

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Katarzyna Dyląg-Trojanowska.

Promotor: prof. dr hab. Antoni Szczepanik, prof. UJ

Promotor pomocniczy: dr Radosław Pach

Temat pracy doktorskiej: „*Studies on the usefulness of identification of disseminated tumor cells (DTC) in the bone marrow and some parameters of the immune system in patients with colorectal cancer located in the left half of the colon and in the rectum*” – cykl publikacji

(„*Badania nad przydatnością oznaczania rozsianych komórek nowotworowych (DTC) w szpiku kostnym i niektórych parametrów układu odpornościowego u chorych na raka jelita grubego zlokalizowanego w lewej połowie okrężnicy i w odbytnicy*”)

Wprowadzenie

Rak jelita grubego (CRC) jest najczęstszym nowotworem przewodu pokarmowego, zajmuje trzecie miejsce pod względem zachorowalności oraz jest drugą przyczyną zgonu z powodu chorób nowotworowych na świecie.

Mimo radykalnego zabiegu chirurgicznego i leczenia uzupełniającego u 25-50 % pacjentów w stopniu II i III dochodzi do nawrotu choroby w wyniku niewykrytego rozsiewu komórek nowotworowych.

Obecna wiedza na temat raka jelita grubego (CRC) identyfikuje immunogenność guza jako jedną z ważniejszych kwestii.

W przypadku nowotworu warunkiem aktywacji układu odpornościowego jest prezentacja epitopów antygeny związanego z nowotworem (TAA) komórkom immunokompetentnym. HLA-A2 jest jednym z antygenów, w kontekście których prezentowane są TAA, ale dane na temat możliwego wpływu ekspresji antygeny HLA-A2 na przeżycie pacjentów z rakiem jelita grubego są rzadkie, a czasem sprzeczne.

Limfocyty T regulatorowe (Treg) są jedną z podgrup limfocytów T zaangażowanych w interakcję między nowotworem a układem odpornościowym gospodarza i mogą osłabiać przeciwnowotworową reakcję immunologiczną. Wykazano, że poziom Treg zwiększa się we krwi obwodowej pacjentów z różnymi nowotworami. Prognostyczne znaczenie limfocytów Treg w nowotworze jelita grubego pozostaje kontrowersyjne.

Rozproszone komórki nowotworowe (DTC) to podzbiór krążących komórek nowotworowych, które migrowały do szpiku kostnego.

Wcześniejsze badania nie uwzględniały różnic wynikających z heterogenności raka jelita grubego związanej z jego lokalizacją.

Immunoterapia jest nie do końca wykorzystanym elementem leczenia rak jelita grubego zwłaszcza w jego lewostronnej lokalizacji. Pogłębienie badań mających na celu ocenę mechanizmów odporności przeciwnowotworowej u chorych po potencjalnie radykalnym leczeniu operacyjnym może pozwolić na określenie miejsca immunoterapii także w tych przypadkach.

Cel

Celem pracy opartej na 3 oryginalnych publikacjach było pogłębienie wiedzy na temat wybranych aspektów reakcji układu immunologicznego na nowotwór u chorych na raka lewej połowy jelita grubego i odbytnicy oraz ocena ich wpływu na przebieg kliniczny choroby u tych pacjentów. Analizowano związek między obecnością DTC w szpiku kostnym a charakterystyką guza nowotworowego oraz długoterminowymi wynikami leczenia chorych, zbadano wpływ ekspresji HLA-A2 na komórkach somatycznych i ilości limfocytów T regulatorowych w krwi obwodowej u pacjentów z lewostronną lokalizacją raka jelita grubego w różnych stadiach choroby na przeżycie odległe.

Metodyka

Badanie miało charakter analizy retrospektywnej opartej o prospektywnie gromadzoną bazę danych. Do badania włączono 109 chorych operowanych z powodu raka jelita grubego w okresie od 07.2007 do 06.2012 roku w I Klinice Chirurgii Ogólnej, Onkologicznej i Gastroenterologicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Pacjentom, po uzyskaniu ich pisemnej zgody na udział w badaniu klinicznym, przed planowym zabiegiem operacyjnym pobierano do analizy szpik kostny i krew obwodową.

Status DTC szpiku kostnego analizowano u 91 pacjentów, HLAA2 określono u 58 pacjentów, poziom regulacyjnych limfocytów T u 94 pacjentów i 21 zdrowych ochotników z grupy kontrolnej.

Wyniki

DTC w szpiku kostnym zdiagnozowano u 42 pacjentów (46,1%). Występowanie DTC w szpiku kostnym nie było związane z głębokością naciekania guza, zajęciem węzłów chłonnych, odległymi przerzutami, stopniem złośliwości histopatologicznej ani lokalizacją pierwotnego guza. Całkowite 5-letnie przeżycie w grupie z obecnymi DTC wyniosło 59,5%, a u pacjentów bez DTC 53% ($p = 0,190$). Widoczny był trend sprzyjający dłuższemu przeżyciu u pacjentów z DTC w szpiku kostnym, zarówno gdy analizowano pacjentów z chorobą w stadium II i III razem jak i osobno dla stadium II i III. Odległe przerzuty metachroniczne były znacznie rzadsze u pacjentów z obecnością DTC w szpiku kostnym ($p=0,0375$).

Obecność antygeny HLA-A2 stwierdzono u 56% pacjentów z lewostronną lokalizacją raka okrężnicy i odbytnicy. W grupie badanej pacjenci z ekspresją HLA-A2 żyli statystycznie dłużej niż pacjenci bez HLA-A2 ($p = 0,027$). Różnica w pięcioletnim przeżyciu między grupami HLA-A2(+) i HLA-A2(-) w grupie z II i III stopniem zaawansowania choroby chorych z lewostronnym CRC nie była istotna statystycznie. Jednak proporcjonalny model ryzyka Coxa wykazał, że brak ekspresji HLA-A2 był negatywnym czynnikiem prognostycznym w grupie pacjentów operowanych radykalnie bez odległych przerzutów.

Różnica między ilością limfocytów Treg w I i II stopniu TNM była istotna statystycznie ($p = 0,047$). Liczba limfocytów Treg w całej grupie badanej była znacznie niższa niż w grupie kontrolnej ($p = 0,008$) i pomiędzy pacjentami w stadiach II i III a grupą kontrolną ($p = 0,003$ i $p = 0,018$). Grupa pacjentów pT3 + pT4 również miała znacznie niższą liczbę limfocytów Treg we krwi obwodowej niż grupa kontrolna ($p = 0,005$). U pacjentów w I stopniu zaawansowania nowotworu liczba limfocytów Treg była zbliżona do liczby limfocytów Treg w grupie kontrolnej (nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy). W całej grupie badanej poziom limfocytów Treg we krwi obwodowej nie miał wpływu na przeżycie. Analiza w podgrupach różnych stadiów TNM również nie wykazała różnicy w przeżyciu między pacjentami z „niską” i „wysoką” liczbą limfocytów Treg.

Wnioski

Obecność DTC w szpiku kostnym nie jest związana z cechami charakteryzującymi guza pierwotnego i wydaje się zmniejszać tendencję do tworzenia przerzutów w lewostronnym raku jelita grubego. Istnieje również tendencja do poprawy ogólnego przeżycia pacjentów z obecnymi DCT w szpiku kostnym. Wyniki te wymagają jednak dalszego potwierdzenia na większych grupach chorych.

Status HLA-A2 może wpływać na przebieg kliniczny pacjentów z rakiem okrężnicy i odbytnicy po lewej stronie, chociaż guzy te uważane są za mniej immunogenne niż guzy z prawostronną lokalizacją. HLA-A2-dodatni pacjenci z lewostronnym rakiem jelita grubego żyli statystycznie dłużej niż ci, którzy nie mieli HLA-A2 ($p = 0,027$). Brak ekspresji HLA-A2 był negatywnym czynnikiem prognostycznym w grupie radykalnie zoperowanych pacjentów.

Bezwzględna liczba limfocytów Treg we krwi obwodowej pacjentów z lewostronnym rakiem jelita grubego była znacznie zmniejszona w porównaniu do zdrowych osób z grupy kontrolnej, szczególnie u pacjentów z chorobą w stadium II + III. Obecność limfocytów Treg we krwi obwodowej nie miała wpływu na przeżycie.

Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the most common cancer of the gastrointestinal tract, the third cancer in incidence and second in cancer –related mortality in the world.

Despite radical surgery and adjuvant treatment, 25-50% of patients with stage II and III disease relapse as a result of undetected tumor cell spread.

The current knowledge on colorectal cancer (CRC) identifies tumor immunogenicity as one of the more important issues.

In cancers, the prerequisite for immune system activation is the presentation of tumor associated antigen (TAA) epitopes to immunocompetent cells. HLA-A2 is one of the antigens in the context of which TAAs are presented, but data on the possible impact of HLA-A2 antigen expression on the survival of patients with colorectal cancer are scarce and sometimes contradictory.

T regulatory lymphocytes (Treg) are one of the subsets of T-lymphocytes involved in the interaction of neoplastic tumors and the host immune system, and they may impair the immune reaction against cancer. It has been shown that Treg are increased in the peripheral blood of patients with various cancers. In colorectal cancer, the prognostic role of Treg remains controversial.

Disseminated tumor cells (DTC) are the subset of circulating tumor cells that migrated to the bone marrow.

Earlier studies did not consider differences resulting from the heterogeneity of colorectal cancer related to its location.

Immunotherapy is not fully used in the treatment of colorectal cancer, especially in its left-sided location. In-depth research to assess the mechanisms of antitumor immunity in patients after potentially radical surgery may also determine the site of immunotherapy in these cases.

Aim

The aim of the study based on 3 original publications was to deepen knowledge on selected aspects of the immune system response to cancer in patients with left-sided colorectal cancer and to assess their impact on the clinical course of the disease .

The relationship between the presence of DTC in the bone marrow and the characteristics of the tumor and the long-term results of the treatment of patients was investigated.

The connection between HLA-A2 expression on somatic cells, level of Treg in peripheral blood in patients with left-sided colorectal cancer in various stages of disease and long-term survival was analysed.

Patients and methods

The study was a retrospective analysis based on a prospectively collected database. The study included 109 consecutive patients treated for colorectal cancer from 07.2007 to 06.2012 at the First Department of General, Oncological and Gastroenterological Surgery Collegium Medicum of the Jagiellonian University.

Patients bone marrow and peripheral blood was taken for analysis prior to elective surgery. Bone marrow DTC status was analyzed in 91 patients, HLA-A2 was determined in 58 patients, level of regulatory T cells in 94 patients and 21 healthy volunteers from the control group.

Results

The DTC in bone marrow were diagnosed in 42 patients (46.1%). The prevalence of DTC in the bone marrow was not related to tumor infiltration depth, nodal involvement, distant metastasis, tumor grading nor the location of the primary tumor. The 5-year overall survival in the DTC positive group was 59.5% while for DTC negative patients 53% ($p=0.190$). There was a visible trend favoring survival in patients with DTC in the bone marrow when patients with stage II and III disease were analyzed together and separately for stage II and III. There were significantly less metachronous distant metastases in DTC positive patients (0.0375).

In the study group 56% of patients were found to be HLA-A2 positive. Patients with HLA-A2 expression lived statistically longer than HLA-A2 negative patients ($p=0.027$). There was no significant difference in overall survival between the HLA-A+ and HLA-A2- groups with stage II and III left-sided CRC. However, the Cox proportional hazard model showed that the lack of HLA-A2 expression was a negative prognostic factor in the group of radically operated patients without distant metastases.

There was a statistically significant difference between count of Treg in the I and II stages of TNM ($p = 0.047$). The number of Treg in the entire study group was significantly lower than in the control group ($p = 0.008$) and between patients in stages II and III and the control group ($p = 0.003$ and $p = 0.018$). The group of pT3 + pT4 patients also had significantly lower Treg counts in their peripheral blood than the control group ($p = 0.005$). In the entire study group, the level of Treg cells in the peripheral blood had no influence on survival. The analysis of the TNM stage subgroups also showed no difference in survival between patients with "low" and "high" Treg counts

Conclusions

The presence of DTC in the bone marrow is not associated with primary tumor characteristics and seems to diminish metastasis formation in left-sided colorectal cancer.

There is also a trend for improved overall survival for DCT positive patients.. These results, however, require further confirmation in larger groups of patients.

HLA-A2 status may affect the clinical course of patients with left-sided colon and rectal cancer, although left-sided tumors are less immunogenic than right-sided ones. HLA-A2 positive patients with left-sided colorectal cancer lived statistically longer than those who were HLA-A2 negative ($p=0.027$). Lack of HLA-A2 expression was a negative prognostic factor in the group of radically operated patients.

The absolute number of Treg in the peripheral blood of patients with left-sided colorectal cancer was significantly decreased in comparison to healthy controls, especially for patients with stage II + III disease. Treg presence in the peripheral blood had no impact on survival.