

Analiza mikrośrodowiska guza oraz parametrów laboratoryjnych jako potencjalnych czynników prognostycznych u pacjentów chorych na raka wątrobowokomórkowego.

Streszczenie

Rak wątrobowokomórkowy (hepatocellular carcinoman, HCC) należy do najczęściej diagnozowanych nowotworów i jest czwartą przyczyną zgonów z przyczyn onkologicznych (Globoscan 2020ⁱ). Częstość występowania HCC różni się w istotny sposób geograficznie – najczęściej choroba jest diagnozowana w Azji oraz Afryce, co ma związek z zakażeniami wirusami hepatotropowymi HCV oraz HBV (Ferlay et al. 2015ⁱⁱ). Obecnie przewiduje się, że w krajach Europy Zachodniej można spodziewać się wzrostu zapadalności. Pomimo ogólnego postępu w medycynie i opiece onkologicznej, rokowania pacjentów chorujących na HCC pozostają poważne. Terapia HCC może przebiegać w różny sposób, w zależności od stopnia zaawansowania choroby. Rekomendacje European Society for Medical Oncology w ostatnich latach były kilkakrotnie aktualizowane, w związku z pojawiającymi się nowymi opcjami terapeutycznymi.

Rekomendacje leczenia HCC w zależności od zaawansowania choroby.

Obecne rekomendacje zwracają uwagę na podział choroby wynikający z jej zaawansowania na podstawie skali Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC. Bardzo wczesna choroba (stopień 0), charakteryzuje się obecnością pojedynczego guza mniejszego niż 2cm, zachowaną funkcją wątroby (Child-Pugh A) oraz dobrym stanem klinicznym pacjenta (performance status, PS 0). Wczesny etap (BCLC A) jest definiowany jako obecność pojedynczego guza albo 3 zmian do 3 cm, częściowo upośledzona funkcja wątroby (Child-Pugh A-B) oraz dobry stan ogólny. Natomiast choroba o pośrednim zaawansowaniu (BCLC B) jest diagnozowana przy obecności licznych zmian w wątrobie i jednocześnie nadal zachowanej częściowej funkcji wątroby i dobrym stanie pacjenta. O chorobie zaawansowanej (BCLC C) można mówić, jeśli stwierdzane są zmiany przerzutowe poza wątrobą oraz inwazja układu wrotnego; stan pacjenta nadal powinien być dość dobry (PS 1-2). Ciężkie upośledzenie funkcji wątroby (Child Pugh C) oraz gorszy stan ogólny pacjenta (PS 3-4) są wykładnikami terminalnego etapu choroby (BCLC D) (Pons et a. 2005ⁱⁱⁱ).

W zależności od stopnia zaawansowania choroby, pacjenci powinni być kwalifikowani do różnych metod terapeutycznych. Należy zauważyć, że w 2025 opublikowane zostały nowe

zalecenia ESMO, dotyczące leczenia pacjentów chorych na HCC. Zgodnie z nimi pacjenci w stadiach BCLC 0–B mogą być kwalifikowani do resekcji - zalecana u pacjentów z pojedynczym guzem >2 cm, bez nadciśnienia wrotnego, możliwa jest także u wybranych pacjentów z Child-Pugh B; ablacji (abłacja prądem o częstotliwości radiowej, radiofrequency ablation, RFA/ abłacja z wykorzystaniem mikrofal, microwave ablation, MWA), która może być alternatywą dla resekcji w BCLC 0–A, dla guzów 3–5 cm, lub jako pomost do przeszczepu. Przeszczep wątroby (liver transplantation, LT) może być rozważany jeśli spełnione są kryteria mediolańskie lub Uniwersytetu Klifornijskiego w San Francisco, UCSF. Warto zauważyć, że terapie pomostowe (transarterial chemoembolization, TACE; transarterial radioembolization, TARE; stereotactic body radiotherapy, SBRT) mogą być rozważane przy długim czasie oczekiwania. Co istotne, nie zaleca się stosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej (tyrosine kinase inhibitors, TKI) ani immunoterapii po resekcji/abłacji lub LT. Istotne zmiany w nowych rekomendacjach dotyczą leczenia systemowego w stadium zaawansowanej choroby – BCLC C. W ramach leczenia pierwszej linii zalecane schematy obejmują atezolizumab (immunoterapia anty-PD-L1, ligand receptorowy śmierci programowanej 1) w skojarzeniu z bewacyzumabem (anty-VEGF, vascular endothelial growth factor) lub durwalumab z tremelimumabem. Alternatywnie rozważyć można kamrelizumab z rivocezanibem (niezatwierdzone przez EMA, European Medicines Agency, Europejską Agencję Leków oraz FDA, Food and Drug Administration, Agencja Żywności i Leków), podwójną immunoterapię, niwolumab z ipilimumabem (anty-CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, zatwierdzone przez EMA; durwalumab lub tislelizumab w monoterapii oraz lenwatynib lub sorafenib przy przeciwwskazaniach do immunoterapii. W leczeniu drugiej linii po sorafenibie można stosować regorafenib, kabozantynib lub ramucyrumab (przy poziomie alfa-fetoproteiny, AFP ≥ 400 ng/ml), natomiast po immunoterapii lub lenwatynibie sorafenib (off-label).^{iv}

Mimo, że przeszczepienie wątroby lub resekcja są uważane za radykalne opcje leczenia, u niektórych pacjentów dochodzi do nawrotu choroby. Dlatego istnieje silna potrzeba identyfikacji czynników prognostycznych, pozwalających na dostosowanie leczenia i nadzoru onkologicznego do potrzeb pacjentów i charakterystyki nowotworu. Ponadto, w prawdopodobnie nadchodzącej erze leczenia uzupełniającego i immunoterapii, przy zastosowaniu których obserwuje się odpowiedź na leczenie u części pacjentów, kluczowe znaczenie ma identyfikacja czynników predykcyjnych.

W świetle aktualnej wiedzy uważa się, że mikrośrodowisko nowotworu odgrywa zasadniczą rolę w postępie choroby. Jednym z najważniejszych immunologicznych czynników mikrośrodowiska są makrofagi towarzyszące nowotworowi (tumor-associated macrophages, TAM). Sugeruje się, że mogą mieć one zastosowanie zarówno jako czynniki prognostyczne jak i predykcyjne.

Mikrośrodowisko guza i jego wpływ na rozwój choroby

Mikrośrodowisko (tumor microenvironment, TME) odgrywa kluczową rolę w rozwoju nowotworu. Rozwijające się w nim nieustanne procesy uszkodzenia i regeneracji hepatocytów związane są z rozwojem przewlekłego stanu zapalnego. Złożone wzajemne oddziaływania między hepatocytami a komórkami układu odpornościowego w dużym stopniu zależą od TME. Do TME należy macierz zewnątrzkomórkowa, komórki nowotworowe, fibroblasty oraz komórki układu immunologicznego. Komórki układu odporności obejmują makrofagi związane z nowotworem makrofagi (TAM), limfocyty naciekające nowotwór (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL), neutrofile związane z nowotworem (tumor associated neutrophils, TAN) i pochodzące ze szpiku kostnego komórki macierzyste (bone marrow-derived suppressor cells, BMDSC). Wszystkie te typy komórek są zdolne do uwalniania cząsteczek sygnałowych, które wywierają różnorodne skutki, takie jak wywoływanie odporności, tolerancję komórek nowotworowych i angiogenezę, wzmożoną proliferację lub zapobiegają wzrostowi guza i powstawaniu przerzutów.^{v vi}

W obrębie TME obecne są czynniki wzrostu, cytokiny, zewnątrzkomórkowe białka macierzy oraz enzymy, które mogą sprzyjać lub zapobiegać karcynogenezie. Szczególnie interesujące są TAM. TAM to komórki odpornościowe, które nie tylko są zdolne do regulacji wzrostu guza pierwotnego, ale biorą także udział w przeciwnowotworowej nabytej odpowiedzi immunologicznej, angiogenezie nowotworu i przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej.

TAM charakteryzują się ekspresją cząsteczek CD 68 (cluster of differentiation, CD68). W zależności od charakterystyki, są one dzielone na dwie główne klasy: M1 oraz M2.

M1 TAM są niezbędne do działania prozapalnego i odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Komórki te mogą być aktywowane przez cytokiny, takie jak interferon-gamma (IFN-gamma), czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF-alfa) czynnik wzrostu kolonii granulocytarno-makrofagowych (GM-CSF) lub w odpowiedzi na infekcję bakteryjną. Wytwarzanie interleukiny (IL)-12 i innych cytokin prozapalnych prowadzi do inicjacji odpowiedzi

immunologicznej zależnej od Th-1. Makrofagi M1 są również zdolne do działania cytotoksycznego przeciwko komórkom nowotworowym.^{vii}

Makrofagi M2 Makrofagi M2 są powiązane z progresją nowotworu i są częściej obserwowane w tkance HCC niż makrofagi M1. Markery makrofagów M2 obejmują CD163, CD204, CD206 i MARCO.^{viii} M2 TAM mogą być aktywowane przez IL 4, 10, 13 lub przez czynnik stymulujący kolonie makrofagów (M-CSF) i hormony glikokortykoidowe. Makrofagi podobne do M2 prezentują różne fenotypy funkcjonalne i dzielą się dalej na cztery inne typy.^{ix x xi}

Wyniki kilku badań sugerują, że ekspresja CD68 może mieć negatywną wartość prognostyczną. Z drugiej strony, część badań sugeruje, że jest to pozytywny czynnik prognostyczny. Niedawno opublikowana metaanaliza wykazała, że TAM CD68 nie są powiązane z rokowaniem pacjentów.^{xii} Dostępne dane mają jednak różne ograniczenia. Większość badań analizujących ekspresję CD68 przeprowadzono wśród pacjentów po resekcji, a tylko w 2 analizowano populacje po przeszczepieniu wątroby, przy czym wyniki jednego badania sugerowały brak wpływu na rokowania (n=206),^{xiii} podczas gdy drugie badanie sugerowało wpływ negatywny (n=88).^{xiv}

W innym opublikowanym badaniu wykazano, że TAM CD68 M1 były powiązane z indukcją ligandu programowanej śmierci 1 (PD-L1) w komórkach HCC, co sugerowało ich rolę w rozwoju nowotworu. Kiedy oceniano ekspresję PD-L1 w HCC razem z CD68, analiza przeżycia wykazała, że obecność PD-L1 na komórkach nowotworowych była skorelowana z progresją nowotworu, podczas gdy ekspresja PD-L1 na makrofagach odgrywała rolę ochronną w rokowaniu pacjentów chorych na HCC. Co więcej, w tym badaniu komórki CD68/PD-L1+ powiązano z aktywowanym mikrośrodowiskiem immunologicznym z intensywnym naciekiem limfocytów T CD8.^{xv xvi}

Cząsteczki punktów kontrolnych układu odpornościowego kontrolują odpowiedź immunologiczną. Jednym z najważniejszych wydaje się być receptor PD-1, który zazwyczaj jest indukowany na aktywowanych limfocytach T, komórkach NK (natural killer), limfocytach B i komórkach prezentujących antygen. I odwrotnie, PD-L1 jest obecny na komórkach nowotworowych, hepatocytach, komórkach gwiazdzistych wątroby, komórkach Kupffera lub komórkach sinusoidalnych wątroby.^{xvii} PD-L2 jest innym znanym ligandem PD-1, który jest obecny na komórkach dendrytycznych.

Oś PD-L1/PD-1 odgrywa ważną rolę w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wiązanie PD-1/PD-L1 prowadzi do tłumienia aktywności komórek odpornościowych przeciwko nowotworowi i rozwoju tolerancji gospodarza. Nadekspresja PD-L1 może być jednym z mechanizmów wykorzystywanych przez nowotwory do „ucieczki” z układu odpornościowego gospodarza.^{xviii xix}

Dowody z kilku badań wskazują, że u pacjentów z obecną ekspresją PD-L1 na komórkach nowotworowych lub komórkach układu odpornościowego obserwuje się większe prawdopodobieństwo osiągnięcia korzyści systemowej immunoterapii.^{xx}

Wpływ osi PD-1/PD-L1 na rokowanie i wyniki leczenia HCC oceniano w kilku badaniach. Wyniki okazały się jednak sprzeczne, a leżący u podstaw mechanizm nie jest w pełni poznany. Wykazano, że pacjenci z silną ekspresją PD-L1 i obecnością TILs mają zwykle lepsze rokowania, chociaż jeśli jednocześnie występuje mniejsza ekspresja PD-L1 i galektyny-9 oraz niski poziom CD8⁺ TIL, rokowanie może być gorsze.^{xxi} Z drugiej strony, wyniki innego badania sugerują że ekspresja PD-L1 przez komórki nowotworowe lub przez obecne w środowisku nowotworu komórki immunologiczne może być powiązana z agresywnością guza.^{xxii} Te sprzeczne wyniki wyraźnie pokazują, że potrzeba dalszych badań środowiska immunologicznego.

Ponieważ immunoterapia anty-PD-1/PD-L1 jest obecnie badana w różnych sytuacjach klinicznych u pacjentów chorujących na HCC, a dane dotyczące wpływu ekspresji PD-1/PD-L1 na rokowanie pacjenta są niespójne, zatem istotna jest ocena częstości ekspresji PD-L1 i nacieków komórek układu odpornościowego w HCC i ocena ich wartości prognostycznej lub predykcyjnej.^{xxiii xxiv}

Retrospektywna analiza czynników prognostycznych w HCC

Na podstawie powyższych danych zaprojektowano badanie, które miało na celu ocenę molekularnych oraz laboratoryjnych czynników związanych z rokowaniem pacjentów chorych na HCC.

W badaniu oceniano w korelacji do przeżycia całkowitego oraz wolnego od nawrotu choroby następujące parametry: wielkość i liczba guzów nowotworowych, metoda leczenia (resekcja/transplantacja/leczenie systemowe), status zakażenia HBV, HCV; wyjściowe parametry laboratoryjne: AFP, WBC (white blood cell), NLR (neutrophil-to-lymphocyte ratio),

PLR (platelet-to-lymphocyte ratio), ALBI (albumin-bilirubin), PALBI (platelet-albumin-bilirubin), bilirubina; ocena ekspresji PD-L1, CD68, TILs.

W pracy przeanalizowano dane ponad 227 kolejnych pacjentów chorych na HCC leczonych w ośrodku akademickim. Analizę statystyczną przeprowadzono dla populacji ogólnej oraz dla dwóch podgrup – po przeszczepieniu wątroby i po resekcji. Trzeciej analizy w grupie pacjentów kwalifikujących się do leczenia systemowego nie przeprowadzono (tych pacjentów wyłączono także z analizy populacji ogólnej ze względu na odmienną charakterystykę kliniczną). Wynikało to z faktu, że mimo oceny danych ponad 70 chorych leczonych systemowo z powodu HCC, jedynie u kilkunastu chorych dostępny był materiał histopatologiczny, co nie pozwoliło na rzetelną analizę statystyczną. Ponadto stwierdzono znaczną heterogeniczność grupy pod względem zastosowanego leczenia: 12 pacjentów otrzymywało sorafenib, 3 otrzymywało kabozantynib, 1 otrzymywał gemcytabinę z oksaliplatyną i 1 otrzymywał kwas zoledronowy.

Do ostatecznej analizy włączono 111 pacjentów spełniających kryteria włączenia: 52 po przeszczepieniu wątroby, 59 po resekcji. Osiemdziesięciu dwóch pacjentów stanowili mężczyźni, a 29 kobiety; mediana wieku wynosiła 61,7 lat. U ponad 42% (n=48) stwierdzono zakażenie HCV, a u 24% (n=28) zakażenie HBV. Większość pacjentów miała stosunkowo małe guzy (do 50 mm); u 38% pacjentów (n=44) wykryto zmiany o średnicy około 50 mm lub większej.

Mediana okresu obserwacji wyniosła 47,95 miesiąca i wahała się od 0,1 miesiąca (śmierć z powodu powikłań pooperacyjnych) do 138 miesięcy. W czasie obserwacji zdiagnozowano 52 przypadki wznowy nowotworu: 41/59 pacjentów po resekcji (69%) i 11/52 po przeszczepieniu wątroby (21%), a 45 pacjentów zmarło. Mediana czasu przeżycia wolnego od nawrotu (recurrence-free survival, RFS) wynosiła 20,5 miesiąca, a czasu przeżycia całkowitego (overall survival, OS) po leczeniu pierwotnym w przypadku nawrotu choroby 30 miesięcy.

Dodatkową analizę przeprowadzono w dwóch podgrupach: pacjentów po przeszczepieniu wątroby oraz pacjentów po resekcji.

Po jednoczynnikowej analizie statystycznej określono kilka czynników prognostycznych nawrotu raka wątrobowokomórkowego. Najważniejszymi negatywnymi czynnikami prognostycznymi w populacji ogólnej były: wielkość guza, stopień zróżnicowania i obecność

inwazji mikronaczyniowej, poziom AFP przed leczeniem oraz poziom bilirubiny. Inne czynniki to ocena wg PALBI i PLT. Ekspresję PD-L1 w tkance nowotworowej powiązano z graniczną istotną wartością $p = 0,053$. W analizie wieloczynnikowej jedynie mikroinwazja naczyń (obecna lub nieobecna), wyjściowy poziom AFP i WBC były znaczącymi negatywnymi czynnikami prognostycznymi w populacji ogólnej.

Analiza podgrup wykazała, że wśród pacjentów po przeszczepieniu wątroby wiek, wielkość guza, stopień zróżnicowania, inwazja mikronaczyniowa i ekspresja CD68 były czynnikami negatywnymi w analizie jednoczynnikowej. W analizie wieloczynnikowej statystycznie istotna okazała się inwazja mikronaczyń oraz stopień zróżnicowania. Podobnie w jednoczynnikowej analizie przeżycia całkowitego jako czynniki prognostyczne zasugerowano AFP, wielkość guza, stopień zróżnicowania i inwazję mikronaczyniową, ekspresję PD-L1 i NLR, podczas gdy w analizie wieloczynnikowej jedynie inwazja mikronaczyniowa i NLR były powiązane ze istotnością statystyczną.

Wśród pacjentów po resekcji wątroby w analizie jednoczynnikowej wykazano, że czynnikami prognostycznymi dla nawrotu choroby są jedynie wiek, AFP i WBC. Analiza wieloczynnikowa nie potwierdziła jednak istotności statystycznej. Analiza jednoczynnikowa w odniesieniu do całkowitego przeżycia sugeruje, że AFP, bilirubina i inwazja mikronaczyń są czynnikami prognostycznymi. Wyniki analizy wielu zmiennych również potwierdziły to spostrzeżenie.

Ekspresję PD-L1 potwierdzono w 4 próbkach w całej populacji. Wśród chorych po przeszczepieniu wątroby stwierdzono to u 2 osób i u obu doszło do wznowy. W jednym przypadku progresję rozpoznano po 87 miesiącach, a ekspresję PD-L1 stwierdzono w 10% komórek, w drugim przypadku wznowę rozpoznano po 10,8 miesiąca, a ekspresję PD-L1 stwierdzono w 100% komórek. Ponadto wśród pacjentów po resekcji zidentyfikowano 2 inne przypadki ekspresji PD-L1: u pierwszego pacjenta potwierdzono ekspresję PD-L1 w 5% komórek nowotworowych i zmarł on z powodu nawrotu choroby 14,75 miesiąca po operacji; u drugiego pacjenta ekspresja ta wynosiła 10%, a 24 miesiące po operacji stwierdzono wznowę. Pacjent zmarł 3 miesiące od rozpoznania wznowy. Mała liczba pacjentów, u których stwierdzono ekspresję PD-L1 powoduje, że należy zachować ostrożność w interpretacji tej obserwacji, chociaż w analizie statystycznej nie wiązało się to z istotnie zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby ($p=0,053$) lub zgonu. Jedynie w analizie jednoczynnikowej

zasugerowano ją, jako negatywny czynnik prognostyczny u chorych po przeszczepieniu wątroby.

Ekspresję PD-L1 wykryto także na makrofagach towarzyszących nowotworowi (TAM) i/lub limfocytach naciekających guz (TIL) u 55 pacjentów: 17 pacjentów po przeszczepieniu wątroby i 31 po resekcji, w tym 8 leczonych później systemowo. Nie miało to jednak związku z rokowaniem w żadnej z podgrup pacjentów.

We wszystkich próbkach tkanek przeprowadzono barwienie CD68, a obecność makrofagów towarzyszących nowotworowi CD68 potwierdzono w 62 przypadkach w zakresie od 5% do 40%. Analiza wykazała, że CD68 nie wiązało się z ryzykiem nawrotu HCC.

Limfocyty naciekające guz (TIL) zaobserwowano w 19 przypadkach. Obecność TIL nie była związana z rokowaniem w żadnej z podgrup ani w populacji ogólnej.

Zgodnie z wynikami analizy jednoczynnikowej w populacji pacjentów chorych na raka wątrobowokomórkowego, poziom PLT należał również do czynników prognostycznych. Z tego względu przeprowadzono meta-analizę i przegląd systematyczny, które stały się podstawą czwartej publikacji w cyklu. Celem pracy było zbadanie wpływu trombocytopenii na przeżycie pacjentów z rozpoznaniem raka wątrobowokomórkowego oraz ocena związku liczby płytek krwi z cechami kliniczno-patologicznymi nowotworu. W ramach pracy przeprowadzono systematyczny przegląd literatury i metaanalizę zgodnie z wytycznymi PRISMA, przeszukano bazy: PubMed, Web of Science i Scopus. Na podstawie wyszukiwania zidentyfikowano 26 badań (łącznie 9403 pacjentów), które spełniały określone kryteria wyszukiwania. Analizowano współczynniki hazardu (HR) dla przeżycia całkowitego (OS) w zależności od liczby płytek krwi. Przeprowadzone analizy wskazują, że trombocytopenia ($<100 \times 10^9/L$) była związana z gorszym przeżyciem całkowitym: HR (model efektów losowych) = 1.30 (95% CI: 1.05–1.63), HR (model wieloczynnikowy) = 1.47 (95% CI: 1.15–1.86). W grupie leczonej z zamiarem radykalnym (np. resekcja, RFA) HR = 1.62 (95% CI: 1.25–2.11), natomiast w grupie leczonej paliatywnie (np. TACE, leczenie systemowe) HR = 0.81 (95% CI: 0.62–1.05) – co sugeruje możliwy odwrotny trend. Ponadto niska liczba płytek była częstsza u pacjentów z mniejszymi guzami i marskością wątroby, natomiast wyższe wartości PLT korelowały z większymi guzami i mniejszą częstością marskości. Wskazuje to na możliwy udział płytek krwi i ich mediatorów (np. czynnik wzrostu płytek krwi, platelet-derived growth factor, PDGF, serotoniny) w progresji HCC. Liczba płytek krwi

może być użytecznym, łatwo dostępnym markerem prognostycznym u pacjentów chorych na HCC, szczególnie w leczeniu radykalnym. Niemniej, potrzebne są dalsze badania prospektywne, szczególnie w grupach leczonych systemowo, z uwzględnieniem dokładnych kryteriów włączenia.

ⁱ Globocan. 2020 Available online: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/live-new.asp>

ⁱⁱ Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.

ⁱⁱⁱ Pons F, Varela M, Llovet JM. Staging systems in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*. 2005;7(1):35–41. <https://doi.org/10.1080/13651820410024058>.

^{iv} Vogel A, Chan SL, Dawson LA, Kelley RK, Llovet JM, Meyer T, Ricke J, Rimassa L, Sapisochin G, Vilgrain V, Zucman-Rossi J, Ducreux M; ESMO Guidelines Committee. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2025 May;36(5):491-506. doi: 10.1016/j.annonc.2025.02.006.

^v Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>.

^{vi} Sas Z, Cendrowicz E, Weinhäuser I, Rygiel TP. Tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma: challenges and opportunities for new treatment options. *Int. J. Mol. Sci*. 2022: 3778. <https://doi.org/10.3390/ijms23073778>.

^{vii} Martinez FO, Gordon S. M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *Prime Rep*. 2014. <https://doi.org/10.12703/P6-13>

^{viii} Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A et al. Tumor-associated macrophages in human breast, colorectal, lung, ovarian and prostate cancers. *Front. Oncol*. 2020: 566511. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.566511>

^{ix} Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell. Signal*. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.004>

^x Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol*. 2009. <https://doi.org/10.1189/jlb.0609385>.

^{xi} Zhang Q, Sioud M. Tumor-Associated Macrophage Subsets: Shaping Polarization and Targeting. *Int. J. Mol. Sci*. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24087493>.

-
- ^{xii} Zhang J, Chang L, Zhang X, Zhou Z, Gao Y. Meta-Analysis of the Prognostic and Clinical Value of Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma. *J Invest Surg.* 2021 Mar;34(3):297-306. doi: 10.1080/08941939.2019.1631411
- ^{xiii} Gao Q, Zhou J, Wang XY, et al. Infiltrating memory/senescent T cell ratio predicts extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(2):455-66
- ^{xiv} Atanasov G, Dino K, Schierle K, et al. Recipient Hepatic Tumor-Associated Immunologic Infiltrates Predict Outcomes After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. *Ann Transplant.* 2020 13;25:e919414
- ^{xv} Zong Z, Zou J, Mao R, et al. M1 Macrophages Induce PD-L1 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells Through IL-1 β Signaling. *Front Immunol.* 2019;10:1643
- ^{xvi} Liu CQ, Xu J, Zhou ZG, et al. Expression patterns of programmed death ligand 1 correlate with different microenvironments and patient prognosis in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2018;119(1):80-88
- ^{xvii} Wang BJ, Bao JJ, Wang JZ, Wang Y, Jiang M, Xing MY, Zhang WG, Qi JY, Roggendorf M, Lu MJ and Yang DL: Immunostaining of PD-1/PD-Ls in liver tissues of patients with hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 17: 3322-3329, 2011.
- ^{xviii} Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
- ^{xix} Kudo M. Immune checkpoint inhibition in hepatocellular carcinoma: basics and ongoing clinical trials. *Oncology.* 2017;92(Suppl 1):50.
- ^{xx} Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, et al: Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 372: 2018-2028, 2015.
- ^{xx} Lin H, Wei S, Hurt EM, Green MD, Zhao L, Vatan L, Szeliga W, Herbst R, Harms PW, Fecher LA, et al: Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest* 128: 805-815, 2018.
- ^{xxi} Sideras K, Biermann K, Verheij J, Takkenberg BR, Mancham S, Hansen BE, Schutz HM, de Man RA, Sprengers D, Buschow SI, et al: PD-L1, Galectin-9 and CD8⁺ tumor-infiltrating

lymphocytes are associated with survival in hepatocellular carcinoma. *OncoImmunology* 6: e1273309, 2017

^{xxii} Calderaro J, Rousseau B, Amaddeo G, Mercey M, Charpy C, Costentin C, Luciani A, Zafrani ES, Laurent A, Azoulay D, et al: Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: Relationship With clinical and pathological features. *Hepatology* 64: 2038-2046, 2016

^{xxiii} Kan G, Dong W. The expression of PD-L1, APE1 and P53 in hepatocellular carcinoma and its relationship to clinical pathology. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(16):3063–71.

^{xxiv} Sideras K, Biermann K, Verheij J, et al. PD-L1, galectin-9 and CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes are associated with survival in hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology.* 2017;6(2):e1273309.