node-negative (ypN0) patients. Multivariate analysis by Smyth E. et al. demonstrated that the presence of lymph node metastases was the only factor independently predictive of overall survival in patients after NAC [27]. The latest data presented by Athauda A. et al. confirmed that lymph node status in the resection specimen is the single most important determiner of survival [29].

Our prospective pilot study is the first analysis of the utility of IL-6 as a predictive biomarker of early response to NAC.

IL-6 is a key immunomodulatory cytokine, which is involved in the orchestration of the innate and acquired immune system and plays an important role in the regulation of various homeostatic to pathological processes such as immune disease and cancers [47]. Studies by Kai H. et al. and Ito R. et al. show that IL-6 is involved in the growth of gastric cancer cells and the formation of metastases [14,15]. IL-6 is an important pro-angiogenic factor in gastric cancer through the induction of the VEGF [13]. A significant

correlation was observed between the serum concentration of IL-6 and the tumour stage, depth of tumour invasion, lymphatic invasion, and venous invasion, as well as lymph node metastasis [37,48]. Increasing data suggest that IL-6 plays a crucial role in the modulation of the function and activity of tumour-associated immune cells [49]. IL-6 is a cancer-associated fibroblast (CAF)-specific secretory protein and a contributor to the dynamic crosstalk between tumour cells and the microenvironment, which is essential for tumour growth, invasion, and metastases. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) of gastric cancer cells is induced by CAF-secreted IL-6. CAF-secreted IL-6 activates the Janus kinase (JAK) 1 signal transducer and activator of transcription 3 signal transduction (STAT) pathway in GC cell lines. The aberrantly hyperactivated IL-6/JAK/STAT3 pathway is generally associated with a poor clinical prognosis [50–52]. In vitro and in vivo studies showed that CAF-secreted IL-6 is a very important contributor of chemoresistance in GC. The interaction of CAFs with tumour cells may induce a more aggressive phenotype of cancer cells and confer 5-fluorouracil resistance to gastric cancer cell lines through the inhibition of apoptosis [53]. This is extremely important as 5-fluorouracil is the main cytostatic agent widely used in both perioperative and palliative treatment [4–6].

IL-6, apart from its role in tumorigenesis, has also been implicated in causing muscle wasting and cachexia. Cachexia is a significant clinical problem in gastric cancer patients, as well as a prognostic factor of the disease [54–58]. We are also in the process of preparing data on sarcopenia measured with the Hounsfield Unit Average Calculation (HUAC) of the psoas muscle and the Total Psoas Index (TPI) in CT performed prior to neoadjuvant chemotherapy and surgery. Subsequently, we aim at finding out whether there is a correlation of HUAC and TPI with inflammatory parameters.

In light of the above data, our study results seem to be of clinical importance. If the results are confirmed in a larger group of patients, the measurement of IL-6 serum level prior to start of treatment and prior to the administration of cycle 2 of neoadjuvant chemotherapy will enable the quick identification of ypN+ and non-pCR patients with a poor prognosis. If the effect of IL-6 on the induction of resistance to chemotherapy is also taken into consideration, it will be the basis for testing the efficacy of a combination of perioperative chemotherapy with IL-6 receptor inhibition [59]. Currently, there is an ongoing EMPOWER (NCT04333706) clinical trial of the combination of sarilumab (IL-6R inhibitor) plus capecitabine in triple-negative breast cancer patients in stage I–III with high-risk residual disease [60].

5. Conclusions

The above data suggest that IL-6 may be a predictive biomarker of pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with GC and GEJ cancer. The results were obtained in a small group of patients and currently cannot be used in everyday clinical practice. Confirmation of the results in a larger group of patients seems to be essential from a clinical point of view, bearing in mind that IL-6 plays a significant role in gastric cancer biology, particularly in metastasis formation and in the mechanism of chemotherapeutic resistance.

Author Contributions: Conceptualisation, K.M.-G. and L.S.W.; methodology, K.M.-G., L.S.W., A.T. and M.F.; software, K.M.-G.; validation, A.N., A.T. and M.F.; formal analysis, K.M.-G.; data curation, K.M.-G.; investigation, K.M.-G., B.K., A.N., M.W., M.K., A.T., T.O., J.P., U.S. and A.K.-C.; resources, K.M.-G., B.K., A.N., M.W., M.K., A.T., T.O., J.P., U.S. and A.K.-C.; writing—original draft preparation, K.M.-G.; writing—review and editing, K.M.-G., L.S.W., A.T. and B.K.; supervision, L.S.W.; project administration, K.M.-G.; funding acquisition, K.M.-G. and L.S.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This academic clinical study research was financed by the statutory funds of the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology (MSCNRIO), Warsaw, Poland (grant number SN/GW24/2017 on 13 February 2017). The funders had no role in the design of this study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Institutional Review Board Statement: This trial was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Local Bioethics Committee at the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology (MSCNRIO) in Warsaw (approval number 51/2016/2017 on 5 January 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: Katarzyna Marcisz-Grzanka, Beata Kotowicz, Aleksandra Nowak, Mariola Winiarek, Malgozata Fuksiewicz, Maria Kowalska, Andrzej Tysarowski, Tomasz Olesinski, Jakub Palucki, Urszula Sulowska, and Agnieszka Kolasinska-Cwikla declare no conflicts of interest. Lucjan Stanislaw Wyrwicz: consulting fees—MSD, AstraZeneca; payment or honoraria for lectures, presentations, speakers' bureaus, manuscript writing, or educational events—MSD, AstraZeneca; payment for expert testimony—MSD, AstraZeneca.

Appendix A

Table A1. Reference genes selected for optimisation ^{A1}.

Gene	Name	Protein Function
TBP	TATA binding protein	Transcription initiator—binds to a specific DNA sequence—the TATA box
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	An enzyme involved in the metabolism of purines, allowing their recovery from degraded DNA for the re-synthesis of nucleotides
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	An enzyme involved in glycolysis—converts glucose into carbon molecules and energy
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A	Mitochondrial respiratory chain complex—responsible for the transformation of succinate into fumarate
YWHAZ	Monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	It is a regulator of cell apoptotic pathways—it takes part in metabolism and regulates the cell cycle
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	An enzyme involved in the production of heme
ZNF410	Zinc finger protein 410	Transcription factor

^{A1} GeneCards, UniProt [61,62].

Table A2. Baseline characteristics of the treatment group ^{A2}.

Factor	Value
Age (years)	
Median	63 (30–77)
<60	20 (33%)
60–69	30 (49%)
≥70	11 (18%)
Sex	
Male	32 (52.5%)
Female	29 (47.5%)
ECOG	
0	11 (18%)
1	50 (82%)
Location of tumour	
GEJ	14 (23%)
Stomach	47 (77%)
cT-stage	
T1	1 (2%)
T2	28 (46%)

Table A2. *Cont.*

Factor	Value
cT-stage	
T3	27 (44%)
T4	5 (8%)
cN-stage	
N0	30 (49%)
N1	11 (18%)
N2	11 (18%)
N3	9 (15%)
N+	30 (49%)
N-	31 (51%)
TNM according to AJCC—the 8th edition	
IIA	27 (44%)
IIB	18 (30%)
IIIA	5 (8%)
IIIB	7 (11%)
IIIC	4 (7%)
Lauren's type	
Diffuse	17 (28%)
Intestinal	23 (38%)
Mixed	12 (19%)
Not evaluable according to Lauren	9 (15%)
Signed ring cell/poorly cohesive	22 (36%)
Grading according to WHO	
G1	1 (2%)
G2	21 (34%)
G3	28 (46%)
Not evaluable	11 (18%)

^{A2} (treatment group: *n* = 61).Table A3. Body mass index of the treatment group ^{A3}.

	BMI C1	BMI C4
Median	25.45	25.73
(min–max)	(16.97–42.46)	(16.97–40.79)
BMI < 18.5	3 (5.17%)	3 (5.17%)
BMI ≥ 18.5 and BMI < 25.0	24 (41.38%)	25 (43.10%)
BMI ≥ 25.0 and BMI < 30.0	17 (29.31%)	19 (32.76%)
BMI ≥ 30.0	14 (24.14%)	11 (18.97%)

^{A3} (treatment group: *n* = 58).Table A4. Surgical and pathology results of treatment ^{A4}.

Factor	Value
Surgery	
Tumour curative surgery R0—margin free	52 (85%)
Tumour surgery R1	1 (2%)
Palliative surgery	5 (8%)
No surgery	3 (5%)
Histopathological tumour regression according to Becker classification	
Complete—TRG1a	7 (11%)
Subtotal—TRG1b	6 (10%)
Complete or subtotal—TRG1a/b	13 (21%)
Partial—TRG2	14 (23%)

Table A4. Cont.

Factor	Value
Histopathological tumour regression according to Becker classification	
Minimal or none—TRG3	26 (43%)
Palliative surgery—not evaluated TGR	5 (8%)
Tumour stage (ypT)	
Tx	7 (11%)
T1	11 (18%)
T2	9 (15%)
T3	23 (38%)
T4	3 (5%)
ypT not available	8 (13%)
Nodal status (ypN)	
N0	34 (56%)
N1	5 (8%)
N2	6 (10%)
N3	8 (13%)
ypN not available	8 (13%)
Lymphovascular invasion—LVI	
Yes	20 (33%)
No	32 (52%)
N/A	9 (15%)
Perineural invasion—PNI	
Yes	7 (11%)
No	45 (74%)
N/A	9 (15%)

A4 (treatment group: $n = 61$).

Table A5. Serum biomarkers in pCR vs. non-pCR group A5.

Biomarker	pCR A5+	Non-pCR A5+	p A5**
Measurement C1			
LMR	3.61 (2.48; 4.05)	3.34 (2.67; 4.70)	0.993
NLR	2.43 A5*** ± 1.00 A5***	2.75 A5*** ± 1.18 A5***	0.389 A5****
dNLR	0.46 (0.34; 0.62)	0.41 (0.30; 0.51)	0.345
PLR	192.05 (132.38; 250.04)	156.30 (122.28; 189.66)	0.191
CEA	1.81 (1.54; 3.10)	2.45 (1.32; 3.80)	0.605
CA19.9	10.78 (5.23; 26.44)	8.12 (3.73; 29.17)	0.699
CA125	14.15 (9.52; 23.33)	11.70 (8.50; 16.60)	0.342
IL-1 β	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00)	0.614
[pg/mL] IL-10	4.71 (4.03; 8.03)	3.93 (1.77; 5.19)	0.142
[pg/mL] IL-8	19.12 (17.63; 29.51)	20.43 (13.30; 34.01)	0.653
CTC-survivin	0.41 (0.28; 2.20)	0.43 (0.24; 1.85)	0.928
CTC-CK19	1.55 (0.88; 2.54)	1.11 (0.32; 3.43)	0.839

Table A5. *Cont.*

Biomarker	pCR A5*	Non-pCR A5*	p A5**
Measurement C2			
LMR	2.15 (1.70; 2.59)	2.69 (2.12; 3.20)	0.072
NLR	4.49 A5*** ±1.63 A5***	4.08 A5*** ±2.05 A5***	0.524 A5****
dNLR	0.24 (0.18; 0.26)	0.27 (0.18; 0.37)	0.394
PLR	85.92 (60.91; 100.50)	87.82 (69.82; 111.00)	0.548
CEA	1.88 (1.54; 3.22)	2.67 (1.86; 4.13)	0.177
CA19.9	9.70 (6.08; 23.95)	7.81 (4.78; 32.36)	0.921
CA125	13.90 (12.00; 23.90)	13.80 (10.58; 18.17)	0.454
IL-1β	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00)	0.690
[pg/mL]	7.83 A5*** ±4.51 A5***	6.53 A5*** ±4.53 A5***	0.455 A5****
IL-10	19.62 (14.72; 35.14)	11.24 (9.67; 19.24)	0.029
[pg/mL]	1.22 (0.95; 7.01)	1.20 (0.61; 5.23)	0.651
CTC-survivin	2.46 (0.71; 8.11)	0.77 (0.10; 2.74)	0.100
CTC-CK19			
Measurement C3			
LMR	1.63 (1.42; 2.59)	2.23 (1.68; 3.22)	0.083
NLR	3.49 A5*** ±3.03 A5***	4.56 A5*** ±2.12 A5***	0.267 A5****
dNLR	0.52 (0.18; 1.22)	0.22 (0.17; 0.30)	0.293
PLR	107.52 (82.23; 173.17)	85.15 (71.91; 114.83)	0.122
CEA	3.30 (2.10; 4.16)	3.62 (2.28; 5.10)	0.431
CA19.9	9.89 (4.91; 21.10)	8.79 (5.55; 28.30)	0.751
CA125	12.65 (10.95; 16.80)	14.00 (9.40; 18.90)	0.799
IL-1β	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00)	0.601
[pg/mL]	6.10 (5.58; 11.12)	5.92 (3.84; 9.76)	0.301
IL-10	19.92 A5*** ±9.04 A5***	23.89 A5*** ±18.73 A5***	0.545 A5****
[pg/mL]	4.39 (0.48; 12.60)	1.19 (0.47; 3.30)	0.414
CTC-survivin	0.73 (0.17; 28.27)	1.03 (0.04; 2.71)	0.493
CTC-CK19			
Measurement C4			
LMR	1.86 (1.57; 2.51)	2.25 (1.79; 2.78)	0.322
NLR	4.44 A5*** ±2.35 A5***	4.24 A5*** ±2.43 A5***	0.803 A5****
dNLR	0.25 (0.16; 0.31)	0.24 (0.17; 0.37)	0.803

Table A5. Cont.

Biomarker	pCR ^{A5*}	Non-pCR ^{A5*}	<i>p</i> ^{A5**}
Measurement C4			
PLR	110.90 ^{A5***} ±79.34 ^{A5***}	102.86 ^{A5***} ±43.95 ^{A5***}	0.648 ^{A5****}
CEA	3.63 (2.67; 4.70)	3.93 (2.60; 5.28)	0.872
CA19.9	9.93 (4.99; 12.29)	9.70 (5.00; 19.78)	0.436
CA125	15.10 ^{A5***} ±6.22 ^{A5***}	15.25 ^{A5***} ±6.23 ^{A5***}	0.949 ^{A5****}
IL-1β [pg/mL]	N/A	N/A	N/A
IL-10 [pg/mL]	N/A	N/A	N/A
IL-8 [pg/mL]	N/A	N/A	N/A
CTC-survivin	N/A	N/A	N/A
CTC-CK19	N/A	N/A	N/A

^{A5} LMR, NLR, dNLR, PLR, CEA, Ca19.9, Ca125; pCR group: *n* = 13, non-pCR group: *n* = 49. IL-1β, IL-10, IL-8, CTC-survivin, CTC-CK19; pCR group: *n* = 12, non-pCR group: *n* = 28; ^{A5*}, ^{A5***} data presented as median ^{A5*} (first quartile, third quartile) or mean ± standard deviation ^{A5***}; ^{A5**}, ^{A5****} comparisons performed with Mann-Whitney U test ^{A5**} or *t*-Student test ^{A5****}.

Table A6. Serum biomarkers in ypN+ vs. ypN0 group ^{A6}.

Biomarker	pCR ^{A6*}	Non-pCR ^{A6*}	<i>p</i> ^{A6**}
Measurement C1			
LMR	3.11 (2.69; 3.68)	3.44 (2.92; 5.03)	0.171
NLR	2.66 ^{A6***} ±0.79 ^{A6***}	2.46 ±1.06 ^{A6***}	0.480 ^{A6****}
dNLR	0.36 (0.31; 0.54)	0.44 (0.34; 0.61)	0.247
PLR	162.89 (142.46; 183.29)	156.18 (122.24; 197.06)	0.474
CEA	3.40 (1.32; 8.14)	1.83 (1.32; 2.80)	0.071
CA19.9	8.25 (4.07; 78.14)	7.08 (2.86; 12.67)	0.447
CA125	12.25 (11.35; 17.03)	10.40 (7.30; 15.30)	0.117
IL-1β [pg/mL]	0.00 (0.00; 0.98)	0.00 (0.00; 0.00)	0.017
IL-10 [pg/mL]	3.52 (1.89; 4.79)	4.53 (3.32; 5.58)	0.351
IL-8 [pg/mL]	22.16 (13.14; 43.54)	18.62 (14.36; 29.04)	0.475
CTC-survivin	0.60 (0.29; 1.58)	0.46 (0.28; 4.70)	0.641
CTC-CK19	0.91 (0.28; 2.06)	0.96 (0.24; 1.97)	0.931
Measurement C2			
LMR	2.81 ^{A6***} ±0.93 ^{A6***}	2.58 ^{A6***} ±0.90 ^{A6***}	0.401 ^{A6****}
NLR	3.93 (2.83; 5.60)	3.87 (3.04; 4.66)	0.561

Table A6. *Cont.*

Biomarker	pCR ^{A6*}	Non-pCR ^{A6*}	<i>p</i> ^{A6**}
Measurement C2			
dNLR	0.26 (0.18; 0.36)	0.26 (0.21; 0.33)	0.561
PLR	86.15 (70.59; 114.30)	87.70 (61.86; 109.98)	0.753
CEA	3.83 (1.62; 16.96)	2.35 (1.71; 2.92)	0.133
CA19.9	9.31 (4.81; 77.61)	7.49 (5.21; 12.41)	0.331
CA125	13.95 (11.90; 17.00)	12.20 (9.10; 16.60)	0.258
IL-1 β	0.00 (0.00; 0.24)	0.00 (0.00; 0.00)	0.622
[pg/mL]	5.48 ^{A6***}	7.01 ^{A6***}	0.368 ^{A6****}
IL-10	± 3.92 ^{A6***}	± 4.74 ^{A6***}	
[pg/mL]	13.77 (8.28; 22.33)	15.08 (10.87; 22.50)	0.606
IL-8	1.41 (0.81; 2.43)	2.32 (0.87; 12.40)	0.395
CTC-survivin	0.77 (0.06; 5.28)	0.73 (0.30; 2.46)	> 0.999
CTC-CK19			
Measurement C3			
LMR	1.96 (1.66; 2.38)	2.18 (1.55; 3.21)	0.753
NLR	5.40 ^{A6***} ± 2.26 ^{A6***}	3.98 ^{A6***} ± 2.29 ^{A6***}	0.038 ^{A6****}
dNLR	0.21 (0.14; 0.24)	0.22 (0.18; 0.42)	0.109
PLR	85.81 (78.45; 110.50)	87.47 (73.02; 135.39)	0.992
CEA	4.03 (2.06; 10.28)	3.30 (2.20; 4.27)	0.327
CA19.9	9.18 (5.41; 51.33)	8.35 (4.99; 14.96)	0.342
CA125	14.20 (12.65; 18.30)	12.70 (8.70; 16.60)	0.252
IL-1 β	0.00 (0.00; 0.58)	0.00 (0.00; 0.00)	0.228
[pg/mL]	6.46 (4.36; 10.20)	5.58 (3.84; 11.07)	0.751
IL-10	17.14 (7.86; 47.26)	15.08 (10.18; 30.13)	0.843
[pg/mL]	0.87 (0.34; 3.20)	2.92 (0.96; 13.56)	0.085
CTC-survivin	0.35 (0.00; 1.14)	0.21 (0.06; 4.42)	0.516
CTC-CK19			
Measurement C4			
LMR	2.07 (1.75; 2.63)	2.02 (1.73; 2.71)	0.820
NLR	4.58 ± 2.69 ^{A6***}	3.93 ± 2.09 ^{A6***}	0.364 ^{A6****}
dNLR	0.22 ^{A6***} (0.17; 0.38)	0.26 ^{A6***} (0.18; 0.39)	0.495
PLR	93.30 (72.61; 106.19)	94.42 (72.82; 114.35)	0.940
CEA	4.28 (3.08; 5.10)	3.53 (2.57; 4.55)	0.334

Table A6. Cont.

Biomarker	pCR ^{A6*}	Non-pCR ^{A6*}	p ^{A6**}
	Measurement C4		
CA19.9	7.50 (4.43; 14.33)	9.42 (4.93; 13.65)	0.989
CA125	15.95 ^{A6***} ±5.37 ^{A6***}	13.46 ^{A6***} ±5.39 ^{A6***}	0.185 ^{A6****}
IL-1β [pg/mL]	N/A	N/A	N/A
IL-10 [pg/mL]	N/A	N/A	N/A
IL-8 [pg/mL]	N/A	N/A	N/A
CTC-survivin	N/A	N/A	N/A
CTC-CK19	N/A	N/A	N/A

^{A6} LMR, NLR, dNLR, PLR, CEA, Ca19.9, Ca125; ypN+ group: n = 13, ypN0 group: n = 49. IL-1β, IL-10, IL-8, CTC-survivin, CTC-CK19; ypN+ group: n = 12, ypN0 group: n = 28; ^{A6*}, ^{A6***}, ^{A6****} data presented as median ^{A6*} (first quartile, third quartile) or mean ± standard deviation ^{A6***}, ^{A6***}, ^{A6****} comparisons performed with Mann-Whitney U test ^{A6**} or t-Student test ^{A6****}.

References

- Chau, I.; Norman, A.R.; Cunningham, D.; Waters, J.S.; Oates, J.; Ross, P.J. Multivariate prognostic factor analysis in locally advanced and metastatic esophago-gastric cancer-pooled analysis from three multicenter, randomized, controlled trials using individual patient data. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 2395–2403. [\[CrossRef\]](#)
- Greenlee, R.T.; Murray, T.; Bolden, S.; Wingo, P.A. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **2000**, *50*, 7–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cunningham, D.; Allum, W.H.; Stenning, S.P.; Thompson, J.N.; Van de Velde, C.J.; Nicolson, M.; Scarffe, J.H.; Lofts, F.J.; Falk, S.J.; Iveson, T.J.; et al. MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 11–20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ychou, M.; Boige, V.; Pignon, J.P.; Conroy, T.; Bouche, O.; Lebreton, G.; Ducourtieux, M.; Bedenne, L.; Fabre, J.M.; Saint-Aubert, B.; et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: An FNCLCC and FPCD multicenter phase III trial. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 2144–2152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Al-Batran, S.E.; Homann, N.; Pauligk, C.; Goetze, T.O.; Meiler, J.; Kasper, S.; Kopp, H.G.; Mayer, F.; Haag, G.M.; Luley, K.; et al. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): A randomised. *Lancet* **2019**, *393*, 1948–1957. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chai, E.Z.; Siveen, K.S.; Shanmugam, M.K.; Arfuso, F.; Sethi, G. Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer. *Biochem. J.* **2015**, *468*, 1–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Coussens, L.M.; Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **2002**, *420*, 860–867. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883–899. [\[CrossRef\]](#)
- Myers, J.S. Proinflammatory cytokines and sickness behavior: Implications for depression and cancer-related symptoms. *Oncol. Nurs. Forum* **2008**, *35*, 802–807. [\[CrossRef\]](#)
- Szaflarska, A.; Szczepanik, A.; Siedlar, M.; Czupryna, A.; Sierzega, M.; Popiela, T.; Zembala, M. Preoperative plasma level of IL-10 but not of proinflammatory cytokines is an independent prognostic factor in patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 5005–5012. [\[PubMed\]](#)
- Kitadai, Y.; Haruma, K.; Sumii, K.; Yamamoto, S.; Ue, T.; Yokozaki, H.; Yasui, W.; Ohmoto, Y.; Kajiyama, G.; Fidler, I.J. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152*, 93–100.
- Huang, S.P.; Wu, M.S.; Shun, C.T.; Wang, H.P.; Lin, M.T.; Kuo, M.L.; Lin, J.T. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J. Biomed. Sci.* **2004**, *11*, 517–527. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kai, H.; Kitadai, Y.; Kodama, M.; Cho, S.; Kuroda, T.; Ito, M.; Tanaka, S.; Ohmoto, Y.; Chayama, K. Involvement of proinflammatory cytokines IL-1β and IL-6 in progression of human gastric carcinoma. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 709–713. [\[PubMed\]](#)
- Ito, R.; Yasui, W.; Kuniyasu, H.; Yokozaki, H.; Tahara, E. Expression of interleukin-6 and its effect on the cell growth of gastric carcinoma cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.* **1997**, *88*, 953–958. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kim, H.K.; Song, K.S.; Park, Y.S.; Kang, Y.H.; Lee, Y.J.; Lee, K.R.; Kim, H.K.; Ryu, K.W.; Bae, J.M.; Kim, S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: Possible role of a metastasis predictor. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 184–191; Erratum in *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 2569. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

17. Nishijima, T.F.; Muss, H.B.; Shachar, S.S.; Tamura, K.; Takamatsu, Y. Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat. Rev.* **2015**, *41*, 971–978. [\[CrossRef\]](#)
18. Templeton, A.J.; Ace, O.; McNamara, M.G.; Al-Mubarak, M.; Vera-Badillo, F.E.; Hermanns, T.; Seruga, B.; Ocana, A.; Tannock, I.F.; Amir, E. Prognostic role of platelet to lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2014**, *23*, 1204–1212. [\[CrossRef\]](#)
19. Templeton, A.J.; McNamara, M.G.; Seruga, B.; Vera-Badillo, F.E.; Aneja, P.; Ocana, A.; Leibowitz-Amit, R.; Sonpavde, G.; Knox, J.J.; Tran, B.; et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*, dju124. [\[CrossRef\]](#)
20. Lian, L.; Xia, Y.Y.; Zhou, C.; Shen, X.M.; Li, X.L.; Han, S.G.; Zheng, Y.; Mao, Z.Q.; Gong, F.R.; Wu, M.Y.; et al. Application of platelet/lymphocyte and neutrophil/lymphocyte ratios in early diagnosis and prognostic prediction in patients with resectable gastric cancer. *Cancer Biomark.* **2015**, *15*, 899–907. [\[CrossRef\]](#)
21. Ock, C.Y.; Nam, A.R.; Lee, J.; Bang, J.H.; Lee, K.H.; Han, S.W.; Kim, T.Y.; Im, S.A.; Kim, T.Y.; Bang, Y.J.; et al. Prognostic implication of antitumor immunity measured by the neutrophil-lymphocyte ratio and serum cytokines and angiogenic factors in gastric cancer. *Gastric Cancer* **2017**, *20*, 254–262. [\[CrossRef\]](#)
22. Cho, I.R.; Park, J.C.; Park, C.H.; Jo, J.H.; Lee, H.J.; Kim, S.; Shim, C.N.; Lee, H.; Shin, S.K.; Lee, S.K.; et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic marker to predict chemotherapeutic response and survival outcomes in metastatic advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* **2014**, *17*, 703–710. [\[CrossRef\]](#)
23. Arigami, T.; Uenosono, Y.; Ishigami, S.; Okubo, K.; Kijima, T.; Yanagita, S.; Okumura, H.; Uchikado, Y.; Kijima, Y.; Nakajo, A.; et al. A Novel Scoring System Based on Fibrinogen and the Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Predictor of Chemotherapy Response and Prognosis in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Oncology* **2016**, *90*, 186–192. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Tsujitara, M.; Ichikawa, D.; Konishi, H.; Komatsu, S.; Shiozaki, A.; Otsuji, E. Liquid biopsy of gastric cancer patients: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 3265–3286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Arigami, T.; Okumura, H.; Matsumoto, M.; Uchikado, Y.; Uenosono, Y.; Kita, Y.; Owaki, T.; Mori, S.; Kurahara, H.; Kijima, Y.; et al. Analysis of the Fibrinogen and Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Promising Blood Marker of Tumor Progression and Prognosis. *Medicine* **2015**, *94*, e1702. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Feng, J.F.; Huang, Y.; Chen, Q.X. The combination of platelet count and neutrophil lymphocyte ratio is a predictive factor in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Transl. Oncol.* **2014**, *7*, 632–637. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Smyth, E.C.; Fassan, M.; Cunningham, D.; Allum, W.H.; Okines, A.E.; Lampis, A.; Hahne, J.C.; Ruge, M.; Peckitt, C.; Nankivell, M.; et al. Effect of Pathologic Tumor Response and Nodal Status on Survival in the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy Trial. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2721–2727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Reim, D.; Novotny, A.; Friess, H.; Slotta-Huspenina, J.; Weichert, W.; Ott, K.; Dislich, B.; Lorenzen, S.; Becker, K.; Langer, R. Significance of tumour regression in lymph node metastases of gastric and gastroesophageal junction adenocarcinomas. *J. Pathol. Clin. Res.* **2020**, *6*, 263–272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Athauda, A.; Nankivell, M.; Langer, R.; Pritchard, S.; Langley, R.E.; von Loga, K.; Starling, N.; Chau, I.; Cunningham, D.; Grabsch, H.I.; et al. Pathological regression of primary tumour and metastatic lymph nodes following chemotherapy in resectable OG cancer: Pooled analysis of two trials. *Br. J. Cancer* **2023**, *128*, 2036–2043. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Ikoma, N.; Blum, M.; Estrella, J.S.; Das, P.; Hofstetter, W.L.; Fournier, K.E.; Mansfield, P.; Ajani, J.A.; Badgwell, B.D. Evaluation of the American Joint Committee on Cancer 8th edition staging system for gastric cancer patients after preoperative therapy. *Gastric Cancer* **2018**, *21*, 74–83. [\[CrossRef\]](#)
31. Tachibana, M.; Takemoto, Y.; Nakashima, Y.; Kinugasa, S.; Kotoh, T.; Dhar, D.K.; Kohno, H.; Nagasue, N. Serum carcinoembryonic antigen as a prognostic factor in resectable gastric cancer. *J. Am. Coll. Surg.* **1998**, *187*, 64–68. [\[CrossRef\]](#)
32. Zhu, X.D.; Zhang, L.X.; Luo, P.Q.; Zhu, H.; Wei, Z.J.; Xu, A.M. Prognostic significance of post-preoperative tumor markers increments in patients with non-metastatic gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2023**, *149*, 12191–12201. [\[CrossRef\]](#)
33. Liu, X.; Qiu, H.; Liu, J.; Chen, S.; Xu, D.; Li, W.; Zhan, Y.; Li, Y.; Chen, Y.; Zhou, Z.; et al. Combined preoperative concentrations of CEA, CA 19-9, and 72-4 for predicting outcomes in patients with gastric cancer after curative resection. *Oncotarget* **2016**, *7*, 35446–35453. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Lee, S.; Oh, S.Y.; Kim, S.H.; Lee, J.H.; Kim, M.C.; Kim, K.H.; Kim, H.J. Prognostic significance of neutrophil lymphocyte ratio and platelet lymphocyte ratio in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX chemotherapy. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 350. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Zhou, X.; Xu, L.; Huang, Z.; Zhang, L.; Zhang, H.; Zhu, W.; Liu, P. The hematologic markers as prognostic factors in patients with resectable gastric cancer. *Cancer Biomark.* **2016**, *17*, 359–367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Matsusaka, S.; Chiri, K.; Ogura, M.; Suenaga, M.; Shinozaki, E.; Mishima, Y.; Terui, Y.; Mizunuma, N.; Hatake, K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 1067–1071. [\[CrossRef\]](#)
37. Ikeguchi, M.; Hatada, T.; Yamamoto, M.; Miyake, T.; Matsunaga, T.; Fukumoto, Y.; Yamada, Y.; Fukuda, K.; Saito, H.; Tatebe, S. Serum interleukin-6 and -10 levels in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* **2009**, *12*, 95–100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Rebe, C.; Ghiringhelli, F. Interleukin-1 β and Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 1791. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Fousek, K.; Horn, L.A.; Palena, C. Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. *Pharmacol. Ther.* **2021**, *219*, 107692. [\[CrossRef\]](#)

40. Kowalik, A.; Kowalewska, M.; Gozdz, S. Current approaches for avoiding the limitations of circulating tumor cells detection methods—implications for diagnosis and treatment of patients with solid tumors. *Transl. Res.* **2017**, *185*, 58–84. [\[CrossRef\]](#)
41. Zhang, Z.; Wu, H.; Chong, W.; Shang, L.; Jing, C.; Li, L. Liquid biopsy in gastric cancer: Predictive and prognostic biomarkers. *Cdi Death Dis.* **2022**, *13*, 903. [\[CrossRef\]](#)
42. Arigami, T.; Uenosono, Y.; Yanagita, S.; Okubo, K.; Kijima, T.; Matsushita, D.; Amatatsu, M.; Kurahara, H.; Maemura, K.; Natsugoe, S. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastric cancer. *Ann. Gastroenterol. Surg.* **2017**, *1*, 60–68. [\[CrossRef\]](#)
43. Qiu, M.Z.; Li, Z.H.; Zhou, Z.W.; Li, Y.H.; Wang, Z.Q.; Wang, F.H.; Huang, P.; Aziz, F.; Wang, D.Y.; Xu, R.H. Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA in blood using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to predict recurrence of gastric adenocarcinoma. *J. Transl. Med.* **2010**, *8*, 107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Wu, C.H.; Lin, S.R.; Hsieh, J.S.; Chen, F.M.; Lu, C.Y.; Yu, F.J.; Cheng, T.L.; Huang, T.J.; Huang, S.Y.; Wang, J.Y. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer: Evaluation of their prognostic significance. *Dis. Markers* **2006**, *22*, 103–109. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Marcisz-Grzanka, K.; Rybski, S.; Siwik, M.; Sulkowska, U.; Wyrwicz, L.S. P-341 Tumor Regression and Nodal Status to Neoadjuvant Chemotherapy as a Prognostic Marker in Patients with Locally Advanced Gastric and Gastroesophageal Cancer. *Ann. Oncol.* **2023**, *34*, 134. [\[CrossRef\]](#)
46. Davarzani, N.; Hutchins, G.G.A.; West, N.P.; Hewitt, L.C.; Nankivell, M.; Cunningham, D.; Allum, W.H.; Smyth, E.; Valeri, N.; Langley, R.E.; et al. Prognostic value of pathological lymph node status and primary tumour regression grading following neoadjuvant chemotherapy—Results from the MRC OE02 oesophageal cancer trial. *Histopathology* **2018**, *72*, 1180–1188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Hirano, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int. Immunol.* **2021**, *33*, 127–148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Ashizawa, T.; Okada, R.; Suzuki, Y.; Takagi, M.; Yamazaki, T.; Sumi, T.; Aoki, T.; Ohnuma, S.; Aoki, T. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: Role of IL-6 as a prognostic factor. *Gastric Cancer* **2005**, *8*, 124–131. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Oya, Y.; Hayakawa, Y.; Koike, K. Tumor microenvironment in gastric cancers. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 2696–2707. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Wu, X.; Tao, P.; Zhou, Q.; Li, J.; Yu, Z.; Wang, X.; Li, J.; Li, C.; Yan, M.; Zhu, Z.; et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 20741–20750. [\[CrossRef\]](#)
51. Kinoshita, H.; Hirata, Y.; Nakagawa, H.; Sakamoto, K.; Hayakawa, Y.; Takahashi, R.; Nakata, W.; Sakitani, K.; Serizawa, T.; Hikiba, Y.; et al. Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60914. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Karakasheva, T.A.; Lin, E.W.; Tang, Q.; Qiao, E.; Waldron, T.J.; Soni, M.; Klein-Szanto, A.J.; Sahu, V.; Basu, D.; Ohashi, S.; et al. IL-6 Mediates Cross-Talk between Tumor Cells and Activated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 4957–4970. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Han, I.H.; Oh, H.J.; Jin, H.; Bae, C.A.; Jeon, S.M.; Choi, K.S.; Son, S.Y.; Han, S.U.; Brekken, R.A.; Lee, D.; et al. Targeting interleukin-6 as a strategy to overcome stroma-induced resistance to chemotherapy in gastric cancer. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 68. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Han, J.; Meng, Q.; Shen, L.; Wu, G. Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 14. [\[CrossRef\]](#)
55. Namikawa, T.; Marui, A.; Yokota, K.; Fujieda, Y.; Murekage, M.; Uemura, S.; Maeda, H.; Kitagawa, H.; Kobayashi, M.; Hanazaki, K. Frequency and prognostic impact of cachexia during drug treatment for unresectable advanced gastric cancer patients. *Surg. Today* **2022**, *52*, 1560–1567. [\[CrossRef\]](#)
56. Fukahori, M.; Shibata, M.; Hamauchi, S.; Kasamatsu, E.; Machii, K. A retrospective cohort study to investigate the incidence of cancer-related weight loss during chemotherapy in gastric cancer patients. *Support. Care Cancer* **2021**, *29*, 341–348. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Sahin, M.E.H.; Akbas, E.; Yardimci, A.H.; Sahin, E. The effect of sarcopenia and sarcopenic obesity on survival in gastric cancer. *BMC Cancer* **2023**, *23*, 911. [\[CrossRef\]](#)
58. Matsunaga, T.; Saito, H.; Miyauchi, W.; Shishido, Y.; Miyatani, K.; Morimoto, M.; Murakami, Y.; Hanaki, T.; Kihara, K.; Yamamoto, M.; et al. Impact of skeletal muscle mass in patients with unresectable gastric cancer who received palliative first-line chemotherapy based on 5-fluorouracil. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 1219. [\[CrossRef\]](#)
59. Raskova, M.; Lacina, L.; Kejlik, Z.; Venhauerova, A.; Skalickova, M.; Kolar, M.; Jakubek, M.; Rosel, D.; Smetana, K., Jr.; Brabek, J. The Role of IL-6 in Cancer Cell Invasiveness and Metastasis—Overview and Therapeutic Opportunities. *Cells* **2022**, *11*, 3698. [\[CrossRef\]](#)
60. Jayachandran, P. A Dose Finding Phase 1 of Sarilumab Plus Capecitabine in HER2/Neu-Negative Metastatic Breast Cancer and a Single-Arm, Historically-Controlled Phase 2 Study of Sarilumab Plus Capecitabine in Stage I-III Triple Negative Breast Cancer With High-Risk Residual Disease (EMPOWER). Available online: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04333706> (accessed on 27 November 2023).

61. GeneCards. Available online: <https://www.genecards.org/> (accessed on 27 November 2023).
62. UniProt. Available online: <https://www.uniprot.org/> (accessed on 27 November 2023).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

PODSUMOWANIE

Dodatni wynik popłuczyn z otrzewnej w ocenie immunocytochemicznej najczęściej występuje u chorych z rakiem rozlanym wg Laurena (73,7 %) oraz o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego G3 (84 %), a także u chorych ze wskaźnikiem węzłowym $\geq 0,20$ (węzły dodatnie/wszystkie zbadane węzły) (78,9 %). Jest także powiązany z czasem całkowitego przeżycia (OS) oraz czasem do nawrotu choroby (PFS). Stanowi niezależny czynnik prognostyczny złego rokowania. Wyniki te są istotne klinicznie, ponieważ umożliwiają wstępną identyfikację pacjentów do chemioterapii dootrzewnowej w warunkach hipertermii (HIPEC), która może mieć wpływ na odległe wyniki leczenia w tej grupie pacjentów.

W prospektywnej ocenie chorych uzyskaliśmy podobną skuteczność z zastosowania chemioterapii okołooperacyjnej wg schematu FLOT w porównaniu do badania oryginalnego Al-Batrana S. i wsp. z akceptowalnym profilem toksyczności. Jednak zastosowanie w profilaktyce pierwotnej czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (G-CSF) przyczyniło się do znacznej redukcji częstości występowania neutropenii G3/4, gorączki neutropenicznej oraz infekcji, a tym samym umożliwiło bardziej systematyczne stosowanie chemioterapii. W przyszłych badaniach profilaktykę G-CSF można uznać za standard leczenia podczas chemioterapii według schematu FLOT.

Niestety, nie dysponujemy obecnie łatwo dostępnymi dla praktyki klinicznej markerami, na podstawie których możliwe byłoby wczesne przewidywanie dynamiki rozwoju nowotworu oraz odpowiedzi na leczenie indukcyjne. Powyższe dane sugerują, że IL-6 może być biomarkerem predykcyjnym odpowiedzi patologicznej na chemioterapię neoadjuwantową u pacjentów z miejscowo zaawansowanym rakiem żołądka i połączenia przełykowo-żołądkowego. Umożliwia ona szybką identyfikację chorych ypN+ i non-pCR o złym rokowaniu. Optymalny próg rozpoznania ypN0 wyniósł 5,0 pg/ml (AUC=0,751, 95 % CI: 0,568–0,934, p=0,017) oraz dla pCR 5.0 pg/mL (AUC=0,826, 95 % CI: 0,698–0,954, p=0,001). Wyniki uzyskano na małej grupie pacjen-

tów i obecnie nie można ich zastosować w codziennej praktyce klinicznej. Po uwzględnieniu, że IL-6 odgrywa istotną rolę w biologii raka żołądka, szczególnie w powstawaniu przerzutów i mechanizmie oporności na chemioterapeutyki, potwierdzenie wyników na większej grupie pacjentów wydaje się tym bardziej istotne klinicznie. Może także stać się podstawą do próby oceny skuteczności połączenia chemioterapii z cząstkami skierowanymi na blokowanie receptora dla IL-6 w leczeniu okołooperacyjnym.

PIŚMIENNICTWO

1. Chau I, Norman AR, Cunningham D, Waters JS, Oates J, Ross PJ. Multivariate prognostic factor analysis in locally advanced and metastatic esophago-gastric cancer--pooled analysis from three multicenter, randomized, controlled trials using individual patient data. *J Clin Oncol*. **2004** Jun 15;22(12):2395-403. doi: [10.1200/JCO.2004.08.154](https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.154). PMID: [15197201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15197201/).
2. Siewert JR, Böttcher K, Stein HJ, Roder JD. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg*. **1998** Oct;228(4):449-61. doi: [10.1097/0000658-199810000-00002](https://doi.org/10.1097/0000658-199810000-00002). PMID: 9790335.
3. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin*. **2000** Jan-Feb;50(1):7-33. doi: [10.3322/canjclin.50.1.7](https://doi.org/10.3322/canjclin.50.1.7). PMID: [10735013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10735013/).
4. Fujiwara Y, Doki Y, Taniguchi H, Sohma I, Takiguchi S, Miyata H, Yamasaki M, Monden M. Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of the patient with gastric cancer: present status and future perspectives. *Gastric Cancer*. **2007**;10(4):197-204. doi: [10.1007/s10120-007-0436-5](https://doi.org/10.1007/s10120-007-0436-5). Epub 2007 Dec 25. PMID: [18095074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18095074/).
5. Boku T, Nakane Y, Minoura T, Takada H, Yamamura M, Hioki K, Yamamoto M. Prognostic significance of serosal invasion and free intraperitoneal cancer cells in gastric cancer. *Br J Surg*. **1990** Apr;77(4):436-9. doi: [10.1002/bjs.1800770425](https://doi.org/10.1002/bjs.1800770425). PMID: [2340396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2340396/).
6. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ, MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med*. **2006** Jul 6;355(1):11-20. doi: [10.1056/NEJMoa055531](https://doi.org/10.1056/NEJMoa055531). PMID: [16822992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16822992/).
7. Ychou M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, Bouché O, Lebreton G, Ducourtieux M, Bedenne L, Fabre JM, Saint-Aubert B, Genève J, Lasser P, Rougier P. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol*. **2011** May 1;29(13):1715-21. doi: [10.1200/JCO.2010.33.0597](https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.0597). Epub 2011 Mar 28. PMID: [21444866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21444866/).
8. Al-Batran SE, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, Kopp HG, Mayer F, Haag GM, Luley K, Lindig U, Schmiegel W, Pohl M, Stoecklacher J, Folprecht G, Probst S, Prasnikar N, Fischbach W, Mahlberg R, Trojan J, Koenigsmann M, Martens UM, Thuss-Patience P, Egger M, Block A, Heinemann V, Illerhaus G, Moehler M, Schenk M, Kullmann F, Behringer DM, Heike M, Pink D, Teschendorf C, Löhr C, Bernhard H, Schuch G, Rethwisch V, von Weikersthal LF, Hartmann JT, Kneba M, Daum S, Schulmann K, Weniger J, Belle S, Gaiser T, Oduncu FS, Güntner M, Hozael W, Reichart A, Jäger E, Kraus T, Mönig S, Bechstein WO, Schuler M, Schmalenberg H, Hofheinz RD; FLOT4-AIO Investigators. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma

- (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet*. **2019** May 11;393(10184):1948-1957. doi: [10.1016/S0140-6736\(18\)32557-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32557-1). Epub 2019 Apr 11. PMID: [30982686](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30982686/).
9. Xiong B, Ma L, Cheng Y, Zhang C. Clinical effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Surg Oncol*. **2014** Oct;40(10):1321-30. doi: [10.1016/j.ejso.2014.01.006](https://doi.org/10.1016/j.ejso.2014.01.006). Epub 2014 Feb 25. Retraction in: *Eur J Surg Oncol*. **2015** Jul;41(7):953. PMID: [25239442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25239442/).
 10. Cao J, Qi F, Liu T. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer: a meta-analysis. *Scand J Gastroenterol*. **2014** Jun;49(6):690-704. doi: [10.3109/00365521.2014.907337](https://doi.org/10.3109/00365521.2014.907337). Epub 2014 Apr 14. PMID: [24731211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24731211/).
 11. Litsuka Y, Kaneshima S, Tanida O, Takeuchi T, Koga S. Intraperitoneal free cancer cells and their viability in gastric cancer. *Cancer*. **1979** Oct;44(4):1476-80. doi: [10.1002/1097-0142\(197910\)44:4<1476::aid-cncr2820440442>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197910)44:4<1476::aid-cncr2820440442>3.0.co;2-r). PMID: [498022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/498022/).
 12. Leake PA, Cardoso R, Seevaratnam R, Lourenco L, Helyer L, Mahar A, Rowsell C, Coburn NG. A systematic review of the accuracy and utility of peritoneal cytology in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*. **2012** Sep;15 Suppl 1:S27-37. doi: [10.1007/s10120-011-0071-z](https://doi.org/10.1007/s10120-011-0071-z). Epub 2011 Aug 2. PMID: [21809111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21809111/).
 13. Piessen G, Messenger M, Leteurtre E, Jean-Pierre T, Mariette C. Signet ring cell histology is an independent predictor of poor prognosis in gastric adenocarcinoma regardless of tumoral clinical presentation. *Ann Surg*. **2009** Dec;250(6):878-87. doi: [10.1097/SLA.0b013e3181b21c7b](https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181b21c7b). PMID: [19855261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19855261/).
 14. Chai EZ, Siveen KS, Shanmugam MK, Arfuso F, Sethi G. Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer. *Biochem J*. **2015** May 15;468(1):1-15. doi: [10.1042/BJ20141337](https://doi.org/10.1042/BJ20141337). PMID: [25940732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25940732/).
 15. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. **2002** Dec 19-26;420(6917):860-7. doi: [10.1038/nature01322](https://doi.org/10.1038/nature01322). PMID: [12490959](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12490959/).
 16. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. **2010** Mar 19;140(6):883-99. doi: [10.1016/j.cell.2010.01.025](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025). PMID: [20303878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303878/).
 17. Myers JS. Proinflammatory cytokines and sickness behavior: implications for depression and cancer-related symptoms. *Oncol Nurs Forum*. **2008** Sep;35(5):802-7. doi: [10.1188/08.ONF.802-807](https://doi.org/10.1188/08.ONF.802-807). PMID: [18765326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18765326/).
 18. Szaflarska A, Szczepanik A, Siedlar M, Czupryna A, Sierzega M, Popiela T, Zembala M. Preoperative plasma level of IL-10 but not of proinflammatory cytokines is an independent prognostic factor in patients with gastric cancer. *Anticancer Res*. **2009** Dec;29(12):5005-12. PMID: [20044609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20044609/).
 19. Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, Yasui W, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol*. **1998** Jan;152(1):93-100. PMID: [9422527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9422527/).
 20. Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lin MT, Kuo ML, Lin JT. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci*. **2004** Jul-Aug;11(4):517-27. doi: [10.1007/BF02256101](https://doi.org/10.1007/BF02256101). PMID: [15153787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15153787/).
 21. Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer*. **2003** Jan;39(2):184-91. doi: [10.1016/s0959-8049\(02\)00596-8](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)00596-8). Erratum in: *Eur J Cancer*. **2003** Nov;39(17):2569. PMID: [12509950](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12509950/).
 22. Marcisz-Grzanka K, Rybski S, Siwik M, Sulkowska U, Wyrwicz LS. P-341 Tumor Regression and Nodal Status to Neoadjuvant Chemotherapy as a Prognostic Marker in Patients with Locally Advanced Gastric and Gastroesophageal Cancer. *Annals of Oncology*. **2023**, 34, 134. doi: [10.1016/j.annonc.2023.04.397](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.04.397).
 23. Smyth EC, Fassan M, Cunningham D, Allum WH, Okines AF, Lampis A, Hahne JC, Rugge M, Peckitt C, Nankivell M, Langley R, Ghidini M, Braconi C, Wotherspoon A, Grabsch HI, Valeri N. Effect of Pathologic Tumor Response and Nodal Status

- on Survival in the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy Trial. *J Clin Oncol*. **2016** Aug 10;34(23):2721-7. doi: [10.1200/JCO.2015.65.7692](https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.7692). Epub 2016 Jun 13. PMID: [27298411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27298411/).
24. Athauda A, Nankivell M, Langer R, Pritchard S, Langley RE, von Loga K, Starling N, Chau I, Cunningham D, Grabsch HI. Pathological regression of primary tumour and metastatic lymph nodes following chemotherapy in resectable OG cancer: pooled analysis of two trials. *Br J Cancer*. **2023** Jun;128(11):2036-2043. doi: [10.1038/s41416-023-02217-x](https://doi.org/10.1038/s41416-023-02217-x). Epub 2023 Mar 25. PMID: [36966233](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36966233/).
25. Reim D, Novotny A, Friess H, Slotta-Huspenina J, Weichert W, Ott K, Dislich B, Lorenzen S, Becker K, Langer R. Significance of tumour regression in lymph node metastases of gastric and gastro-oesophageal junction adenocarcinomas. *J Pathol Clin Res*. **2020** Oct;6(4):263-272. doi: [10.1002/cjp2.169](https://doi.org/10.1002/cjp2.169). Epub 2020 May 13. PMID: [32401432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32401432/).
26. Ikoma N, Blum M, Estrella JS, Das P, Hofstetter WL, Fournier KF, Mansfield P, Ajani JA, Badgwell BD. Evaluation of the American Joint Committee on Cancer 8th edition staging system for gastric cancer patients after preoperative therapy. *Gastric Cancer*. 2018 Jan;21(1):74-83. doi: [10.1007/s10120-017-0743-4](https://doi.org/10.1007/s10120-017-0743-4). Epub **2017** Jun 22. PMID: [28643144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28643144/).
27. Oya Y, Hayakawa Y, Koike K. Tumor microenvironment in gastric cancers. *Cancer Sci*. **2020** Aug;111(8):2696-2707. doi: [10.1111/cas.14521](https://doi.org/10.1111/cas.14521). Epub 2020 Jul 11. PMID: [32519436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32519436/).
28. Wu, X.; Tao, P.; Zhou, Q.; Li, J.; Yu, Z.; Wang, X.; Li, J.; Li, C.; Yan, M.; Zhu, Z.; et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget* **2017**, 8, 20741–20750.
29. Kinoshita H, Hirata Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hayakawa Y, Takahashi R, Nakata W, Sakitani K, Serizawa T, Hikiba Y, Akanuma M, Shibata W, Maeda S, Koike K. Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis. *PLoS One*. **2013** Apr 12;8(4):e60914. doi: [10.1371/journal.pone.0060914](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060914). PMID: [23593346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23593346/).
30. TA, Lin EW, Tang Q, Qiao E, Waldron TJ, Soni M, Klein-Szanto AJ, Sahu V, Basu D, Ohashi S, Baba K, Giaccone ZT, Walker SR, Frank DA, Wileyto EP, Long Q, Dunagin MC, Raj A, Diehl JA, Wong KK, Bass AJ, Rustgi AK. IL-6 Mediates Cross-Talk between Tumor Cells and Activated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res*. **2018** Sep 1;78(17):4957-4970. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-17-2268](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2268). Epub 2018 Jul 5. PMID: [29976575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29976575/).
31. Ham IH, Oh HJ, Jin H, Bae CA, Jeon SM, Choi KS, Son SY, Han SU, Brekken RA, Lee D, Hur H. Targeting interleukin-6 as a strategy to overcome stroma-induced resistance to chemotherapy in gastric cancer. *Mol Cancer*. **2019** Mar 30;18(1):68. doi: [10.1186/s12943-019-0972-8](https://doi.org/10.1186/s12943-019-0972-8). PMID: [30927911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30927911/).

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI TWORZĄCYCH
ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ



Warszawa, 12.02.2024

dr n. med. Małgorzata Fuksiewicz

Samodzielna Pracownia Biomarkerów Nowotworowych i Cytokin

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5

02-781 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Palucki J, Sulkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** *Cancers* (Basel). 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tej pracy polegał na wykonaniu oznaczeń poziomu interleukin i markerów nowotworowych, nadzorze merytorycznym wykonywanych oznaczeń oraz recenzji pierwotnej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższej pracy przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższej pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.



Warszawa, 12.02.2024

lek. Mariusz Józwiak

Klinika Chirurgii Nowotworów Przewodu Pokarmowego i Guzów Neuroendokrynnych

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. Wawelska 15

01-034 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Pałucki J, Wieszczy P, Olesiński T, Józwiak M, Samsel R, Sułkowska U, Kolasińska-Ćwikła A, Wyrwicz LS. **Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial.** Neoplasma. 2022 Dec;69(6):1445-1450. doi: 10.4149/neo_2022_220720N734. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36353936.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu pracy polegał na przeprowadzeniu procedur chirurgicznych zgodnie z protokołem badania, akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższej pracy przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższej pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.



Warszawa, 12.02.2024

dr n. med. Agnieszka Kolasińska-Ćwikła

Klinika Onkologii i Radioterapii

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. Wawelska 15

01-034 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Pałucki J, Wieszczy P, Olesiński T, Józwiak M, Samsel R, Sułkowska U, Kolasińska-Ćwikła A, Wyrwicz LS. **Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial.** Neoplasma. 2022 Dec;69(6):1445-1450. doi: 10.4149/neo_2022_220720N734. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36353936.
2. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Palucki J, Sułkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** Cancers (Basel). 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tych prac polegał na nadzorze merytorycznym i recenzji pierwotnych wersji manuskryptów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższych prac przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższych prac wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

dr n. med.
Agnieszka Kolasińska-Ćwikła
specjalista medycyny klinicznej
specjalista onkologii klinicznej
3170134



Warszawa, 12.02.2024

dr hab. n. med. Beata Kotowicz, prof. NIO-PIB

Samodzielna Pracownia Biomarkerów Nowotworowych i Cytokin

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5

02-781 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Palucki J, Sulkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** *Cancers (Basel)*. 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tej pracy polegał na wykonaniu oznaczeń poziomu interleukin i markerów nowotworowych oraz recenzji pierwotnej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższej pracy przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższej pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.



Warszawa, 12.02.2024

dr hab. n. med. Maria Kowalska, prof. NIO-PIB

Samodzielna Pracownia Biomarkerów Nowotworowych i Cytokin

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5

02-781 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Palucki J, Sulkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** *Cancers (Basel)*. 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tej pracy polegał na wykonaniu oznaczeń poziomu interleukin i markerów nowotworowych oraz recenzji pierwotnej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższej pracy przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższej pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.



Warszawa, 12.02.2024

dr n. med. Małgorzata Malinowska

Zakład Patomorfologii Nowotworów

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5

02-781 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Wieszczy P, Malinowska M, Wyrwicz LS, Olesinski T. **Long-term observation of gastric patients with positive immunocytochemistry of peritoneal washing.** Neoplasma. 2022 Jan;69(1):216-223. doi: 10.4149/neo_2021_210329N417. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34881624.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu pracy polegał na wykonaniu badań patomorfologicznych, akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższej pracy przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższej pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy analizie danych, przygotowaniu manuskryptu pracy a także pełnieniu roli autora korespondencyjnego.



Warszawa, 12.02.2024

mgr Aleksandra Nowak

Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5

02-781 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Palucki J, Sulkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** *Cancers (Basel)*. 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tej pracy polegał na wykonaniu oznaczeń komórek krążących nowotworowych (CTCs).

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższej pracy przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższej pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

Aleksandra Nowak



Warszawa, 12.02.2024

dr hab. n. med. Tomasz Olesiński, prof. NIO-PIB

Klinika Chirurgii Nowotworów Przewodu Pokarmowego i Guzów Neuroendokrynych

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5

02-781 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Wieszczy P, Malinowska M, Wyrwicz LS, Olesinski T. **Long-term observation of gastric patients with positive immunocytochemistry of peritoneal washing.** Neoplasma. 2022 Jan;69(1):216-223. doi: 10.4149/neo_2021_210329N417. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34881624.
2. Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Pałucki J, Wieszczy P, Olesiński T, Jóźwiak M, Samsel R, Sułkowska U, Kolasinska-Cwikła A, Wyrwicz LS. **Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial.** Neoplasma. 2022 Dec;69(6):1445-1450. doi: 10.4149/neo_2022_220720N734. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36353936.
3. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Pałucki J, Sułkowska U, Kolasinska-Cwikła A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** Cancers (Basel). 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu prac 2 i 3 polegał na przeprowadzeniu procedur chirurgicznych zgodnie z protokołem badania, którego jestem także współautorem; w pracy 1 jestem autorem koncepcji badania, przeprowadziłem rekrutację chorych, zebrałem dane oraz byłem odpowiedzialny za analizę danych i poprawianie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższych prac przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższych prac wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań oraz przygotowaniu pierwotnych wersji manuskryptów, pełnieniu roli autora korespondencyjnego – praca 2 oraz 3 a także w analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego pracy 1.



Warszawa, 12.02.2024

dr n. med. Jakub Pałucki

Zakład Radiologii I

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5

02-781 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Pałucki J, Wieszczy P, Olesiński T, Józwiak M, Samsel R, Sułkowska U, Kolasinska-Cwikła A, Wyrwicz LS. **Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial.** Neoplasma. 2022 Dec;69(6):1445-1450. doi: 10.4149/neo_2022_220720N734. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36353936.
2. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Palucki J, Sulkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** Cancers (Basel). 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tych prac polegał na wykonaniu opisu wszystkich badań obrazowych zrekrutowanych chorych zgodnie z protokołem badania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższych prac przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższych prac wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.



JAKUB PAŁUCKI
lekarz
specjalista-radiolog
1656386



Warszawa, 12.02.2024

dr n. med. Radosław Samsel

Klinika Chirurgii Nowotworów Przewodu Pokarmowego i Guzów Neuroendokrynnych

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. Wawelska 15

01-034 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Pałucki J, Wieszczy P, Olesiński T, Józwiak M, Samsel R, Sułkowska U, Kolasińska-Ćwikła A, Wyrwicz LS. **Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial.** Neoplasma. 2022 Dec;69(6):1445-1450. doi: 10.4149/neo_2022_220720N734. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36353936.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu pracy polegał na przeprowadzeniu procedur chirurgicznych zgodnie z protokołem badania, akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższej pracy przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższej pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.



Dr n. med. Radosław Samsel
Specjalista chirurgii
ogólnej i onkologicznej
3719956



Warszawa, 12.02.2024

dr n. med. Urszula Sulkowska

Krajowy Rejestr Nowotworów

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. Wawelska 15B

01-034 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Pałucki J, Wieszczy P, Olesiński T, Józwiak M, Samsel R, Sułkowska U, Kolasinska-Cwikła A, Wyrwicz LS. **Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial.** Neoplasma. 2022 Dec;69(6):1445-1450. doi: 10.4149/neo_2022_220720N734. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36353936.
2. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Pałucki J, Sulkowska U, Kolasinska-Cwikła A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** Cancers (Basel). 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tych prac polegał na dostarczeniu danych epidemiologicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższych prac przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższych prac wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.



Warszawa, 12.02.2024

dr n. med. Andrzej Tysarowski

Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5

02-781 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Palucki J, Sulkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** *Cancers* (Basel). 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tej pracy polegał na nadzorze merytorycznym metodologii oznaczeń komórek krążących nowotworowych (CTCs) oraz recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższej pracy przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższej pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

KIEROWNIK
ZAKŁADU DIAGNOSTYKI GENETYCZNEJ
I MOLEKULARNEJ NOWOTWORÓW
Narodowego Instytutu Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie -
Państwowego Instytutu Badawczego
Dr n. med. Andrzej Tysarowski



CENTRUM MEDYCZNE
KSZTAŁCENIA
PODYPLOMOWEGO

Warszawa, 12.02.2024

dr n. med. Paulina Wieszczy-Szczepanik
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego
Katedra i Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej
ul. Marymoncka 99/103
01-813 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Wieszczy P, Malinowska M, Wyrwicz LS, Olesinski T. **Long-term observation of gastric patients with positive immunocytochemistry of peritoneal washing.** Neoplasma. 2022 Jan;69(1):216-223. doi: 10.4149/neo_2021_210329N417. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34881624.
2. Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Pałucki J, Wieszczy P, Olesiński T, Józwiak M, Samsel R, Sułkowska U, Kolasińska-Ćwikła A, Wyrwicz LS. **Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial.** Neoplasma. 2022 Dec;69(6):1445-1450. doi: 10.4149/neo_2022_220720N734. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36353936.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tych prac polegał na wykonaniu obliczeń statystycznych, przygotowaniu części statystycznej manuskryptów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższych prac przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższych prac wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania, protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego pracy 2 a także analizie danych, przygotowaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego pracy 1.



Warszawa, 12.02.2024

dr n. med. Mariola Winiarek

Klinika Onkologii i Radioterapii

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. Wawelska 15

01-034 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Pałucki J, Wieszczy P, Olesiński T, Józwiak M, Samsel R, Sułkowska U, Kolasieńska-Ćwikła A, Wyrwicz LS. **Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial.** Neoplasma. 2022 Dec;69(6):1445-1450. doi: 10.4149/neo_2022_220720N734. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36353936.
2. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Pałucki J, Sułkowska U, Kolasinska-Cwikla A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** Cancers (Basel). 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tych prac polegał na rekrutacji chorych, zbieraniu danych, akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższych prac przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższych prac wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania/protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

dr n. med. Mariola Winiarek
Lekarz
Specjalista onkologii klinicznej
2583786



**Narodowy
Instytut
Onkologii**

im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy

Warszawa, 12.02.2024

prof. dr hab. n. med. Lucjan S. Wyrwicz

Klinika Onkologii i Radioterapii

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy

ul. Wawelska 15

01-034 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki:

1. Marcisz-Grzanka K, Wieszczy P, Malinowska M, Wyrwicz LS, Olesinski T. **Long-term observation of gastric patients with positive immunocytochemistry of peritoneal washing.** Neoplasma. 2022 Jan;69(1):216-223. doi: 10.4149/neo_2021_210329N417. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34881624.
2. Marcisz-Grzanka K, Winiarek M, Pałucki J, Wieszczy P, Olesiński T, Jóźwiak M, Samsel R, Sułkowska U, Kolasinska-Cwikła A, Wyrwicz LS. **Safety and efficacy of the FLOT regimen in the Polish population - an analysis of the prospective trial.** Neoplasma. 2022 Dec;69(6):1445-1450. doi: 10.4149/neo_2022_220720N734. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36353936.
3. Marcisz-Grzanka K, Kotowicz B, Nowak A, Winiarek M, Fuksiewicz M, Kowalska M, Tysarowski A, Olesinski T, Pałucki J, Sułkowska U, Kolasinska-Cwikła A, Wyrwicz LS. **Interleukin-6 as a Predictive Factor of Pathological Response to FLOT Regimen Systemic Treatment in Locally Advanced Gastroesophageal Junction or Gastric Cancer Patients.** Cancers (Basel). 2024 Feb 12;16(4):757. doi: 10.3390/cancers16040757. PMID: 38398148.

oświadczam, iż mój udział w powstaniu tych prac polegał na nadzorze merytorycznym, redagowaniu protokołu badania, recenzji pierwotnych wersji manuskryptów, pełnieniu roli drugiego autora korespondencyjnego pracy 2 i 3.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie powyższych prac przez lek. Katarzynę Marcisz-Grzankę jako elementów rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część powyższych prac wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Marcisz-Grzanki przy opracowywaniu koncepcji badania, protokołu badania, dokumentów do Komisji Bioetycznej NIO-PIB, rekrutacji chorych, zbieraniu danych, opracowywaniu i analizie wyników badań, przygotowaniu manuskryptu oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego pracy 2 i 3 a także analizie danych, przygotowaniu manuskryptu i pełnieniu roli autora korespondencyjnego pracy 1.

prof. dr hab. Lucjan Wyrwicz
spec. onkologii klinicznej
spec. radioterapii onkologicznej
1989328

