

Streszczenie

Tytuł: „Związek wariantów genetycznych receptora śmierci programowej 1 (PD-1) z ryzykiem wystąpienia oraz przebiegiem klinicznym raka jelita grubego”

Wstęp: Częstość zachorowania na nowotwory jelita grubego wykazuje obecnie tendencję wzrostową a niewielki odsetek (do 5%) uwarunkowań genetycznych pozwala sądzić, iż światowy trend będzie się utrzymywał. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w ciągu następnych dwóch dekad, częstość występowania tych nowotworów wzrośnie o 70%. Na świecie w każdym roku wykrywanych jest około 1 400 000 nowych przypadków raka jelita grubego. Liczba ta stanowi 9,7% wszystkich nowotworów, co plasuje tę grupę schorzeń na trzecim miejscu, pod względem częstości występowania. Z roku na rok obserwuje się natomiast spadek śmiertelności u pacjentów z rakiem jelita grubego. Obserwowana zmiana umieralności zawdzięczana jest wielu czynnikom, między innymi: dokładniejszym usuwaniem polipów ze światła jelita grubego podczas endoskopii, wykrywaniem zmian na wczesnym etapie, bardziej efektywną terapią uzupełniającą oraz wprowadzaniem badań przesiewowych. Pomimo tego, iż chirurgia wciąż pozostaje najważniejszym elementem w leczeniu nowotworów jelita grubego, aż 30-40% pacjentów diagnozowanych jest z lokalnie zaawansowaną chorobą z zajęciem węzłów chłonnych lub zmianami metastatycznymi. Krótki czas przeżycia tych pacjentów stwarza konieczność poszukiwania nowych terapii oraz czynników prognostycznych.

W ostatnim czasie do schematów leczenia wprowadza się nowe leki, oparte o aktywację własnego układu immunologicznego (punkty kontroli immunologicznej). W przebiegu choroby nowotworowej dochodzi do znacznego upośledzenia funkcji limfocytów T i wymknięcia się komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego. Komórki nowotworowe potrafią wykształcać mechanizmy zapobiegające rozpoznaniu przez elementy układu odpornościowego w celu przeżycia. Wykazują również zdolność do modulowania własnego mikrośrodowiska. Prawidłowy nadzór immunologiczny (ang. *immunosurveillance*), pozwala na efektywnie rozpoznawanie i eliminację komórek nowotworowych na długo przed pierwszymi objawami klinicznymi. Okazuje się, że niektóre nowotwory unikają odpowiedzi układu odpornościowego poprzez aktywację i wykorzystanie punktów kontroli układu immunologicznego, takich jak PD-1, CTLA-4, GITR czy LAG-3. Wspomniane punkty kontroli działają na różnych

etapach odpowiedzi odpornościowej i regulują czas trwania oraz nasilenie aktywność limfocytów T. Szlak PD-1 reguluje aktywność limfocytów T przede wszystkim w fazie efektorowej odpowiedzi odpornościowej i może ograniczyć wpływ swoistych antygenowo limfocytów T w mikrośrodowisku nowotworu. Co istotne, komórki nowotworowe wykazują zdolność do modulowania własnego mikrośrodowiska oraz własnego fenotypu. Nieprawidłowa ekspresja i/lub funkcja cząsteczki PD-1 może być wynikiem polimorfizmów genu kodującego to białko.

Gen *PDCDI*, kodujący supresorową cząsteczkę PD-1, zlokalizowany jest w miejscu 2q37.3. Do tej pory udało się zidentyfikować jego kilka wariantów polimorficznych, których obecność może mieć znaczący wpływ na cały szlak PD-1/PD-L1. Do najczęściej badanych należą: PD-1.1 (rs36084323), PD-1.3 (rs11568821), PD-1.5 (rs2227981), PD-1.9 (rs2227982). Niektóre warianty genetyczne mogą okazać się istotne, co może mieć znaczący klinicznie wpływ na działanie hemostazy prawidłowego cyklu komórkowego.

Tak więc określenie genetycznych predyspozycji do zachorowania na choroby nowotworowe ma istotne znaczenie dla wczesnego wykrywania, monitorowania i określania grup ryzyka rozwoju choroby. Ponadto, z uwagi na fakt, iż rozwój i przebieg raka jelita grubego uwarunkowany jest wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, a w podłożu genetycznym wyróżnić należy czynniki warunkujące predyspozycję do choroby oraz czynniki modyfikujące jej przebieg kliniczny, określenie tych czynników może przynieść istotny postęp w diagnostyce i profilaktyce choroby.

Cel pracy: Zbadanie związku wybranych polimorfizmów genu *PD-1* z ryzykiem zachorowania i przebiegiem klinicznym raka jelita grubego, a także określenie częstości występowania poszczególnych wariantów genetycznych w wybranych miejscach polimorficznych w obrębie badanego genu w populacji Polskiej. Badano następujące miejsca polimorficzne: PD-1.1 (rs36084323, -606G>A), PD-1.3 (rs11568821, +7146G>A) oraz PD-1.5 (rs2227981, +7785C>T).

Materiał i metody: Badania genetyczne przeprowadzono na grupie 204 pacjentów leczonych operacyjnie w dwóch ośrodkach Wrocławskich: w II Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego oraz na II Oddziale Chirurgii Onkologicznej Dolnośląskiego Centrum Onkologii. Dane zbierano prospektywnie od lipca 2012 roku do listopada 2015. U wszystkich został potwierdzony gruczolakorak jelita grubego. Grupę pacjentów stanowili chorzy w wieku od 30 do 93 lat (średnia: 65,6±10,9). W badanej populacji w większości byli mężczyźni, n=120 (58,8%). Grupę kontrolną do badań genetycznych stanowiło 276

niespokrewnionych osób zdrowych dobranych pod względem wieku do grupy pacjentów, u których w dniu rekrutacji do badania nie stwierdzono w wywiadzie chorób onkologicznych oraz autoimmunologicznych. Wśród osób zdrowych włączonych do badania kobiety stanowiły 45,3% (n=125), natomiast mężczyźni 54,7% (n=151). Badania genetyczne przeprowadzono w Laboratorium Immunopatologii Zakładu Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Materiał biologiczny do badań genetycznych stanowiła krew pobrana jałowo z dołu łokciowego. Ocenę jakościową i ilościową wyizolowanego DNA wykonano spektrofotometrycznie oraz elektroforetycznie.

Wyniki: Rozpatrując ryzyko wystąpienia nowotworów jelita grubego w kontekście polimorfizmów genu kodującego PD-1, nie wykazano istotności statystycznej w przypadku PD-1.1 oraz PD-1.3. Natomiast genotyp PD-1.5 [TT] zwiększał 2,05-krotnie, a allel [T] 1,42-krotnie to ryzyko. Obecność jednej lub dwóch kopii allelu [T] (genotyp [CT] oraz [TT]) istotnie statystycznie wpływał na ryzyko choroby zwiększając je w stosunku do grupy kontrolnej 1,61-krotnie. Po podziale grupy badanej i kontrolnej ze względu na płeć, zaobserwowano znaczące różnice pomiędzy nimi. Obecność jednej oraz dwóch kopii allelu PD-1.3 [G] związane było ze zwiększoną zachorowalnością na RJG wśród kobiet, natomiast w przypadku mężczyzn podobne wyniki zaobserwowano w przypadku genotypu PD-1.5 [TT] i allelu PD-1.5 [T].

W dalszej części analizy badano wpływ polimorfizmów na przebieg kliniczny. Częstość genotypu PD-1.5[TT] była istotnie statystycznie najwyższa w grupie chorych z niską złośliwością histologiczną komórek nowotworowych. Genotyp PD-1.5[TT] okazał się czynnikiem ryzyka i występował istotnie statystycznie częściej u pacjentów w III oraz IV stopniu zaawansowania klinicznego choroby (wg TNM). Pojedynczy allel [T] również obserwowany był najczęściej w tej grupie chorych w porównaniu ze stanem zaawansowania I i II oraz do grupy kontrolnej. W przypadku analizy wpływu polimorfizmu genu kodującego PD-1 na lokalizację zmiany pierwotnej wykazano, iż genotyp PD-1.1[AA] obserwowany był jedynie w grupie pacjentów, ze zmianą zlokalizowaną po stronie lewej. Ponadto, w grupie pacjentów, u których zmiana pierwotna zlokalizowana była po stronie prawej obserwowano jedynie genotyp PD-1.1[GG]. Pacjenci posiadający genotyp PD-1.5[TT] znacznie częściej niż w grupie kontrolnej mieli stwierdzono zmianę pierwotną zlokalizowaną w prawej okrężnicy. Podobnie występowanie pojedynczego allela [T] stanowiło czynnik ryzyka wystąpienia zmiany w tej lokalizacji. Niezależnymi

czynnikami wpływającymi na długość życia pacjentów są: wiek, obecność dwóch kopii allelu PD-1.1G (genotyp GG), stopień zaawansowania klinicznego, ASA.

Podsumowanie i wnioski: Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, iż badane warianty polimorficzne zaangażowane są w etiopatogenezę raka jelita grubego. Podkreślić należy, iż uzyskane przez nas wyniki wskazują, że zarówno predyspozycja do choroby jak i jej przebieg kliniczny zależny jest od płci badanych osób. Ponadto wyselekcjonowany do badań polimorfizm PD-1.1 był istotnym czynnikiem, który wraz z wiekiem, stopniem zaawansowania klinicznego jak i ASA, istotnie determinował długość życia pacjentów.

Summary

Title: „The correlation between programmed death receptor 1 (PD-1) polymorphisms with the risk and clinical course of the colorectal cancer”.

Introduction: The incidence of the colorectal cancer currently shows an upwards trend and only a small percentage (up to 5%) of genetic background of this disease may suggest that this global trend will continue to grow. According to the World Health Organization (WHO), over the next two decades, the incidence of these cancers will increase by 70%. Approximately 1,400,000 new cases of colorectal cancer are being detected in the world every year. And this constitutes of 9.7% of all tumors, which places this group of diseases in third place in terms of incidence. However, there is a noticeable decrease in mortality in patients with colorectal cancer on a yearly basis. This could be due to many factors, including: better colonic polyps' detection and removal from the bowel during colonoscopy, making a proper diagnosis at earlier stages of the disease, more accurate adjuvant therapy and introduction of screening programs. Even though surgery is still the most paramount part of the colorectal cancer treatment, as many as 30-40% of patients are diagnosed with locally advanced disease with lymph nodes involvement or metastatic deposits. The short survival time of these patients makes it necessary to look for new therapies and prognostic factors.

Recently, new medications have been introduced to the treatment regimens based on the activation of the immune system (immune checkpoints). As the disease proceeds there is a significant impairment of the lymphocytes T function and the escape of the tumor cells from the immune surveillance. Cancer cells can develop mechanisms to prevent the host immune system from recognizing them and demonstrate the ability to modulate their own microenvironment. Immunosurveillance allows effective recognition and elimination of cancer cells long before the first clinical symptoms appear. Some tumor types may avoid the immune system response by activation and usage of immune checkpoints such as PD-1, CTLA-4, GITR or LAG-3. These control points affect various immune system response stages and regulate the duration and severity of T cells activation. The PD-1 pathway regulates T cell activity primarily in the effector phase of the immune response and can reduce the antigen-specific T lymphocytes effect in the tumor microenvironment. Cancer cells can modulate their own microenvironment and their own

phenotype. Abnormal expression and / or function of the PD-1 molecule may be the result of polymorphisms of the gene encoding this protein.

The PDCD1 gene, encoding the suppressor PD-1 molecule is located at 2q37.3 region. Several polymorphisms have been already identified, the presence of which may have a significant impact on the entire PD-1 / PD-L1 pathway. The most investigated are: PD-1.1 (rs36084323), PD-1.3 (rs11568821), PD-1.5 (rs2227981), PD-1.9 (rs2227982). Some of these genetic variants may be clinically important which could affect any cell cycle hemostasis.

Hence, determining the genetic predisposition to cancer is paramount for the early diagnosis, monitoring and define the risk groups for cancer development. In addition, since the development and clinical course of colorectal cancer is conditioned by genetic and environmental factors, and the genetic background of the disease must be distinguished between predisposing factors and those affecting its clinical course, determination of those factors may bring significant progress in diagnosis and prevention.

Aim: To investigate the association of selected PD-1 gene polymorphisms with the risk and clinical course of colorectal cancer, as well as to determine the frequency of occurrence of individual genetic variants at selected polymorphic sites within the studied gene in the Polish population. The following polymorphic sites were examined: PD-1.1 (rs36084323, -606G> A), PD-1.3 (rs11568821, + 7146G> A) and PD-1.5 (rs2227981, + 7785C> T).

Material and methods: Genetic research were carried out on 204 patients operated on in two centers in Wrocław: at General and Oncological Surgery Department in the Medical University Hospital and at the Second Department of Oncological Surgery in Lower Silesian Comprehensive Cancer Center. Data was collected prospectively from July 2012 to November 2015. Colorectal adenocarcinoma was confirmed in all enrolled individuals. Patients age ranged from 30 to 93 years (mean 65.6 ± 10.9). The group consisted of 120 men (58.8%) and 84 (41.2%) women. The control group for genetic testing consisted of 276 unrelated, healthy subjects matched with age to the group of patients. They have no medical history of any oncological nor autoimmune disease at the time of recruitment. Among the control group included in the study, women accounted for 45.3% (n = 125), while men accounted for 54.7% (n = 151). Genetic tests were carried out in the laboratory at the Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy of the Polish Academy of Science in Wrocław.

The biological material for genetic tests was a blood sample taken from the cubital fossa. The qualitative and quantitative evaluation of the isolated DNA was performed spectrophotometrically and electrophoretically.

Results: Considering the risk of colorectal cancer in the context of PD-1 gene polymorphisms, no statistical significance was demonstrated for PD-1.1 and PD-1.3. However, the PD-1.5 genotype [TT] and allele [T] increased the overall risk respectively by 2.05 and 1.42-fold. The presence of one or two copies of the [T] allele (genotype [CT] and [TT]) statistically affected the risk of the disease, increasing it comparing to the control group 1.61-fold. Comparing patients and control group by the gender, significant differences were observed between them. The presence of one and two copies of the PD-1.3 allele [G] was associated with an increased incidence of colorectal cancer among women, while in men subgroup, similar results were noted in the PD-1.5 [TT] genotype and the PD-1.5 [T] allele.

In the further analysis, the influence of polymorphisms on clinical course was assessed. The frequency of the PD-1.5 genotype [TT] was statistically the highest in the group of patients with a well differentiated tumor (low grade). The PD-1.5 genotype was also a risk factor and appeared more frequently in patients with the III and IV stage disease (according to the TNM staging classification). Same observation was made with the single [T] allele comparing to the patients at I and II stage and with the control group. We have also assessed the PD-1 polymorphisms according the localization of the primary lesion. Analysis showed the PD-1.1 genotype [AA] was only seen in the patient's group with the colorectal cancer at the left side of the bowel. Moreover, in the group of patients with the primary lesion originating from the right colon, only PD-1.1 [GG] genotype was observed. PD-1.5 [TT] genotype and single allele [T] was a risk factor for a right sided colonic cancer.

Independent factors affecting the patient's life expectancy were: age, presence of two copies of the PD-1.1 [G] allele (genotype [GG]), clinical stage and ASA score.

Conclusion: Results obtained in our study clearly indicate that analyzed polymorphisms are involved in the etiopathogenesis of the colorectal cancer. It should be emphasized that our results show both: the predisposition to the disease and its clinical course is strongly related to the gender of the assessed individual. Moreover, the PD-1.1 polymorphism selected for the study was an important factor that along with age, clinical stage and ASA score, significantly determined the patients' life expectancy.