

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE



mgr Paulina Poter

**Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z wybranymi parametrami
kliniczno-morfologicznymi w rakach jelita grubego**

Association of PD-1 and PD-L1 protein expression with selected
clinical and morphological parameters in colorectal cancers

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Katarzyna Karpińska-Łukaszewicz

SZCZECIN 2023

*Dziękuję mojemu Promotorowi
za opiekę merytoryczną oraz pomoc w realizacji niniejszej pracy.*

*Dziękuję Ewie Dobak
za nieocenione wsparcie organizacyjne.*

*Dziękuję Tomaszowi Kolendzie
za cenne uwagi oraz okazane wsparcie i motywację.*

Spis treści

| | |
|---|-----------|
| 1. Wstęp..... | 6 |
| 1.1. Rak jelita grubego | 6 |
| 1.1.1. Prawostronny i lewostronny rak jelita grubego | 6 |
| 1.1.2. Czynniki ryzyka raka jelita grubego | 8 |
| 1.1.3. Czynniki prognostyczne i rokowanie | 9 |
| 1.1.4. Molekularne mechanizmy karcinogenezy | 11 |
| 1.1.4.1. Niestabilność chromosomowa | 12 |
| 1.1.4.2. Niestabilność mikrosatelitarna..... | 13 |
| 1.1.4.3. Hipermetylacja wysp CpG..... | 14 |
| 1.2. Leczenie raka jelita grubego | 14 |
| 1.3. Charakterystyka białek PD-1 i PD-L1 | 16 |
| 1.3.1. Białko PD-1 | 16 |
| 1.3.2. Białko PD-L1 | 17 |
| 1.3.3. Białka PD-1 i PD-L1 jako krytyczne białka kontrolnego punktu odporności..... | 18 |
| 1.3.4. Zastosowanie przeciwciał anty-PD-1 i anty-PD-L1 w immunoterapii..... | 19 |
| 2. Cel pracy | 21 |
| 3. Materiał i metody | 22 |
| 3.1. Pacjenci..... | 22 |
| 3.2. Ocena histopatologiczna | 24 |
| 3.3. Mikromacierz tkankowa | 24 |
| 3.4. Reakcje immunohistochemiczne | 26 |
| 3.4.1. Reakcja z przeciwciałem monoklonalnym anty-PD-1..... | 26 |
| 3.4.2. Reakcja z przeciwciałem monoklonalnym anty-PD-L1 | 28 |
| 3.5. Ocena wyników | 29 |
| 3.5.1. Algorytm cytoplazmatyczny..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.2. Algorytm błonowy | 32 |
| 3.6. Ocena przeżycia pacjentów | 33 |
| 3.7. Analiza statystyczna | 33 |
| 4. Wyniki..... | 34 |
| 4.1. Porównanie ekspresji immunohistochemicznej białka PD-1 z ekspresją białka PD-L1..... | 34 |
| 4.2. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a wybrane parametry kliniczno-morfologiczne | 36 |
| 4.2.1. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a płeć pacjentów..... | 37 |
| 4.2.2. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a wiek pacjentów | 38 |
| 4.2.3. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a stopień zaawansowania klinicznego raka jelita grubego | 40 |
| 4.2.4. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a stopień złośliwości histologicznej guza | 42 |
| 4.2.5. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a stan okolicznych węzłów chłonnych..... | 43 |
| 4.2.6. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a status genu KRAS | 45 |
| 4.2.7. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a naciek limfocytarny.. | 46 |
| 4.2.8. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a pączkowanie guza | 49 |
| 4.3. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a przeżycie pacjentów | 49 |
| 4.4. Podsumowanie wyników | 55 |
| 5. Dyskusja..... | 57 |
| 6. Wnioski | 66 |
| 7. Streszczenie..... | 67 |
| 8. Abstract..... | 69 |
| 9. Piśmiennictwo..... | 71 |
| 10. Załączniki | 88 |
| 11. Spis tabel..... | 98 |

| | |
|-------------------------------|------------|
| 12. Spis rycin | 100 |
| 13. Wykaz skrótów..... | 102 |

1. Wstęp

1.1. Rak jelita grubego

Rak jelita grubego jest trzecim co do częstości występowania nowotworem złośliwym na świecie i drugą najczęstszą przyczyną zgonu z powodu nowotworów złośliwych [1-3]. Stanowi 9,7% wszystkich nowotworów, z wyłączeniem raka skóry [4].

Podstawą diagnostyki w przypadku podejrzenia raka jelita grubego jest badanie endoskopowe i w zależności od lokalizacji są to rektoskopia, rektosigmoidoskopia i kolonoskopia. Badania te pozwalają na pobranie wycinków do analizy histopatologicznej, a także wykrycie łagodnych bądź złośliwych zmian synchronicznych [5].

Istnieje zmienność geograficzna w częstości występowania raka jelita grubego. Zjawisko to jest związane ze stylem życia [1]. Najczęściej rak jelita grubego występuje w Australii i Nowej Zelandii, natomiast najrzadziej obserwuje się występowanie w Afryce Zachodniej. Regiony, które są bardziej rozwinięte cechują się większą częstością występowania raka jelita grubego niż te mniej rozwinięte. W Azji występuje największe zróżnicowanie co do częstości występowania raka jelita grubego, co jest związane ze zróżnicowaniem warunków społeczno-ekonomicznych. Biorąc pod uwagę częstość występowania raka jelita grubego według standardu wieku (*age-standardized incidence rate*; ASR_i) występowanie raka jelita grubego jest rzadsze u kobiet (14,3 na 100 000), niż u mężczyzn (20,6 na 100 000) [4].

W Polsce rak jelita grubego jest również istotnym problemem onkologicznym [6]. Jest trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym u mężczyzn i drugim u kobiet [7]. W 2019 roku liczba zgonów z powodu raka jelita grubego w Polsce wynosiła u mężczyzn 6923, a u kobiet 5229 [8].

1.1.1. Prawostronny i lewostronny rak jelita grubego

Rak jelita grubego zlokalizowany proksymalnie od zagięcia śledzionowego określa się jako prawostronny, natomiast umiejscowiony w okolicy zagięcia

śledzionowego lub dystalnie od zagięcia śledzionowego jako lewostronny. Podział ten wynika z faktu, że dwie trzecie proksymalnego odcinka poprzecznicy powstają w trakcie embriogenezy z jelita środkowego, natomiast z jelita tylnego pochodzi jedna trzecia dystalna [9].

Prawostronny i lewostronny rak jelita grubego różnią się nie tylko pod względem embriologicznym, ale także epidemiologicznym, fizjologicznym, patologicznym, genetycznym i klinicznym, co z kolei powoduje duże różnice w przebiegu choroby nowotworowej tam zlokalizowanej, jak i rokowaniu [9-10]. Dodatkowo do tych odmienności w prezentacji choroby przyczyniają się drogi zaopatrzenia naczyniowego poszczególnych części jelita grubego. Prawa część okrężnicy zaopatrywana jest przez tętnicę kręgową górną, podczas gdy lewa część przez tętnicę kręgową dolną [11]. Zaobserwowano także, że proksymalnie od zagięcia śledzionowego okrężnicy częściej występują nowotwory o typie wzrostu egzofitycznym (guz ze wzrostem do światła jelita), natomiast dystalnie od zagięcia śledzionowego obserwuje się typ wzrostu endofityczny (naciek wrzodziejący ze wzrostem wewnątrz ściany jelita) lub okrężny (zajęcie ściany jelita i zwężenie światła jelita) [8].

Już od 1990 roku lewostronny i prawostronny rak jelita grubego uważane są za odrębne nowotwory [12]. Należałoby więc oczekiwać znamienych różnic w rokowaniu raka prawo- i lewostronnego, jednak literatura podaje sprzeczne wyniki. Badania wskazują, że pacjenci z lewostronnym rakiem jelita grubego cechują się lepszym rokowaniem [13] i wyższymi wskaźnikami przeżycia niż pacjenci z rakiem prawostronnym [14-16], u których ponadto obserwuje się częstsze nawroty choroby [17-18]. Wiele prac donosi, że pacjenci z prawostronnym rakiem jelita grubego wykazują wyższy stopień zaawansowania guza: większy rozmiar i głębokość nacieku raka, a także niższy stopień zróżnicowania nowotworu [19-20]. Część badań sugeruje jednak wyższe przeżycie w przypadku prawostronnego raka jelita grubego lub podobny okres przeżycia pacjentów bez względu na lokalizację guza [21-22]. Weiss i wsp. wskazują, że po dokonaniu analizy wykorzystującej wiele zmiennych takich, jak choroby współistniejące i leczenie, nie zaobserwowano różnic w pięcioletnim przeżyciu między chorymi z prawostronnym, a chorymi z lewostronnym rakiem jelita grubego [23].

W raku jelita grubego zlokalizowanym prawostronnie obserwuje się mutacje związane z MMR (*DNA Mismatch Repair*; system naprawy błędnie sparowanych zasad

azotowych [24]), podczas gdy w raku o lewostronnej lokalizacji można zaobserwować mutacje w szlaku niestabilności chromosomowej (KRAS, APC, PIK3CA czy p53) [25]. Huang i wsp. potwierdzili w swoich badaniach, że w lewostronnym raku jelita grubego obecne są mutacje APC, a mutacje w genie BRAF dominują z kolei w prawostronnym raku jelita grubego [26]. Pod względem odpowiedzi na leczenie również obserwuje się znaczące różnice w przypadku guzów prawo- i lewostronnych. Część badań donosi, że w przypadku guza w lewej części okrężnicy większe korzyści obserwuje się przy zastosowaniu chemioterapii uzupełniającej (opartej na 5-fluorouracylu) i terapii celowanej przeciwko receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (*epidermal growth factor receptor*) i jest to związane z lepszym rokowaniem [25]. Pacjentom, u których występuje guz pierwotny lewostronny z typem dzikim genów RAS i BRAF, proponuje się terapię przeciw EGFR z zastosowaniem cetuximabu lub panitumumabu. W przypadku guzów prawostronnych w terapii celowanej główne zastosowanie ma bevacizumab – przeciwciało skierowane przeciwko VGFR (*vascular endothelial growth factor*; czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego) [27]. Pacjenci z prawostronnym rakiem okrężnicy reagują zmiennie na konwencjonalną chemioterapię i u tych pacjentów obiecujące wyniki wykazuje leczenie z zastosowaniem immunoterapii [25].

1.1.2. Czynniki ryzyka raka jelita grubego

Czynniki ryzyka zachorowania na raka jelita grubego są złożone. Podłoże dziedziczne ma miejsce w zaledwie 5-10% przypadków raka jelita grubego [28-29]. Do zespołów uwarunkowanych genetycznie, w których spotykamy raka jelita grubego należą: zespół Lyncha – dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*; HNPCC), rodzinna gruczolakowata polipowatość (*familial adenomatous polyposis*; FAP), dziedziczona recesywnie polipowatość związana z MUTYH (*MUTYH associated polyposis*; MAP) [30]. Dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością niesie za sobą około 70-80% ryzyko zachorowania [31], natomiast w przypadku rodzinnej polipowatości gruczolakowatej ryzyko wystąpienia raka jelita grubego wynosi 100% [32].

W większości przypadków rak jelita grubego ma jednak charakter sporadyczny, a szansa na zachorowanie rośnie wraz z wiekiem – 9 na 10 pacjentów jest w wieku 50 lat

lub więcej [8], przy czym 80% pacjentów z rakiem okrężnicy i 75% pacjentów z rakiem odbytnicy jest w momencie rozpoznania w wieku 60 lat lub więcej [4].

Inne istotne czynniki ryzyka to [8]:

- płeć (występowanie 1,5-2 razy częściej u mężczyzn niż u kobiet),
- choroby zapalne jelita grubego takie, jak wrzodziejące zapalenie (20-krotny wzrost ryzyka), czy choroba Leśniowskiego-Crohna (3-krotny wzrost ryzyka),
- zespół metaboliczny (ryzyko wzrasta przede wszystkim u mężczyzn),
- tryb życia (im niższa aktywność fizyczna, tym większe ryzyko zachorowania),
- palenie tytoniu (1/5 raków jelita grubego w USA jest wykrywana u osób palących),
- czynniki dietetyczne (nadużywanie alkoholu, dieta wysokokaloryczna, bogata w tłuszcze a uboga w błonnik i wapń),
- przebyta cholecystektomia czy radioterapia obszaru jamy brzusznej, a także obecność ureterosigmoidostomii (500-krotny wzrost ryzyka rozwoju raka),
- grupy etniczne (częstsze zachorowania u Afroamerykanów oraz Żydów Aszkenazyjskich),
- czynniki geograficzne (wyższe ryzyko w Ameryce Północnej, Europie, Australii i Japonii, niższe w Afryce i Azji).

Zwiększona zapadalność na raka jelita grubego obok złych nawyków żywieniowych, palenia tytoniu, czy niskiej aktywności fizycznej jest spowodowana także starzeniem się populacji i otyłością w krajach zachodnich [33-34].

1.1.3. Czynniki prognostyczne i rokowanie

Do czynników prognostycznych w raku jelita grubego należą [35-36]:

- typ histologiczny raka,
- stopień histologicznej złośliwości,
- obecność przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych,
- obecność przerzutów odległych,
- obecność angioinwazji,

- odpowiedź układu limfatycznego - naciek limfocytarny w utkaniu guza (*tumor infiltrating lymphocytes; TIL*),
- niestabilność mikrosatelitarna,
- status genów KRAS/NRAS/BRAF,
- delecja 18q,
- poziom białka CEA w surowicy,
- tzw. czynniki trzeciej kategorii (neuroinwazja, pierwotna lokalizacja guza, sposób naciekania i średnica guza, obecność krwawienia z guza, wystąpienie niedrożności i perforacji, cukrzyca, płeć, palenie papierosów, polimorfizm genetyczny).

Rokowanie w raku jelita grubego jest tym lepsze, im wcześniej jest on rozpoznany [37]. Raki jelita grubego zlokalizowane w odbytnicy cechują się najgorszym rokowaniem [38]. Ponadto wśród pacjentów, u których zdiagnozowano raka jelita grubego z przerzutami odległymi, około 70-75% osób przeżywa ponad rok, 30-35% około 3 lat i mniej niż 20% przeżywa 5 lat od momentu rozpoznania [39].

Liczne badania wskazują na inwazję naczyń limfatycznych, niski stopień zróżnicowania histologicznego i pączkowanie guza (*tumor budding*) jako na gorsze czynniki prognostyczne tego nowotworu [40-41].

Pączkowanie guza to ważny dodatkowy czynnik rokowniczy w przypadku raka jelita grubego. Występowanie pączkowania guza określa się jako obecność pojedynczych komórek nowotworowych albo niewielkich skupisk do 5 komórek w podścielisku na obrzeżach guza [42]. Te drobne grupy komórek rakowych wydają się być hybrydowym stanem tzw. stanem przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (*epithelial-mesenchymal transition; EMT*) komórek nowotworowych. Komórki rakowe podlegające temu zjawisku posiadają większy potencjał migracyjny i są bardziej inwazyjne. Wiele doniesień dowiodło, że pączkowanie guza jest związane z agresywnym przebiegiem choroby, obecnością przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych, przerzutów odległych oraz wyższym prawdopodobieństwem wznowy miejscowej [42-43]. Zjawisko to stało się ugruntowanym niezależnym czynnikiem prognostycznym w raku jelita grubego, jednak wciąż brakuje standardowej metody oceny tego parametru [44].

Naciek limfocytarny w utkaniu guza także stanowi istotny element oceny, zwłaszcza w immunoterapii. Komórki nowotworowe mają zdolność wpływania na immunosupresyjne mikrośrodowisko guza i mogą kontrolować limfocyty naciekające nowotwór (*tumor-infiltrating lymphocyte*; TIL) [45]. Uważa się, że TIL odzwierciedlają pierwotną odpowiedź immunologiczną na guzy łagodne, a ostatnie doniesienia mówią o korelacji między przeżyciem pacjentów z rakiem jelita, a naciekiem limfocytarnym w utkaniu guza. Układ odpornościowy posiada mechanizmy, które zapobiegają nadmiernej aktywacji limfocytów, a jednym z takich punktów jest omawiana w niniejszej pracy aktywność szlaku PD-1 (*programmed cell death protein 1*), czyli białko programowanej śmierci komórki 1 i jego ligandu PD-L1 [46].

TIL są zatem silnie związane z odpowiedzią immunologiczną guza i pomagają przewidzieć odpowiedź na immunoterapię oraz przeżycie [47-49]. Limfocyty naciekające nowotwór CD8+ mają wpływ na niszczenie komórek nowotworowych w sposób cytotoksyczny i uznaje się, że wpływa to na odpowiedź na immunoterapię, rokowanie oraz na przeżycie w raku jelita grubego [50-51]. Jednak znaczenie prognostyczne i predykcyjne TIL, a także znaczenie białek PD-1 i PD-L1 w zaawansowanym raku jelita grubego są słabo poznane [52], choć odpowiedź układu limfatycznego coraz częściej jest łączona z lepszymi wynikami klinicznymi w raku jelita grubego [53].

1.1.4. Molekularne mechanizmy karcinogenezy

Większość raków jelita grubego jest wynikiem zmian prekursorowych takich, jak łagodny nowotwór pochodzenia nabłonkowego – gruczolak, który może w pewnych warunkach ulec progresji do gruczolaka. Odkryto trzy główne molekularne szlaki karcinogenezy, które odpowiadają za powstanie raka jelita grubego odpowiednio w około 85%, 15% i 17% [54]:

1. niestabilność chromosomowa,
2. niestabilność mikrosatelitarna,
3. hipermetylacja wysp CpG.

1.1.4.1. Niestabilność chromosomowa

Niestabilność chromosomowa jest wynikiem błędów zaistniałych podczas segregacji chromosomów w trakcie podziału mitotycznego, które prowadzą do strukturalnych i liczbowych zmian chromosomalnych. Niestabilność chromosomowa generuje genomową heterogeniczność, a także poprzez wprowadzenie DNA dwuniciowego do cytozolu angażuje szlak antywirusowy cGAS-STING i promuje w ten sposób sygnalizację zapalną. Efekt tych wielokierunkowych działań powoduje, że niestabilność chromosomowa jest jednym z głównych czynników stymulujących ewolucję guza, a także jest genomowym źródłem dla przekazywania sygnałów między guzem a jego mikrośrodowiskiem, co pozwala na ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego. Wiąże się to z obecnością przerzutów i gorszym rokowaniem [55].

W 1990 roku Fearon i Vogelstein opisali po raz pierwszy proces przemiany złośliwej w gruczolaku, wynikający z niestabilności chromosomowej. Powstałe raki zwykle są wynikiem połączenia aktywacji onkogenów (np. PIK3CA, KRAS) oraz inaktywacji genów supresorowych w komórkach (np. APC, TP53, SMAD4) poprzez mutację i utratę alleli [56]. APC to istotny negatywny regulator szlaku WNT. Mutacja genu APC prowadzi do hipermetylacji wspomnianego szlaku, co jest kluczowym wczesnym zdarzeniem w przypadku powstania niestabilności chromosomowej. Nieprawidłowości szlaku WNT są charakterystyczne dla większości sporadycznych raków jelita grubego oraz dla guzów, które powstały u pacjentów z FAP [57]. Ponadto APC to składnik kompleksu Aksyna-APC, powodującego proteasomalną degradację efektora WNT β -kateniny. Uszkodzenie tego kompleksu w wyniku inaktywacji APC powoduje, że β -katenina odkłada się w cytoplazmie i wędruje do jądra komórkowego, co z kolei prowadzi do aktywacji MYC i innych genów. Zaburzenie szlaku WNT niesie za sobą rozregulowanie proliferacji i różnicowania komórek nabłonka gruczołowego jelita grubego oraz pojawienie się w tych komórkach widocznych mikroskopowo cech dysplazji, czyli zmiany zwanej gruczolakiem – początkowo z dysplazją wewnątrz nabłonkową małego stopnia, który jednak w miarę upływu czasu może ulegać progresji do gruczolaka z dysplazją wewnątrz nabłonkową dużego stopnia. Z kolei przekształcenie gruczolaka w raka inwazyjnego jelita grubego zwykle związane jest z utratą i/lub mutacją genu supresorowego TP53 [58].

1.1.4.2. Niestabilność mikrosatelitarna

Mikrosatelity są to krótkie sekwencje DNA występujące w regionach kodujących i niekodujących, charakteryzujące się tandemowymi powtórzeniami od jednej do tetra par zasad. Powtarzalna struktura mikrosatelitów powoduje, że są one podatne na błędy podczas replikacji, rekombinacji genetycznej lub w wyniku uszkodzenia fizycznego czy chemicznego DNA [59]. Za mechanizm naprawy błędów w tych sekwencjach odpowiedzialny jest system MMR (*DNA Mismatch Repair*; system naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych [24]) [60]. System ten to proces komórkowy, który obejmuje białka tworzące heterodimery naprawiające uszkodzone DNA (MLH1, MLH3, PMS1, PMS2, MSH2, MSH3, MSH6 i Exo1). Proces ten działa na zasadzie identyfikacji, a następnie naprawie niedopasowanych zasad. Podczas prawidłowej replikacji DNA system MMR wykrywa niewielkie błędy niedopasowania DNA, które są wiązane przez heterodimery MSH2/MSH3 i MSH2/MSH6, a następnie heterodimery MLH1/PMS2 wycinają i syntetyzują nową, poprawioną, prawidłową nić DNA. Jednak w przypadku niesprawnego systemu MMR dochodzi do wytworzenia mutacji z rozległymi polimorfizmami długości sekwencji mikrosatelitarnych, czyli do niestabilności mikrosatelitarnej (*microsatellite instability*; MSI) [61].

W przypadku raka jelita grubego guzy z niestabilnością mikrosatelitarną zlokalizowane są częściej w prawej części okrężnicy i charakteryzują się występowaniem limfocytów naciekających nowotwór (TIL). Najczęściej są to guzy w drugim stopniu zaawansowania klinicznego (62).

MSI jest charakterystyczna dla dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego (HNPCC, tzw. Zespół Lyncha), ale wykrywana jest także w około 15% sporadycznych raków jelita grubego, najczęściej z powodu inaktywacji epigenetycznej MLH1. Guzy sporadyczne z MSI zwykle występują u starszych kobiet, natomiast te związane z zespołem Lyncha częściej pojawiają się u młodszych pacjentów (≤ 50 lat). [59].

1.1.4.3. Hipermetylacja wysp CpG

Metylacja DNA jest to proces polegający na przeniesieniu przez metylotransferazy DNA (DNMT) grupy metylowej do pozycji C-5 pierścienia cytozyny DNA [63]. Metylacja DNA jest istotnym czynnikiem inaktywacji chromosomu X, imprintingu genomowego oraz szeregu innych procesów, odgrywając istotną rolę w prawidłowym rozwoju, jednak potwierdzono także jej znaczenie w powstawaniu nowotworów [64-65]. Metylacja DNA jest to kluczowy mechanizm modyfikacji epigenetycznej, natomiast takie procesy jak hipometylacja całego genomu czy hipermetylacja wysp CpG (*CpG island methylator phenotype*; CIMP) są mechanizmami charakterystycznymi dla procesów nowotworowych [66].

Hipermetylacja wysp CpG dotyczy genów supresorowych komórki nowotworowej i prowadzi do ich wyciszenia, dezaktywacji transkrypcji i utraty funkcji, a to z kolei sprzyja progresji nowotworu [67-69]. Wiele badań wskazuje na to, że styl życia (palenie, brak aktywności fizycznej, spożywanie alkoholu) [69] pełni istotną rolę w rozwoju raka wywołując stan zapalny poprzez liczne procesy, a jednym z tych procesów jest właśnie metylacja DNA. Jednak poza stylem życia wykazano związek występowania procesu metylacji DNA w raku jelita grubego z takimi czynnikami, jak: płeć żeńska, starszy wiek, występowanie MSI, mutacja genu BRAF, słabe zróżnicowanie, prawostronna lokalizacja guza, mutacja TP53, a także typ histologiczny (rak śluzotwórczy) [70].

1.2. Leczenie raka jelita grubego

W rakach jelita grubego, w zależności od stopnia klinicznego zaawansowania, stosuje się leczenie chirurgiczne (usunięcie guza z marginesem zdrowych tkanek i regionalnymi węzłami chłonnymi), chemioterapię (leczenie uzupełniające zabieg operacyjny u chorych z miejscowo i regionalnie zaawansowaną chorobą) i terapię spersonalizowaną [71] – terapię genową i immunoterapię [72-73].

W Polsce najczęstszym schematem leczenia, opartym na chemioterapii, jest LF4 – stosowanie długotrwałych dożylnych wlewów 5-fluorouracylu z leukoworyną, jednak

ostatnie badania wskazują, że korzystniejszym rozwiązaniem jest schemat FOLFOX (5-fluorouracyl + leukoworyna + oksiplatyna) oraz FOLFIRI (5-fluorouracyl + leukoworyna + irynotekan) [74]. W przypadku pacjentów z rakiem okrężnicy we wczesnym stadium zaawansowania klinicznego, u których rozważa się zastosowanie chemioterapii uzupełniającej, należy wziąć pod uwagę wiele czynników takich, jak ryzyko nawrotu choroby, bezwzględna korzyść w zakresie przeżycia chemioterapii, toksyczność leczenia i choroby współistniejące [75].

W przypadku pacjentów z przerzutami schematy leczenia systemowego zostały znacznie rozszerzone poza chemioterapię, która oparta jest na 5-fluorouracylu. Biomarkery takie jak rearanżacja sekwencji genów KRAS/NRAS/BRAF, niestabilność mikrosatelitarna, czy lokalizacja (guz prawo- lub lewostronny), pomogły onkologom zastosować bardziej spersonalizowane schematy leczenia systemowego, które objęły, poza chemioterapią, także terapię celowaną molekularnie i immunoterapię [75].

Terapie te są obiecującą formą leczenia onkologicznego, z którą współcześnie wiąże się bardzo duże nadzieje w zakresie poprawy skuteczności leczenia antynowotworowego oraz wydłużenia długości całkowitego przeżycia u pacjentów [76]. W przypadku raka jelita grubego zastosowanie znalazły przeciwciała monoklonalne, antagoniści receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor*; EGFR). Badanie genów RAS jest ważnym markerem predykcyjnym w przypadku terapii z zastosowaniem przeciwciał anti-EGFR [54]. Jednak w związku z ich ograniczonym działaniem w populacji ogólnej, a także ze względu na koszty i działania niepożądane, dokonuje się optymalizacji doboru chorych do leczenia w oparciu o czynniki predykcyjne [7], takie jak [77]:

- molekularne czynniki związane z odpowiedzią na leczenie anti-EGFR: KRAS, NRAS, BRAF, PI3K/PTEN oraz ligandy EGFR (epiregulina i amfiregulina),
- markery związane z odpowiedzią na leczenie anti-VGFR (*vascular endothelial growth factor*; czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego): markery tkankowe, markery angiogenezy,
- niestabilność mikrosatelitarna,
- poziom dehydrogenazy mleczanowej,
- nadciśnienie.

W oparciu o powyższe czynniki predykcyjne szerokie zastosowanie w leczeniu raka jelita grubego znalazły przeciwciała skierowane przeciwko EGFR: cetuximab (IMC-C225, Erbitux) i panitumumab (ZD1839, Gefitinib) oraz przeciwciała skierowane przeciwko VEGFR: bevacizumab (Avastin) [5].

U 50% pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami, u których wykryto typ dziki genów KRAS/NRAS/BRAF, chemioterapia w połączeniu z cetuximabem i panitumumabem może wydłużyć medianę przeżycia o 2-4 miesiące w porównaniu z samą chemioterapią, lecz skuteczne terapie celowane dla pacjentów ze zmianami sekwencji (mutacjami) w genach KRAS lub NRAS nie są jeszcze dostępne [39]. Mutacje genu KRAS są odpowiedzialne za oporność w leczeniu przeciwciałami anty-EGFR [78]. W przypadku pacjentów z wariantami sekwencji BRAF V600E, terapia skojarzona z inhibitorami EGFR i BRAF wydłuża całkowity czas przeżycia o 3,4 miesiąca w porównaniu z chorymi, u których zastosowano samą chemioterapię, jednak dotyczy to zaledwie 5-10% pacjentów z rakiem jelita grubego [39].

Wydaje się, że immunoterapia może mieć duże znaczenie w leczeniu raka jelita grubego. Układ immunologiczny pełni ważną rolę zarówno w rozwoju, jak i destrukcji raka. Komórki nowotworowe wykształciły bowiem mechanizmy, które umożliwiają im uniknięcie reakcji obronnej ze strony organizmu [79]. Komórki rakowe mogą zapobiegać efektom immunosupresyjnym na drodze licznych mechanizmów, włączając wykorzystanie szlaków inhibicyjnych kluczowych punktów immunologicznych. Jednym z takich punktów jest aktywność szlaku PD-1 (*programmed cell death protein 1*; białko programowanej śmierci komórki 1)/PD-L1 (ligand receptora PD-1) [80-81]. W leczeniu wielu rodzajów nowotworów wykorzystanie szlaku PD-1/PDL1 jest przełomem terapeutycznym [73].

1.3. Charakterystyka białek PD-1 i PD-L1

1.3.1. Białko PD-1

Białko PD-1 (*programmed cell death protein 1*; białko programowanej śmierci komórki 1) określane także jako CD279 [82], zostało po raz pierwszy odkryte w 1992

roku przez Tasuku Honjo i jego zespół z Uniwersytetu w Kioto, którzy wykazali, że jest to białko błonowe występujące na powierzchni limfocytów T, zaangażowane w proces apoptozy komórki [83].

Białko kodowane jest przez gen PDCD-1, zlokalizowany w liczącym 5 eksonów ludzkim chromosomie 2. Ze względu na budowę glikoproteinowej cząsteczki białko PD-1 zaliczane jest do rodziny CD28 [84]. PD-1 to białko transmembranowe o masie 55-kDa, zbudowane z 288 aminokwasów. Posiada domenę zewnątrzkomórkową N-końcową, domenę transbłonową, a także ogon cytoplazmatyczny, które zlokalizowane są odpowiednio na końcach N i C z dwoma zasadami tyrozynowymi [85]. Białko PD-1 występuje na powierzchni limfocytów T i B, komórek NK, komórek mieloidalnych [86], i wykazuje wysoką ekspresję na specyficznych dla nowotworu limfocytach T [87]. Jest białkiem receptorowym, a jego główną funkcją jest hamowanie proliferacji limfocytów T, hamowanie syntezy: IL-2, IL-10, IFN- γ oraz hamowanie aktywacji autoreaktywnych limfocytów [86].

1.3.2. Białko PD-L1

Od momentu odkrycia białka PD-1 w 1992 roku, próbowano ujawnić wzorce interakcji molekularnej PD-1 i w 1999 r. odkryto homolog B7, który obecnie znany jest jako PD-L1 [88]. Rok później wykazano, że PD-1 jest wiążącym i funkcjonalnym partnerem PD-L1 [89]. PD-L1 jest ligandem białka PD-1 – kluczową cząsteczką immunoregulacyjną, która tłumia cytotoksyczną odpowiedź immunologiczną limfocytów CD8+ po interakcji z receptorem PD-1, zarówno na ścieżkach fizjologicznych, jak i patologicznych [90]. PD-L1 jest białkiem transbłonowym o masie 40 kDa, które wiąże się z receptorem PD-1 na błonie komórkowej limfocytów T, co skutkuje zahamowaniem proliferacji i aktywacji limfocytów T [91].

Komórki rakowe i komórki prezentujące antygen wykazują ekspresję ligandu PD-L1, a także drugiego ligandu receptora PD-1, którym jest białko PD-L2 [80, 92]. Białka PD-L1 i PD-L2 zwane są odpowiednio CD274 i CD273 [93]. Inne komórki, poza komórkami nowotworowymi, na których obecne są ligandy PD-L1 i PD-L2 to w przypadku PD-L1 komórki krwiotwórcze: limfocyty T, limfocyty B, komórki

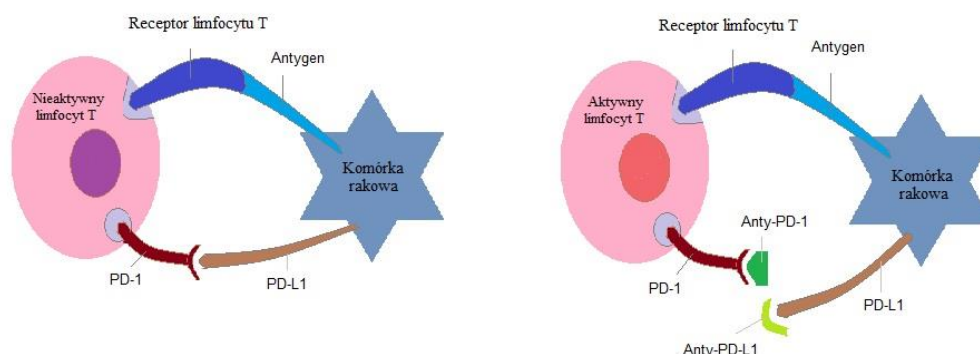
dendrytyczne, makrofagi oraz komórki niekrwiotwórcze: komórki zrębu i śródbłonna naczyniowego, komórki wysepek trzustkowych, keratynocyty i komórki syncytiotrofoblastu łożyska; PD-L2 natomiast ulega ekspresji na komórkach dendrytycznych, makrofagach oraz limfocytach B. Chociaż oba ligandy mogą ulegać ekspresji na komórkach nowotworowych to częstszej ekspresji ulega białko PD-L1 [94], które jest przedmiotem niniejszych badań.

1.3.3. Białka PD-1 i PD-L1 jako krytyczne białka kontrolnego punktu odporności

Białka PD-1 i PD-L1 to krytyczne białka kontrolnego punktu odporności, które są odpowiedzialne za negatywną regulację integralności i stabilności immunologicznej funkcji limfocytów T [95]. Białko PD-1, po połączeniu z ligandem PD-L1 lub PD-L2, ulega fosforylacji na resztach tyrozynowych, co z kolei indukuje wiązanie białkowych fosfataz tyrozynowych, mogących defosforylować kinazy. Wpływa to na szlaki takie, jak: fosfatydyloinozytolowa 3-kinaza (PI3K)/kinaza białkowa B (Akt), fosfolipaza C γ (PLC γ), kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK), VAV i RAS, powodując immunosupresję poprzez hamowanie aktywacji, przeżycia, proliferacji i funkcji cytolitycznych limfocytów T, przyczyniając się tym samym do progresji nowotworu [96-97].

Ekspresja ligandu PD-L1 prowadzi do ucieczki komórek nowotworowych spod kontroli nadzoru immunologicznego [98-100]. Połączenie ligandu z receptorem PD-1 na powierzchni limfocytów doprowadza do zahamowania ich aktywności, w wyniku czego w mikrośrodku nowotworowym pojawia się przewaga sygnałów hamujących efektorowe limfocyty T, a to z kolei powoduje ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego [80, 92]. Przeciwciała monoklonalne anty-PD-1 i anty-PD-L1 blokują połączenie białka PD-1 z jego ligandem (Ryc.1). W taki sposób odtwarzana jest przeciwnowotworowa aktywność limfocytów T [79].

Ryc.1. Terapia celowana z przeciwciałami monoklonalnymi blokującymi białka PD-1 i PD-L1 (projekt własny).



1.3.4. Zastosowanie przeciwciał anty-PD-1 i anty-PD-L1 w immunoterapii

Dobry efekt terapeutyczny osiągnęły przeciwciała monoklonalne anty-PD-1 niwolumab i pembrolizumab oraz przeciwciało anty-PD-L1 atezolizumab [101].

Jako pierwszy lek anty-PD-1 pojawił się pembrolizumab, dopuszczony początkowo do leczenia zaawansowanego czerniaka, później stosowany również w leczeniu zaawansowanego NSCLC (*non-small cell lung carcinoma*; niedrobnokomórkowy rak płuc), a także przerzutowego lub nawrotowego raka płaskonabłonkowego głowy i szyi [102]. Pembrolizumab jako immunologiczny inhibitor punktu kontrolnego można zaoferować pacjentom, u których ekspresja PD-L1 przekracza 50%. Pacjentom z NSCLC z guzami, w których ekspresja PD-L1 nie przekracza 50%, oferuje się terapię skojarzoną (pembrolizumab z chemioterapią) [8].

Drugim zatwierdzonym lekiem anty-PD-1 był niwolumab, który początkowo stosowano do leczenia zaawansowanego czerniaka [102]. Prowadzono badania kliniczne z przeciwciałem nivolumab, które *ex vivo* odpowiedzialne jest za wzrost syntezy cytokin i proliferację limfocytów, a także śmierć komórek czerniaka w hodowli [103]. Stwierdzono związek między stosowaniem leczenia blokującego receptor PD-1 a regresją

czerniaka u znacznego odsetka pacjentów [104]. Niwolumab jest ludzką immunoglobuliną przeciw PD-1 zatwierdzoną w leczeniu także innych nowotworów złośliwych takich, jak NSCLC, rak nerki, rak urotelialny [105-107] miejscowo zaawansowany lub przerzutowy, a także przerzutowy lub nawracający rak płaskonabłonkowy głowy i szyi [102].

Lek anty-PD-L1 – atezolizumab znajduje główne zastosowanie w przypadku NSCLC z przerzutami i raka urotelialnego [102]. U pacjentów z przerzutowym lub nieoperacyjnym miejscowo potrójnie ujemnym rakiem piersi (brak ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 - HER2), u których guz wykazuje ekspresję PD-L1, zastosowanie atezolizumabu w skojarzeniu z nab-paklitakselem także przynosi efekty. Obecnie prowadzonych jest wiele badań klinicznych z pembrolizumabem i atezolizumabem, a ich wyniki pozwolą wyciągnąć ostateczne wnioski dla całej grupy pacjentów z potrójnie ujemnym rakiem piersi [108].

Terapia za pomocą przeciwciał anty-PD-1 i anty-PD-L1 poprawiła przeżycie wielu pacjentów poprzez ratowanie specyficznych dla nowotworu limfocytów T cytotoksycznych (CTL) naciekających guza [109-114]. Badania wykazały, że blokada punktu kontrolnego PD-1/PD-L1 z wykorzystaniem swoistych przeciwciał przywraca aktywność przeciwnowotworową komórek T cytotoksycznych swoistych dla antygenów nowotworowych, co pozwala na działania terapeutyczne u pacjentów z rakiem [115].

Jak widać immunoterapie w znaczący sposób zrewolucjonizowały w ostatnim czasie strategie terapeutyczne różnych nowotworów, a białka PD-1 i PD-L1 są w ostatnich latach traktowane jako potencjalne cele terapii przeciwnowotworowej. Nadal trwają liczne badania kliniczne z lekami przeciw PD-1 i PD-L1 [116-117]. Inhibitory PD1/PDL1 dają możliwość zastosowania różnych terapii, kombinacji leków i schematów leczenia, co może pomóc w osiągnięciu wysokiej skuteczności w przypadku różnych typów nowotworów [118].

2. Cel pracy

Celem pracy były:

- 1) immunohistochemiczna ocena ekspresji białek PD-1 oraz PD-L1 w rakach jelita grubego,
- 2) związek ekspresji immunohistochemicznej białek PD-1 i PD-L1 z wybranymi parametrami kliniczno-morfologicznymi u pacjentów z rakiem jelita grubego,
- 3) związek ekspresji immunohistochemicznej białek PD-1 i PD-L1 z przeżyciem pacjentów z rakiem jelita grubego.

3. Materiał i metody

3.1. Pacjenci

Grupę badaną stanowi 98 pacjentów, operowanych w 2017 roku z powodu raka jelita grubego. Materiał pooperacyjny tych pacjentów był oceniany w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii PUM w Szczecinie. Badania zostały przeprowadzone na materiale tkankowym pobranym z guzów z materiału pooperacyjnego. Wycinki utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie, przeprowadzając dalszy proces utrwalania w procesorze tkankowym, a następnie zatopiono w parafinie i sporządzono bloczki parafinowe. Uzyskane z nich preparaty histologiczne zabarwiono hematoksyliną i eozyną i przeprowadzono ocenę histopatologiczną.

Grupa badana obejmuje 57 mężczyzn i 41 kobiet w wieku od 37 do 92 lat (średnia wieku wynosi 69, mediana 70). Rozpoznanie histopatologiczne (według Klasyfikacji WHO) [8] w tej grupie stanowiły: 73 gruczolakoraki i 25 gruczolakoraków z komponentą śluzową (do 40% utkania guza). Biorąc pod uwagę stopień histologicznej złośliwości guza: niski stopień złośliwości histologicznej (G1) obecny był w 3 przypadkach, średni stopień zróżnicowania histologicznego (G2) w 89 przypadkach i wysoki stopień złośliwości histologicznej (rak niskozróżnicowany G3) w 6 przypadkach. Lokalizacja prawostronna guza, czyli proksymalnie od zagięcia śledzionowego wystąpiła w 37 przypadkach, natomiast lokalizacja lewostronna w 61 przypadkach. Przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych obecne były w 53 przypadkach (według klasyfikacji pTNM) [8]. Parametr M, czyli obecność bądź brak przerzutów odległych był znany tylko u 4 pacjentów.

Dane kliniczno-morfologiczne grupy badanej przedstawia tabela 1.

Tab. 1. Charakterystyka grupy badanej.

| | | Liczba pacjentów 98 | |
|-------------|-------|----------------------|--|
| Wiek | | | |
| Zakres | 37-92 | | |
| Średnia | 69 | | |
| | ≥69 | 50 badanych (51,02%) | |
| | <69 | 48 badanych (48,98%) | |
| Mediana | 70 | | |

| | Liczba pacjentów | % |
|---|------------------|-------|
| Płeć | | |
| kobieta | 41 | 41,84 |
| mężczyzna | 57 | 58,16 |
| Lokalizacja guza | | |
| prawostronna | 37 | 37,76 |
| lewostronna | 61 | 62,24 |
| Stopień zaawansowania klinicznego | | |
| I | 13 | 13,27 |
| II | 32 | 32,65 |
| III | 49 | 50 |
| IV | 4 | 4,08 |
| Głębokość naciekania | | |
| T2 | 17 | 17,35 |
| T3 | 57 | 58,16 |
| T4 | 24 | 24,49 |
| Stopień złośliwości histologicznej | | |
| G1 | 3 | 3,06 |
| G2 | 89 | 90,82 |
| G3 | 6 | 6,12 |
| Status okolicznych węzłów chłonnych | | |
| N0 | 45 | 45,92 |
| N1+N2 | 53 | 54,08 |
| Tumor budding | | |
| + | 38 | 38,78 |
| - | 60 | 61,22 |
| Limfocyty naciekające guz | | |
| naciekające utkanie guza | | |
| + | 27 | 27,55 |
| - | 71 | 72,45 |
| w okolicy guza | | |
| + | 35 | 35,71 |
| - | 63 | 64,29 |
| Status genu KRAS (liczba badanych: 28) | | |
| mutacja | 14 | 50 |
| brak mutacji | 14 | 50 |

3.2. Ocena histopatologiczna

Przeprowadzono analizę histopatologiczną wycinków z guzów jelita grubego w badanych przypadkach, w których następnie oznaczono miejsca do pobrania fragmentu utkania guza w celu wykonania mikromacierzy tkankowych. Wyznaczone do sporządzenia macierzy fragmenty zawierały tkankę nowotworową bez obecności zmian martwiczych. W preparatach histologicznych guzów jelita oceniono także występowanie procesu pączkowania guza i obecność limfocytów wnikaających w utkanie guza jak i naciekających okolicę guza w 1 mm². W przypadku nacieku limfocytarnego dokonano oznaczenia „+” jako obecny (>30%) i „-” jako brak nacieku (<30%) [119], natomiast występowanie procesu pączkowania guza określono jako „+”, gdy zaobserwowano obecność pojedynczych komórek nowotworowych albo niewielkich skupisk do 5 komórek w podścielisku na obrzeżach guza i „-” jako brak tego zjawiska [42].

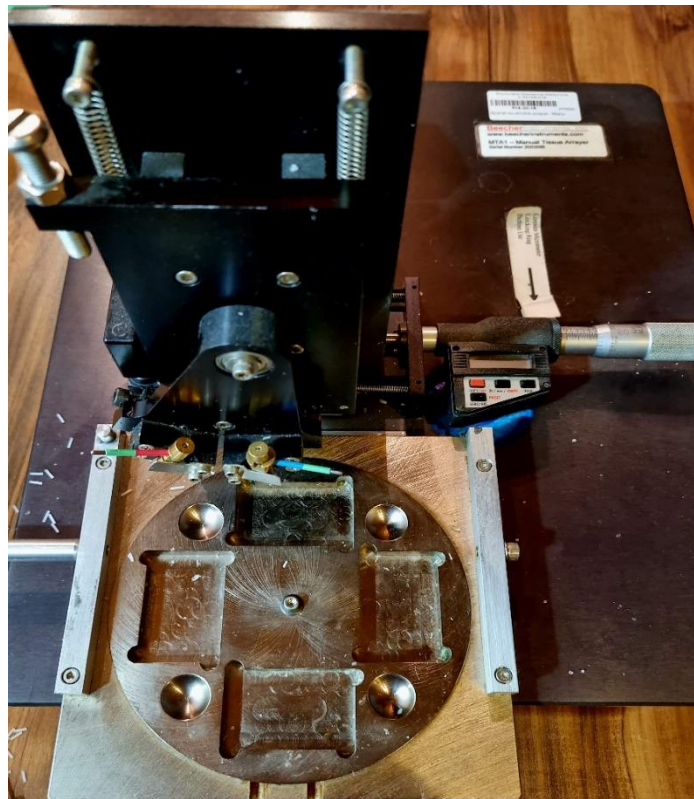
3.3. Mikromacierz tkankowa

W tej pracy zdecydowano o wykorzystaniu techniki mikromacierzy tkankowych (*tissue microarray*; TMA) [120-122] do przeprowadzenia oceny ekspresji immunohistochemicznej białek: PD-1 i PDL-1 w raku jelita grubego. Wykonanie barwień immunohistochemicznych metodą tradycyjną, stosowaną w badaniach diagnostycznych, czyli na całych skrawkach tkankowych jest kosztowne i czasochłonne. Zaletą mikromacierzy tkankowych jest możliwość zbadania kilkudziesięciu próbek jednocześnie przy zachowaniu tych samych warunków badania. Macierze tkankowe to bloczki parafinowe z wyciętymi cylindrycznymi studzienkami o średnicy 0,6-2,0 mm, w których w ściśle określonej pozycji, umieszcza się wybrane fragmenty tkanki guza.

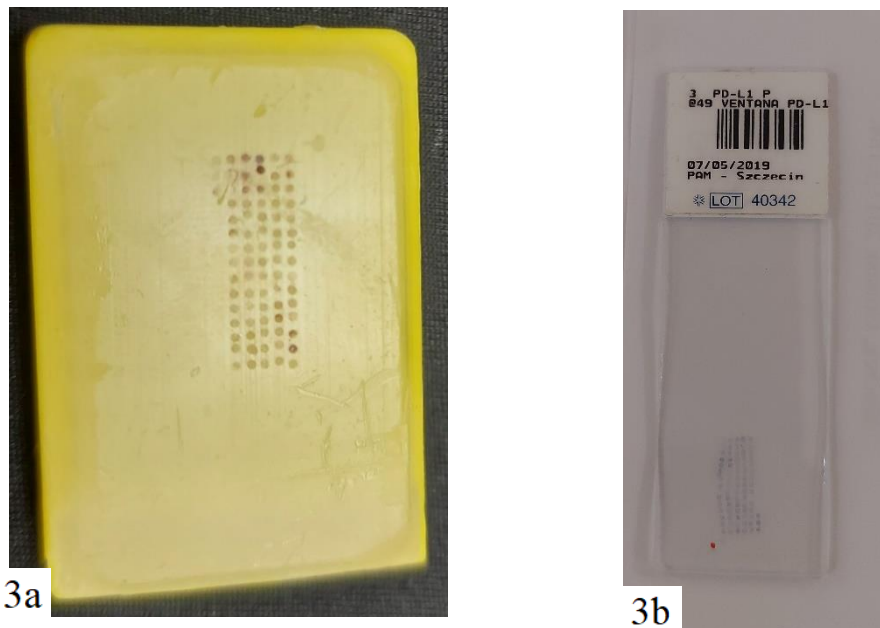
W tym przypadku wykorzystano urządzenie Manual Tissue Arrayer (MTA; Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) (Ryc. 2). Pusty bloczek parafinowy umieszczono w uchwycie urządzenia i pobrano z każdego przypadku po trzy rdzenie tkankowe, każdy o średnicy 0,6 mm. Pobrane rdzenie umieszczane były w tym bloczku parafinowym w jednomilimetrowych odstępach, po 15 rdzeni w rzędzie. Jeden rząd stanowiło zatem 5 przypadków. W jednym bloczku parafinowym wykonano cztery lub pięć rzędów po 15 rdzeni oraz jeden krótszy (3-6 rdzeni), co umożliwiło orientację

macierzy po wykonaniu barwień immunohistochemicznych (Ryc. 3). Przygotowano cztery mikromacierze i sporządzono tabelę, która pełniła rolę mapy, pozwalającej zidentyfikować położenie poszczególnych wycinków, odpowiadających określonym przypadkom.

Ryc. 2. Urządzenie do wykonywania mikromacierzy tkankowych Manual Tissue Arrayer (MTA).



Ryc. 3. Mikromacierz tkankowa (3a) oraz zabarwiony preparat wykonany z tej macierzy (3b).



3.4. Reakcje immunohistochemiczne

W celu oceny ekspresji białek PD-1 i PD-L1 wykonano barwienia immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko wymienionym białkom.

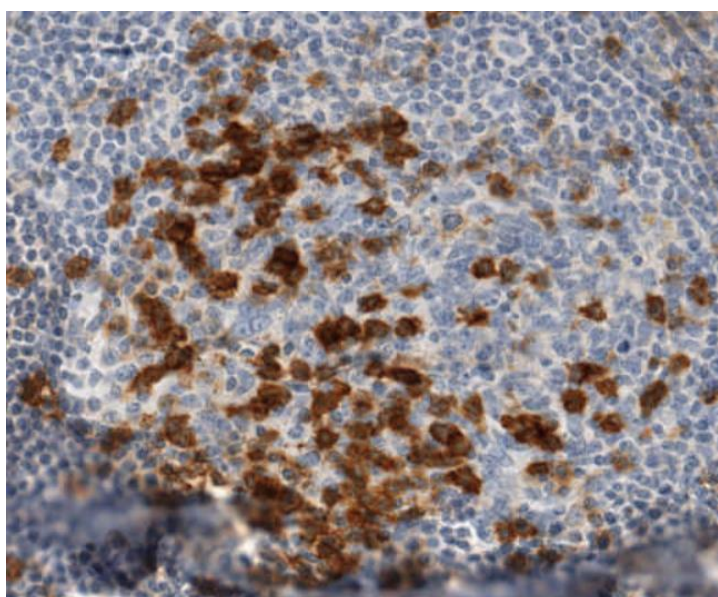
3.4.1. Reakcja z przeciwciałem monoklonalnym anti-PD-1

Do oceny ekspresji receptora PD-1 wykorzystano mysie przeciwciało monoklonalne (NAT105; Roche Diagnostics Polska; nr katalogowy 07099029001). Przeciwciało to jest rozcieńczone optymalnie do postaci kompatybilnej z zestawami do detekcji VENTANA oraz urządzeniami BenchMark (Roche Diagnostics Polska). Jest to system zamknięty, w którym warunki takie jak rozcieńczenia odczynników czy czasy inkubacji zostały ściśle określone przez producenta. System ten ma zapewnić powtarzalność wyników.

Różnice jakie mogą występować w procedurach utrwalania tkanek, jak i procedurach technicznych w laboratoriach, mogą przyczyniać się do istotnej zmienności wyników, co wymaga regularnego stosowania kontroli. Kontrolę dla PD-1, zgodnie z zaleceniem firmy Roche Diagnostics Polska, stanowią limfocyty w utkaniu migdałka (Ryc. 4). W tym celu również wykorzystano archiwalny bloczek parafinowy i preparat histologiczny wycinka z migdałka, uzyskany z Zakładu Patomorfologii PUM w Szczecinie. Z przygotowanych wcześniej mikromacierzy oraz bloczka stanowiącego kontrolę przygotowano na mikrotomie rotacyjnym skrawki grubości 4 μm i umieszczono je na szkiełkach do wykonywania barwień immunohistochemicznych, po czym inkubowano w 59°C przez 60 minut. Następnie preparaty do zabarwienia, przeciwciała oraz dozowniki zestawu detekcji UltraView umieszczono w aparacie BenchMark (Roche Diagnostics Polska) i uruchomiono automatyczny proces barwienia.

Po zakończeniu procesu barwienia, zabarwione preparaty wyjęto z aparatu i przepłukano buforem płuczącym (przez około 10 minut), a następnie wodą bieżącą. Końcowym etapem było poddanie preparatów odwodnieniu poprzez dwukrotne ich zanurzenie w szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu: 70% - 2x2 minuty, 96% - 2x2 minuty i 100% - 2x2 minuty oraz poprzez trzykrotne zanurzenie w ksylień po 2 minuty. Na koniec na preparaty nałożono balsam i przykryto szkiełkiem nakrywkowym.

Ryc. 4. Odczyn cytoplazmatyczny w limfocytach w migdałku jako kontrola pozytywna w reakcji z przeciwciałem przeciw receptorowi PD-1.



3.4.2. Reakcja z przeciwciałem monoklonalnym anty-PD-L1

Do oceny ekspresji ligandu PD-L1 wykorzystano królicze monoklonalne przeciwciało przeciw PD-L1 (VENTANA SP263; Roche Diagnostics Polska; nr katalogowy 07419821001), które również otrzymano rozcieńczone optymalnie do postaci kompatybilnej z zestawami do detekcji VENTANA oraz urządzeniami BenchMark (Roche Diagnostics Polska). Zastosowane barwienie przeprowadzono również w systemie zamkniętym, w celu zapewnienia powtarzalności wyników.

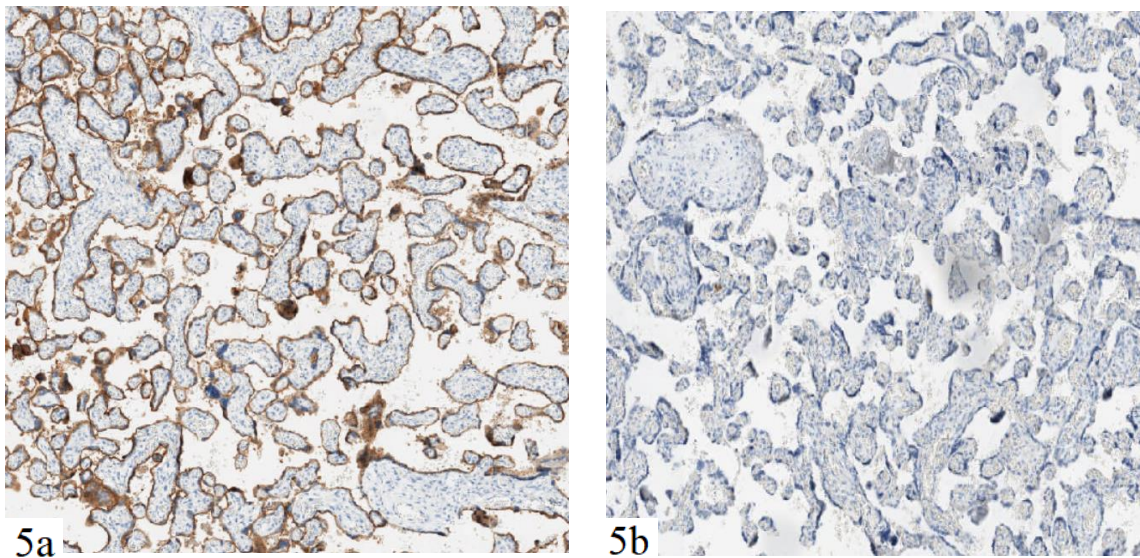
Test VENTANA PD-L1 (SP263) wymaga przygotowania dwóch wycinków z każdego przypadku – jednego do reakcji z przeciwciałem VENTANA PD-L1 (SP263) i drugiego do kontroli negatywnej. Kontrola negatywna z monoklonalną króliczą immunoglobuliną (Rabbit Monoclonal Negative Control; Roche Diagnostics Polska; nr katalogowy 06683380001) wykorzystywana jest do oceny obecności tła i ustalenia wartości wyjściowej intensywności barwienia. Jako kontrolę tkankową dla testu VENTANA PD-L1 (SP263) zastosowano, zgodnie z zaleceniem firmy Roche Diagnostics Polska, tkankę ludzkiego łożyska z trzeciego trymestru ciąży, która wykazuje wybarwienie błony komórkowej komórek trofoblastu (Ryc. 5). W tym celu także wykorzystano archiwalny bloczek parafinowy, z wycinkami z łożyska, badany w Zakładzie Patomorfologii PUM w Szczecinie, po wcześniejszej analizie preparatów HE z wybranego badania histopatologicznego.

Z przygotowanych wcześniej mikromacierzy oraz bloczka stanowiącego kontrolę przygotowano skrawki grubości 4 μm i umieszczono je na szkiełkach do barwień immunohistochemicznych. Następnie preparaty umieszczono w cieplarni i inkubowano przez godzinę w 59°C. Odparafinowane szkiełka przeniesiono do urządzenia VENTANA BenchMark (Roche Diagnostics Polska), które pozwala na automatyczne przeprowadzenie reakcji barwienia, dzięki wykorzystaniu systemu detekcji OptiView DAB Detection Kit, Bluing Reagent oraz hematoksyliny II kompatybilnych z urządzeniami BenchMark (Roche Diagnostics Polska).

Po zakończeniu procesu barwienia w urządzeniu, preparaty poddano płukaniu przez 10 minut w wodzie z detergentem, a następnie pod wodą bieżącą. W kolejnym etapie preparaty odwodniono z użyciem szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu: 70% - 2x2 minuty, 96% - 2x2 minuty i 100% - 2x2 minuty oraz poprzez trzykrotne zanurzenie w

ksylenie po 2 minuty. Na zabarwione i odwodnione preparaty naniesiono balsam i przykryto szkiełkami nakrywkowymi.

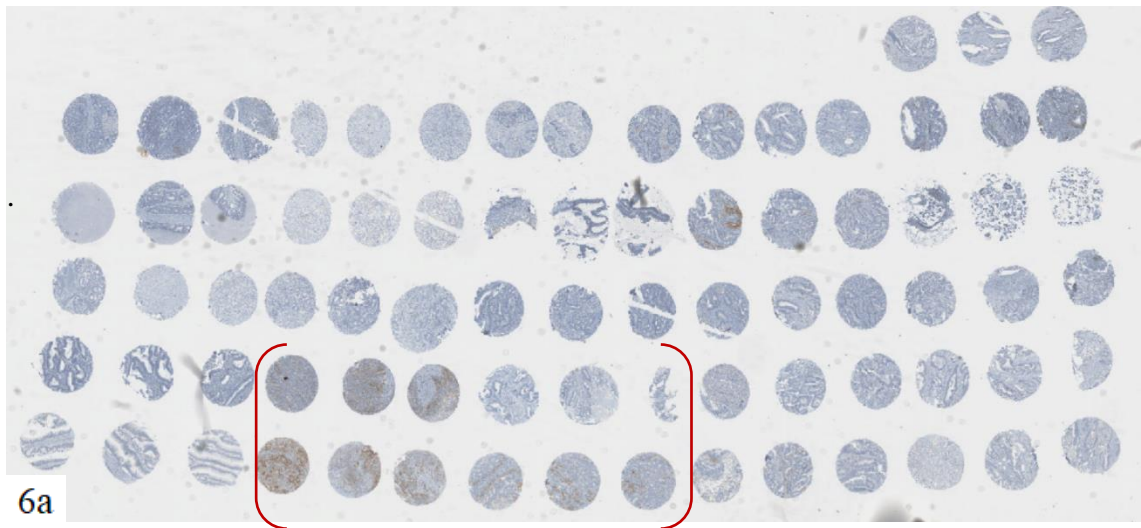
Ryc. 5. Reakcja z przeciwciałem przeciw białku PD-L1 - odczyn błonowy w komórkach trofoblastu kosmków łożyskowych jako kontrola pozytywna (5a) oraz reakcja z monoklonalną króliczą immunoglobuliną - brak odczynu w komórkach trofoblastu jako kontrola negatywna (5b).



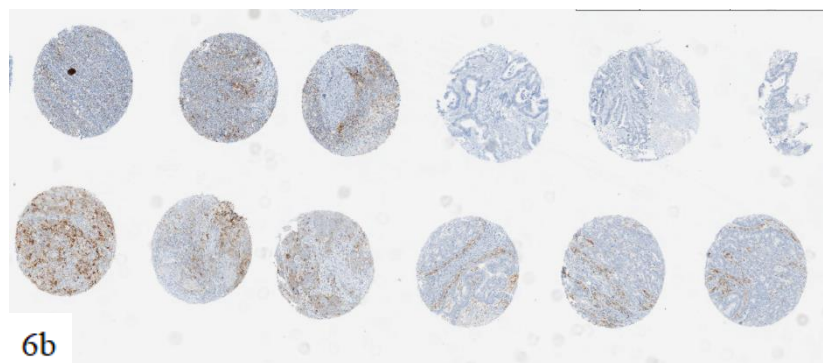
3.5. Ocena wyników

Obecność ekspresji białek PD-1 w limfocytach oraz PD-L1 w komórkach rakowych i/lub limfocytach w zabarwionych preparatach immunohistochemicznych została najpierw oceniona przez doświadczonego patomorfologa, a następnie zastosowano wirtualną analizę obrazu, co miało na celu ujednolicenie i wystandaryzowanie wyników. Preparaty zeskanowano z wykorzystaniem skanera APERIO CS (Aperio Technologies Inc. California, USA). Do analizy obrazu wykorzystano oprogramowanie, które nakłada algorytmy oceny barwienia bezpośrednio na zeskanowany obraz (Image Scope Version 11.2.0.780; Aperio Technologies Inc. 2003-2012). Dla potrzeb badań wykonywanych w niniejszej pracy wykorzystano odpowiednio algorytmy do oceny odczynu cytoplazmatycznego dla białka PD-1 (cytoplasmic v2) i odczynu błonowego dla białka PD-L1 (membrane v9).

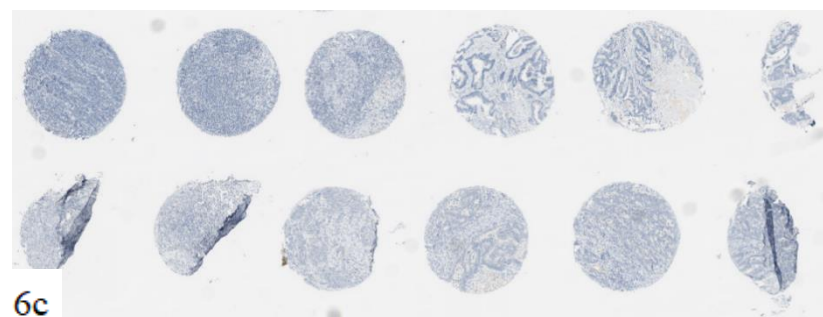
Ryc. 6a. Zeskanowany preparat z macierzą tkankową z barwieniem immunohistochemicznym (przeciwciała anti-PD-L1).



Ryc. 6b. Fragment powyższej macierzy tkankowej z barwieniem immunohistochemicznym (przeciwciała anti-PD-L1)



Ryc. 6c. Fragment powyższej macierzy tkankowej z zastosowaniem kontroli negatywnej.



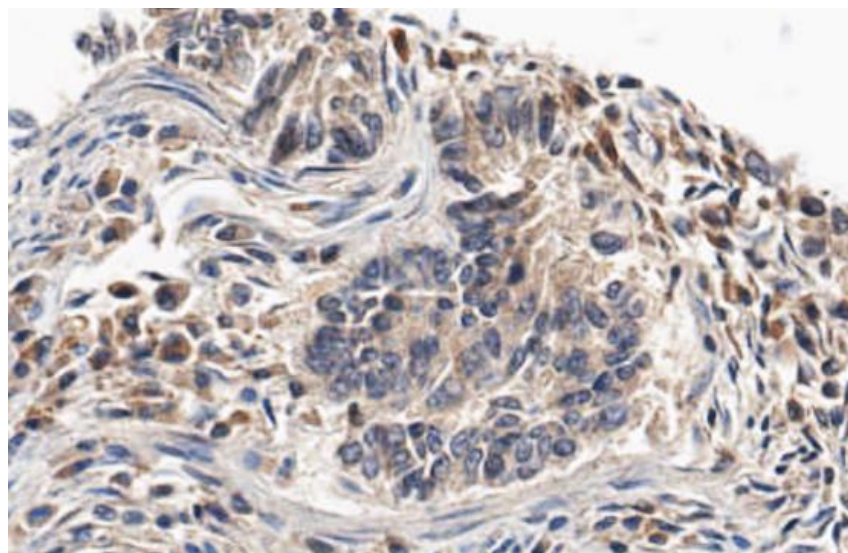
3.5.1. Algorytm cytoplazmatyczny

W przypadku odczynu cytoplazmatycznego, algorytm cytoplasmic v2 pozwala na ocenę liczby komórek z ekspresją danego białka, a także umożliwia ocenę intensywności zabarwienia tych komórek. W przypadku białka PD-1 oceniano reakcję w limfocytach naciekających utkanie guza, jak i znajdujących się w okolicy guza (Ryc. 7). W celu analizy intensywności zabarwienia w limfocytach zastosowano analizę, która polegała na zaznaczeniu wybranego obszaru do analizy, a następnie dodawaniu kolejnych warstw i analizowaniu kolejnych fragmentów. Pozwoliło to na analizę wybranych fragmentów w kolejnych warstwach adnotacji. Analiza ta pozwoliła na ocenę ilościową i jakościową efektu reakcji w wycinkach z guzów jelita grubego. Uzyskano liczbę ogólną analizowanych limfocytów oraz liczbę limfocytów z ekspresją immunohistochemiczną receptora PD-1. Ponadto przy pomocy komputerowej analizy obrazu (Aperio System) oznaczono intensywność ekspresji receptora PD-1 [0, odczyn słaby (1+), odczyn o średniej intensywności (2+), odczyn silny (3+)]. Ekspresja danego białka została oceniona zgodnie z uzyskaną wartością H-Score, której wzór przedstawia się następująco [5, 123]:

$$\text{H-Score} = 1x (\% \text{ komórek } 1+) + 2x (\% \text{ komórek } 2+) + 3x (\% \text{ komórek } 3+);$$

wartość H-Score występuje zatem w zakresie 0-300 i nazywana jest w dalszej części ekspresją.

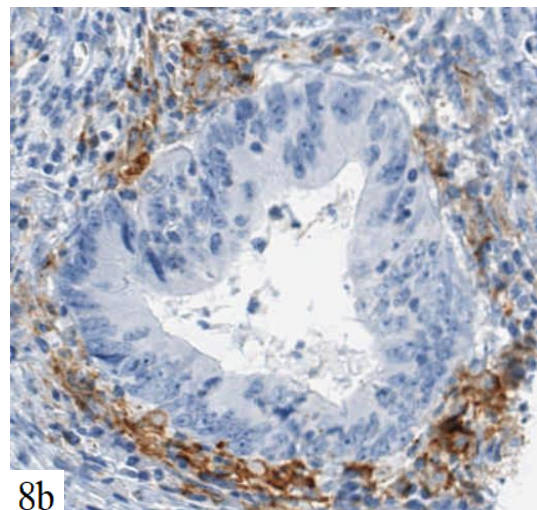
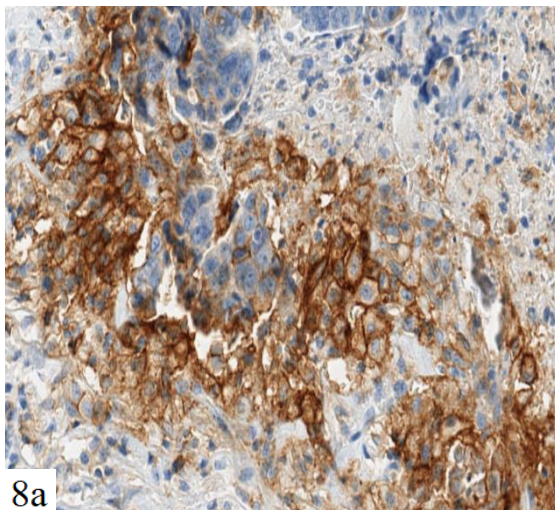
Ryc. 7. Ekspresja białka PD-1 w cytoplazmie limfocytów w obrębie guza.



3.5.2. Algorytm błonowy

W przypadku odczynu błonowego wykorzystano algorytm membrane v9 przeznaczony do oceny statusu receptora HER2, który jest również zalecany przez producenta do oceny ekspresji innych białek w błonie komórkowej. W przypadku białka PD-L1 oceniano ekspresję w błonie komórkowej komórek rakowych (Ryc. 8a) oraz limfocytów naciekających utkanie guza i okolice guza (Ryc. 8b). W tym przypadku algorytm również pozwala uzyskać odsetek komórek wykazujących ekspresję tego białka, a także ocenić intensywność odczynu immunohistochemicznego. Wykorzystano komputerową analizę obrazu (Aperio System), która pozwoliła uzyskać ocenę ilościową poprzez obliczenie liczby ogólnej analizowanych komórek oraz liczby i odsetka komórek, które wykazują ekspresję danego białka. Przeprowadzono też ocenę jakościową poprzez oznaczenie intensywności ekspresji białka PD-L1 [0, odczyn słaby (1+), odczyn o średniej intensywności (2+), odczyn silny (3+)]. Do dalszych analiz wykorzystano opisany wcześniej wzór na uzyskanie wartości H-Score.

Ryc. 8. Ekspresja białka PD-L1 w błonie komórkowej komórek rakowych (8a) i w błonie komórkowej limfocytów otaczających cewkę rakową (8b).



3.6. Ocena przeżycia pacjentów

Dane na temat zgonów pacjentów uzyskano z bazy danych (stan na dzień 07.12.2022), jaką dysponuje Centralny Ośrodek Informatyki (Departament Zarządzania Systemami). Analizowane dane dotyczą zgonów badanej grupy w okresie pięciu lat od postawienia diagnozy, co u pacjentów z grupy badanej miało miejsce w 2017 roku.

3.7. Analiza statystyczna

Rozkłady zmiennych mierzalnych sprawdzono testem Shapiro-Wilka. Zmienne te to: mediany, średnie, odchylenia standardowe, kwartyle, a także wartości minimalne i maksymalne, które w większości odbiegały od rozkładu normalnego, w związku z czym zastosowano testy nieparametryczne. Różnice statystyczne pomiędzy dwiema grupami, które wyodrębniono na podstawie danych kliniczno-morfologicznych, sprawdzono z wykorzystaniem testu Mann-Whitney. W przypadku porównywania więcej grup zastosowano test Kruskal-Wallis.

W celu oznaczenia siły korelacji zastosowano korelację rang Spearman'a, a wyniki opisano poprzez prawdopodobieństwo p oraz współczynnik korelacji r .

Wykonano analizę przeżycia z zastosowaniem Log-rank (Mantel-Cox) Test (p^a) i Gehan-Breslow-Wilcoxon Test (p^b).

Wszystkie testy wykonano przy użyciu programu GraphPad Prism 8, a za istotne statystycznie uznano różnice z prawdopodobieństwem o wartości p (p -value) poniżej 0,05.

4. Wyniki

4.1. Porównanie ekspresji immunohistochemicznej białka PD-1 z ekspresją białka PD-L1

Ekspresję białka PD-1, która badana była w limfocytach towarzyszących naciekowi nowotworowemu w ścianie jelita, stwierdzono w 29 na 98 badanych przypadków. Ekspresję ligandu PD-L1 badano w limfocytach, a także w komórkach raka jelita grubego. Ekspresja białka PD-L1 została stwierdzona w limfocytach w 43 przypadkach, a w komórkach rakowych w 7 przypadkach.

Tab. 2. Rozkład ekspresji białka PD-1 oraz białka PD-L1.

| | Minimum | Maximum | Średnia | Mediana | Dolny kwartyl | Górny kwartyl | Odchylenie standardowe |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------------|---------------|------------------------|
| PD-1 | 0,00 | 108,95 | 6,29 | 0,00 | 0,00 | 5,49 | 16,84 |
| PD-L1 GUZ | 0,00 | 227,15 | 9,62 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 37,81 |
| PD-L1 LIMFOCYTY | 0,00 | 131,22 | 36,98 | 0,00 | 0,00 | 79,13 | 45,02 |

Analiza danych uzyskanych z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka (Tab. 2) wykazała, że rozkład badanych zmiennych odbiegał od rozkładu normalnego. W związku z tym w analizie statystycznej zastosowano testy nieparametryczne.

W przypadkach, gdzie wystąpiła ekspresja białka PD-1 i PD-L1, poziom ekspresji białka PD-1 (5,12-108,95) był niższy niż poziom ekspresji białka PD-L1 zarówno w limfocytach jak i w komórkach rakowych. Poziom ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych (44,80-227,15) był wyższy niż poziom ekspresji tego białka w limfocytach

(29,09-131,22). Dane te przedstawiono w Tab. 3. W dalszych analizach uwzględniano jednak wszystkie badane przypadki: z ekspresją białek PD-1 i PD-L1, jak i z brakiem ekspresji.

Tab. 3. Rozkład dodatniej ekspresji białka PD-1 oraz białka PD-L1.

| | Minimum | Maximum | Średnia | Mediana | Dolny kwartył | Górny kwartył | Odczylenie standardowe |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------------|---------------|------------------------|
| PD-1 | 5,12 | 108,95 | 21,26 | 10,38 | 6,05 | 20,78 | 4,74 |
| PD-L1 GUZ | 44,80 | 227,15 | 134,60 | 149,40 | 77,93 | 156,60 | 22,28 |
| PD-L1 LIMFOCYTY | 29,09 | 131,22 | 84,28 | 80,52 | 67,16 | 104,40 | 3,74 |

Tab. 4. Korelacja ekspresji białka PD-1 i białka PD-L1 w badanych komórkach, gdzie * to $p < 0,05$.

| | PD-1 | PD-L1 GUZ | PD-L1 LIMFOCYTY |
|-----------------|-------------|--------------|-----------------|
| PD-1 | X | 0,2021 * | 0,2248 * |
| PD-L1 GUZ | 0,2021 * | X | -0,2321 * |
| PD-L1 LIMFOCYTY | 0,2248 * | -0,2321 * | X |

W Tab. 4. przedstawiono korelację poziomu ekspresji białek PD-1 w limfocytach i PD-L1 w komórkach rakowych jelita grubego i limfocytach towarzyszących naciekowi nowotworowemu. Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację między obecnością ekspresji białka PD-1 w limfocytach a ekspresją jego ligandu PD-L1 w komórkach guza ($r=0,2021$, $p=0,0459$) oraz między ekspresją białka PD-1 a ekspresją jego ligandu PD-L1 w limfocytach ($r=0,2248$, $p=0,0261$), a także ujemną korelację między ekspresją białka PD-L1 w komórkach rakowych, a ekspresją tego białka w limfocytach ($r=-0,2321$, $p=0,0215$). Wzajemne silne powiązania wskazują, że przypadki, w których stwierdzono występowanie ekspresji w białku PD-1, wykazywały w większości także ekspresję białka PD-L1 w limfocytach lub w komórkach guza jelita grubego. Sugeruje to synergistyczny mechanizm regulacji ekspresji tych białek. W przypadkach, w których wystąpiła ekspresja białka PD-L1 w komórkach rakowych, nie wykazano ekspresji białka PD-L1 w limfocytach.

4.2. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a wybrane parametry kliniczno-morfologiczne

Wykonano analizę (Tab. 5) z wykorzystaniem testu Mann-Whitney porównując poziom ekspresji białek PD-1 (w limfocytach) i PD-L1 (w guzie i w limfocytach): z płcią (kobieta vs mężczyzna), wiekiem (<69 vs ≥ 69), lokalizacją guza jelita grubego (prawa vs lewa), obecnością przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych wg pTNM (N0 vs N1+N2) oraz z wykorzystaniem testu Kruskal-Wallis porównując poziom ekspresji białek PD-1 i PD-L1 ze stopniem zaawansowania klinicznego (I vs II vs III vs IV), głębokością naciekania wg pTNM (T2 vs T3 vs T4) i stopniem złośliwości histologicznej (G1 vs G2 vs G3).

Tab. 5. Ekspresja białek PD-1 i PD-L1 a wybrane parametry kliniczno-morfologiczne.

| PARAMETR | GRUPA | LICZBA PRZYPADKÓW | PD-1 | PD-L1 GUZ | PD-L1 LIMFOCYTY |
|--|----------|-------------------|---------------|---------------|-----------------|
| | | | p-value | | |
| Płeć | kobieta | 41 | 0,5051 | 0,0180 | 0,5532 |
| | męczyzna | 57 | | | |
| Wiek (średnia) | <69 | 48 | 0,0036 | 0,9918 | 0,4101 |
| | ≥69 | 50 | | | |
| Lokalizacja guza (prawa/lewa) | prawa | 37 | 0,9926 | 0,1002 | 0,0963 |
| | lewa | 61 | | | |
| Stopień zaawansowania klinicznego | I | 13 | 0,0112 | 0,9049 | 0,0428 |
| | II | 32 | | | |
| | III | 49 | | | |
| | IV | 4 | | | |
| Głębokość naciekania (T) | T2 | 17 | 0,2677 | 0,5349 | 0,6153 |
| | T3 | 57 | | | |
| | T4 | 24 | | | |
| Stopień złośliwości histologicznej (G) | G1 | 3 | 0,8760 | 0,0457 | 0,2369 |
| | G2 | 89 | | | |
| | G3 | 6 | | | |
| Stan okolicznych węzłów chłonnych (N) | N0 | 45 | 0,0073 | 0,6492 | 0,0045 |
| | N1+N2 | 53 | | | |

4.2.1. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a płeć pacjentów

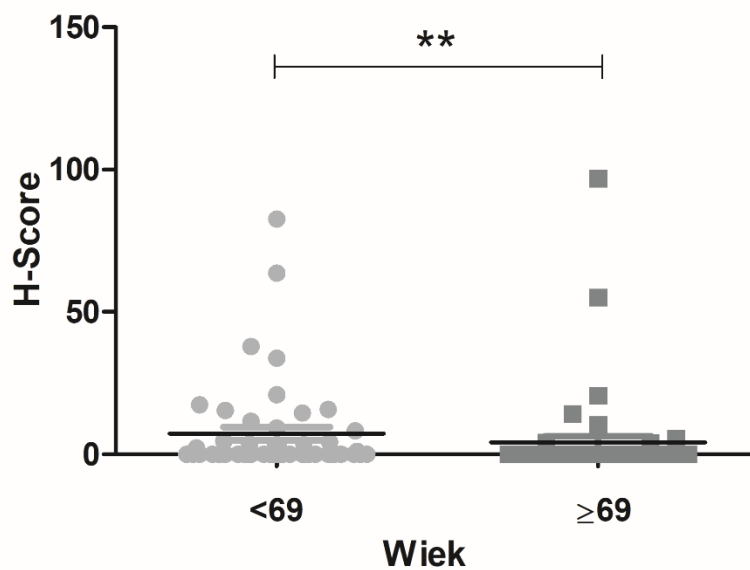
Wykazano (Tab.5), że w rakach jelita grubego istotna statystycznie zależność z płcią występuje jedynie w przypadku ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych ($p=0,0180$), co obrazuje rycina 9.

Dodatkowo wykonano analizę (Tab. 6) z zastosowaniem korelacji porządku rang Spearmana. Zbadano korelację między ekspresją badanych białek a płcią. Nadano wartość 0-1 odpowiednio dla kobiet (0) i mężczyzn (1) i wykazano statystycznie istotną korelację między ekspresją białka PD-L1 w komórkach rakowych a płcią – ekspresja tego białka jest rzadziej obecna u mężczyzn niż u kobiet, a mianowicie:

10. Nie wykazano istotnej statystycznie zależności między wiekiem a ekspresją białka PD-L1 zarówno w limfocytach jak i w komórkach rakowych.

Dodatkowo zbadano korelację między ekspresją badanych białek a wiekiem, wykonując analizę (Tab. 7) z zastosowaniem korelacji porządku rang Spearmana. Wydzielono dwie grupy na podstawie średniej wieku i nadano wartość 0-1 odpowiednio dla wieku <69 (0) i ≥69 (1). Wykazano istotną statystycznie ujemną korelację między ekspresją białka PD-1 a wiekiem – ekspresja tego białka częściej wykazuje dodatnie wartości u pacjentów poniżej 69 roku życia, czyli im starsi pacjenci tym rzadziej występuje ekspresja białka PD-1.

Ryc. 10. Związek ekspresji białka PD-1 z wiekiem, gdzie ** to $p < 0,01$.



Tab. 7. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z wiekiem.

| | PD-1 | | PD-L1 GUZ | | PD-L1 LIMFOCYTY | |
|------|------------|---------------|------------|---------|-----------------|---------|
| | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value |
| Wiek | -0,2924 | 0,0035 | -0,0259 | 0,8005 | -0,0843 | 0,4092 |

4.2.3. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a stopień zaawansowania klinicznego raka jelita grubego

Wykazano (Tab. 5) istotną statystycznie zależność między stopniem zaawansowania klinicznego raka jelita grubego a ekspresją białka PD-1 ($p=0,0112$), konkretnie między stopniem I a III zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (Ryc. 11) oraz w przypadku ekspresji białka PD-L1 w limfocytach ($p=0,0428$) między stopniem II a III zaawansowania choroby nowotworowej (Ryc. 12).

Wykonano także analizę (Tab. 8) z zastosowaniem korelacji porządku rang Spearmana. Nadano wartości 1-4 odpowiednio dla stopnia zaawansowania klinicznego I (1), II (2), III (3), IV (4).

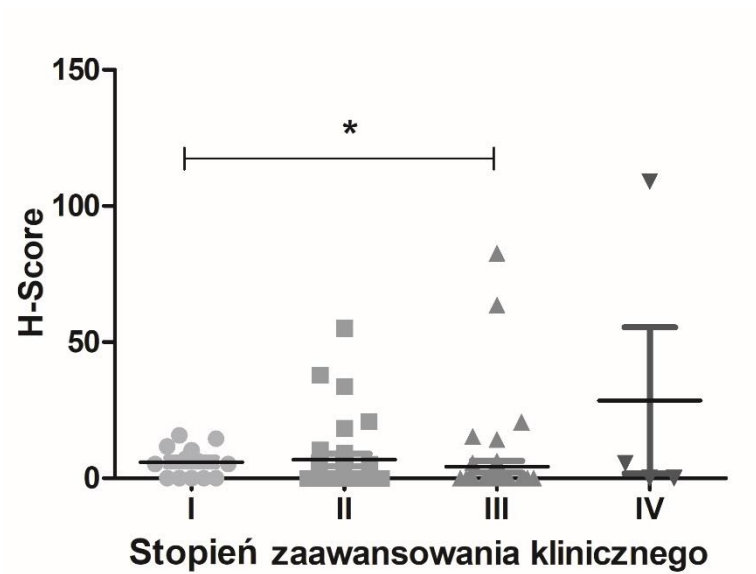
Wykazano istotną statystycznie ujemną korelację między ekspresją białka PD-1 a stopniem zaawansowania klinicznego: u pacjentów będących w I stopniu zaawansowania klinicznego występuje najwyższy odsetek przypadków z ekspresją białka PD-1, natomiast najniższy odsetek przypadków dodatniej ekspresji białka PD-1 obserwuje się u pacjentów w III stopniu zaawansowania klinicznego nowotworu.

Ponadto wykazano istotną statystycznie ujemną korelację między ekspresją białka PD-L1 w limfocytach a stopniem zaawansowania klinicznego: dodatnia ekspresja tego białka jest obecna najczęściej u pacjentów będących w II stopniu zaawansowania klinicznego. Najniższy odsetek przypadków ekspresji białka PD-L1 w limfocytach obserwuje się natomiast u pacjentów w III stopniu zaawansowania klinicznego nowotworu.

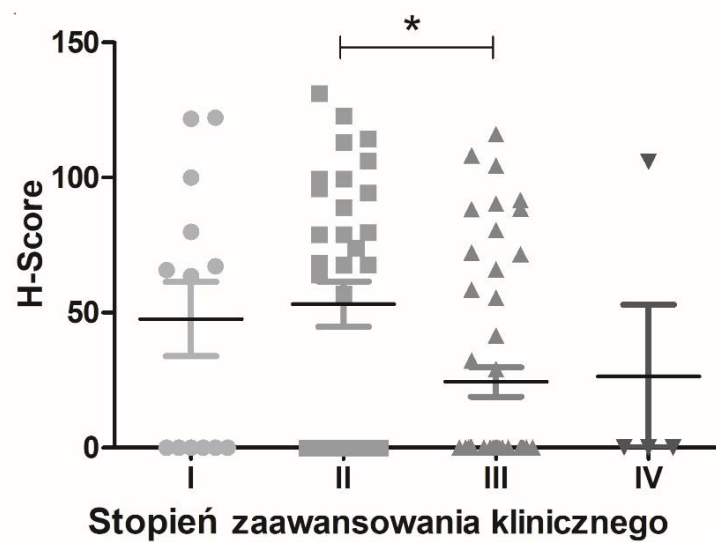
Tab. 8. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu.

| | PD-1 | | PD-L1 GUZ | | PD-L1 LIMFOCYTY | |
|-----------------------------------|------------|---------------|------------|---------|-----------------|---------------|
| | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value |
| Stopień zaawansowania klinicznego | -0,2600 | 0,0097 | -0,0623 | 0,5425 | -0,2581 | 0,0103 |

Ryc. 11. Związek ekspresji białka PD-1 ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu, gdzie * to $p < 0,05$.



Ryc. 12. Związek ekspresji białka PD-L1 w limfocytach ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu, gdzie * to $p < 0,05$.

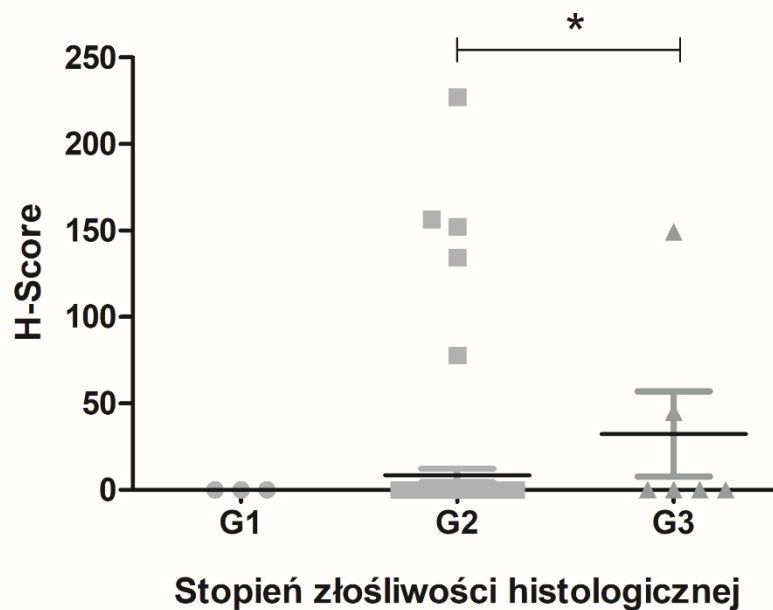


4.2.4. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a stopień złośliwości histologicznej guza

Wykazano (Tab. 5) istotną statystycznie zależność ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych od stopnia złośliwości histologicznej guza między stopniem G2 a G3 ($p=0,0457$), co przedstawia rycina 13.

Dodatkowo wykonano analizę (Tab. 9) z zastosowaniem korelacji porządku rang Spearmana. Zbadano korelację między ekspresją badanych białek a stopniem złośliwości histologicznej. Nadano wartości 1-3 odpowiednio dla stopnia G1 (1), G2 (2), G3 (3) i wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między stopniem złośliwości histologicznej a ekspresją białka PD-L1 w komórkach rakowych: u żadnego z pacjentów ze stopniem histologicznej złośliwości guza G1 nie stwierdzono ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych, a najwyższy odsetek przypadków dodatniej ekspresji białka PD-L1 w guzie obserwuje się u pacjentów ze stopniem G3 – należy jednak mieć na uwadze, że grupa ze stopniem histologicznej złośliwości G3 liczy 6 z 98 pacjentów.

Ryc. 13. Związek ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych ze stopniem złośliwości histologicznej guza, gdzie * to $p<0,05$.



Tab. 9. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 ze stopniem złośliwości histologicznej guza.

| | PD-1 | | PD-L1 GUZ | | PD-L1 LIMFOCYTY | |
|---|------------|---------|------------|---------------|-----------------|---------|
| | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value |
| G | -0,0442 | 0,6660 | 0,2280 | 0,0239 | -0,1661 | 0,1021 |

4.2.5. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a stan okolicznych węzłów chłonnych

Wykazano (Tab. 5) istotną statystycznie zależność między stanem okolicznych węzłów chłonnych a ekspresją białka PD-1 ($p=0,0073$), co obrazuje rycina 14 oraz między stanem okolicznych węzłów chłonnych a ekspresją białka PD-L1 w limfocytach ($p=0,0045$), co przedstawia rycina 15.

Zbadano również korelację między ekspresją badanych białek a stanem okolicznych węzłów chłonnych. Wykonano analizę (Tab. 10) z zastosowaniem korelacji porządku rang Spearmana, wyodrębniając dwie grupy pacjentów: bez przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych (N0) i z występowaniem przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych (N1+N2) oraz przyporządkowując im odpowiednio wartości 0 i 1.

Wykazano istotną statystycznie ujemną korelację między ekspresją białka PD-1 a stanem okolicznych węzłów chłonnych. Obserwuje się, że ekspresja białka PD-1 częściej osiąga dodatnie wartości u pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych niż w przypadku pacjentów z przerzutami do okolicznych węzłów chłonnych.

Ponadto wykazano istotną statystycznie ujemną korelację między ekspresją białka PD-L1 w limfocytach a stanem okolicznych węzłów chłonnych. W tym przypadku ekspresja białka PD-L1 w limfocytach także częściej osiąga dodatnie wartości u pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych i są one zauważalnie wyższe niż w przypadku pacjentów z przerzutami do okolicznych węzłów chłonnych.

Tab. 10. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 ze stanem okolicznych węzłów chłonnych.

| | PD-1 | | PD-L1 GUZ | | PD-L1 LIMFOCYTY | |
|----|------------|---------------|------------|---------|-----------------|---------------|
| | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value |
| pN | -0,2705 | 0,0071 | -0,0592 | 0,5627 | -0,2868 | 0,0042 |

4.2.6. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a status genu KRAS

Analizę tej zależności (Tab. 11; Test Mann-Whitney) przeprowadzono w 28 przypadkach u pacjentów, u których ocena statusu genu KRAS została przeprowadzona w celach diagnostycznych. Odstąpiono od analizy w przypadku ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych, ponieważ w żadnym z wybranych przypadków w tej grupie ekspresja tego białka nie wystąpiła.

Tab. 11. Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 w limfocytach ze statusem genu KRAS (MUT - występowanie mutacji; WT - wild type = typ dziki = brak mutacji).

| PARAMETR | GRUPA | LICZBA PRZYPADKÓW | PD-1 | PD-L1 LIMFOCYTY |
|------------------|-------|-------------------|---------------|-----------------|
| | | | p-value | |
| Status genu KRAS | MUT | 14 | 0,0019 | 0,3083 |
| | WT | 14 | | |

Na podstawie powyższej analizy wykazano, że w rakach jelita grubego ekspresja białka PD-1 jest statystycznie istotnie zależna od statusu genu KRAS (Ryc. 16). W przypadku ekspresji białka PD-L1 w limfocytach zależności istotnych statystycznie nie wykazano.

4.2.7. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a nacieki limfocytarne

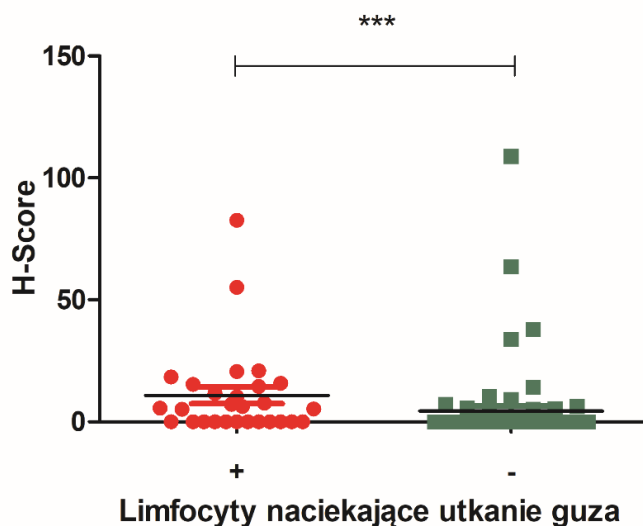
Zbadano związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z występowaniem limfocytów naciekających utkanie guza i okolicę guza (Tab. 13; Test Mann-Whitney). Na podstawie wykonanej analizy wykazano, że w rakach jelita grubego ekspresja białka PD-1 jest statystycznie istotnie zależna od występowania limfocytów naciekających utkanie guza (Ryc. 17).

Dodatkowo wykonano analizę (Tab. 14) z zastosowaniem korelacji porządku rang Spearmana. Zbadano korelację między obecnością ekspresji badanych białek a naciekiem limfocytarnym. Nadano wartości 0-1 odpowiednio dla przypadków, w których brak jest nacieku limfocytarnego (0) oraz w których obecny jest naciek limfocytarny (1). Wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między ekspresją białka PD-1 a występowaniem limfocytów naciekających utkanie guza. Dodatnia ekspresja PD-1 jest obecna w znacznie wyższym odsetku u pacjentów, u których występują limfocyty naciekające utkanie guza niż w przypadku pacjentów bez występowania limfocytów naciekających utkanie guza.

Tab. 13. Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z występowaniem limfocytów naciekających utkanie guza i zlokalizowanych w okolicy guza („+” naciek limfocytarny, a „-” brak nacieku limfocytarnego).

| PARAMETR | GRUPA | LICZBA PRZYPADKÓW | PD-1 | PD-L1 GUZ | PD-L1 LIMFOCYTY |
|------------------------------------|-------|-------------------|---------------|-----------|-----------------|
| | | | p-value | | |
| Limfocyty naciekające utkanie guza | + | 28 | 0,0001 | 0,2681 | 0,7142 |
| | - | 70 | | | |
| Limfocyty w okolicy guza | + | 34 | 0,8078 | 0,7340 | 0,5418 |
| | - | 64 | | | |

Ryc. 17. Związek ekspresji białka PD-1 z występowaniem limfocytów naciekających utkanie guza, gdzie *** to $p < 0,001$.



Tab. 14. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z naciekiem limfocytarnym.

| | PD-1 | | PD-L1 GUZ | | PD-L1 LIMFOCYTY | |
|------------------------------------|------------|---------------|------------|---------|-----------------|---------|
| | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value | Spearman r | p-value |
| Limfocyty naciekające utkanie guza | 0,3658 | 0,0002 | 0,0858 | 0,4007 | 0,0187 | 0,8548 |
| Limfocyty w okolicy guza | -0,0387 | 0,7050 | -0,0464 | 0,6503 | 0,0817 | 0,4237 |

4.2.8. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a pączkowanie guza

Porównano ekspresję białek PD-1 i PD-L1 z występowaniem cechy w budowie histologicznej raka jelita grubego, jaką jest pączkowania guza. Na podstawie wykonanej analizy (Tab. 15; Test Mann-Whitney) wykazano, że w rakach jelita grubego ekspresja białka PD-1 i białka PD-L1 nie jest statystycznie istotnie zależna od występowania pączkowania guza.

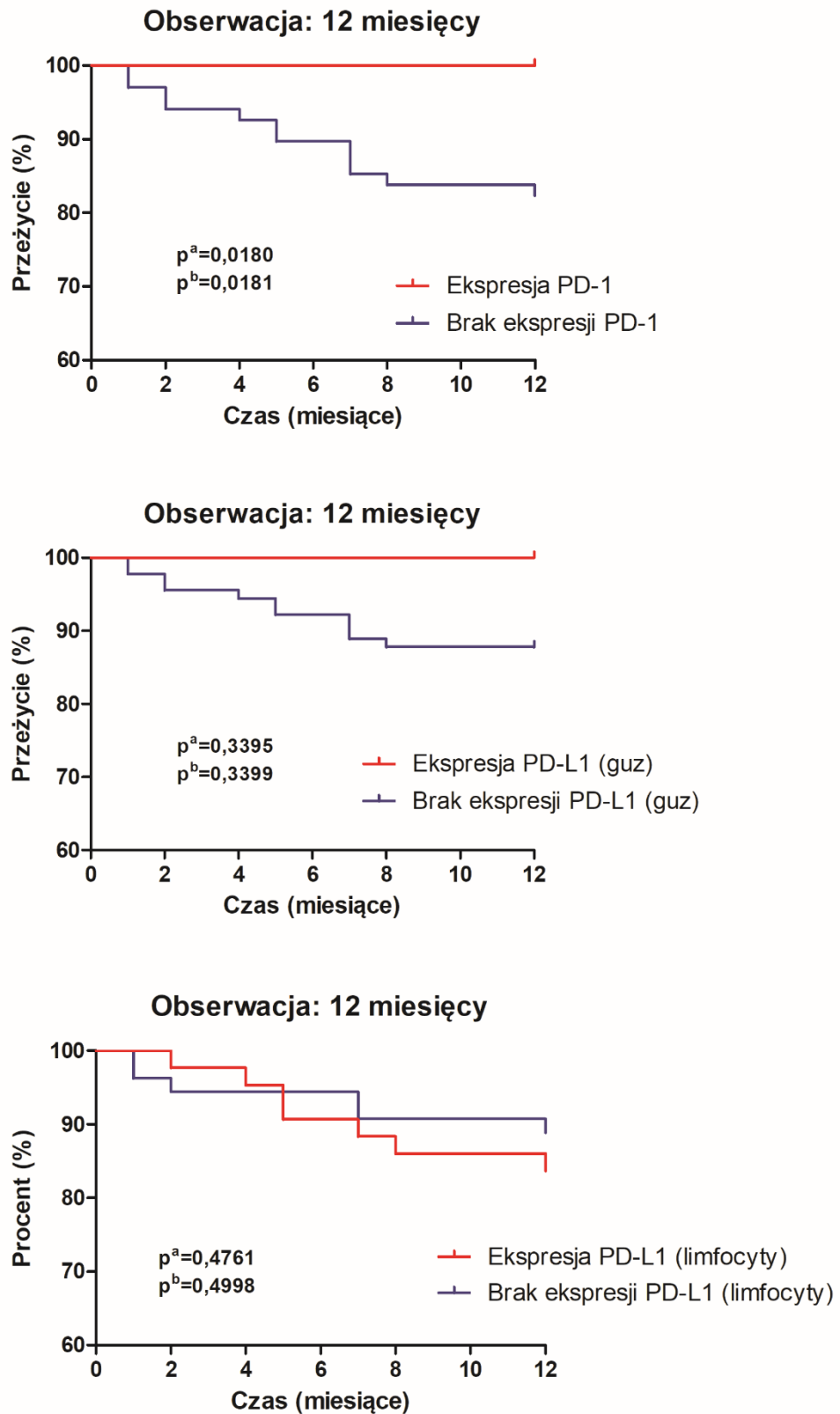
Tab. 15. Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z występowaniem pączkowania guza.

| PARAMETR | GRUPA | LICZBA PRZYPADKÓW | PD-1 | PD-L1 GUZ | PD-L1 LIMFOCYTY |
|------------------|-------|-------------------|---------|-----------|-----------------|
| | | | p-value | | |
| Pączkowanie guza | + | 37 | 0,6854 | 0,5023 | 0,8596 |
| | - | 61 | | | |

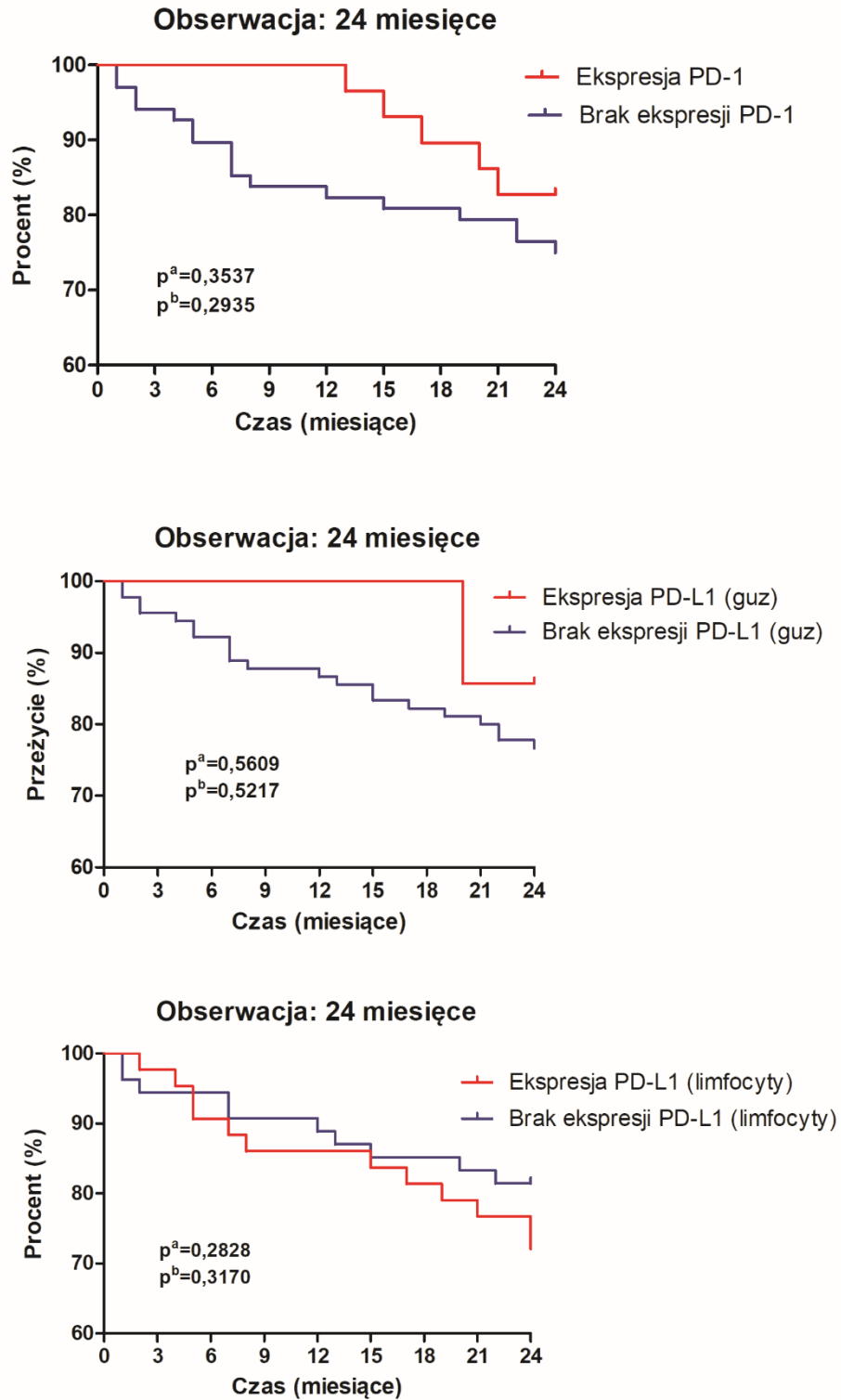
4.3. Ekspresja immunohistochemiczna białek PD-1 i PD-L1 a przeżycie pacjentów

Wykazano, że ekspresja białka PD-1 ma istotny statystycznie związek z przeżyciem pacjentów badanej grupy w pierwszym roku od momentu rozpoznania – 100% przeżycie u pacjentów z ekspresją białka PD-1 ($p=0,018$), brak jednak zależności istotnej statystycznie w kolejnych czterech latach od postawienia diagnozy. Nie stwierdzono zależności istotnej statystycznie między przeżyciem, a ekspresją białka PD-L1 ani w komórkach rakowych, ani w limfocytach. Dane te obrazują rycyny 18-22.

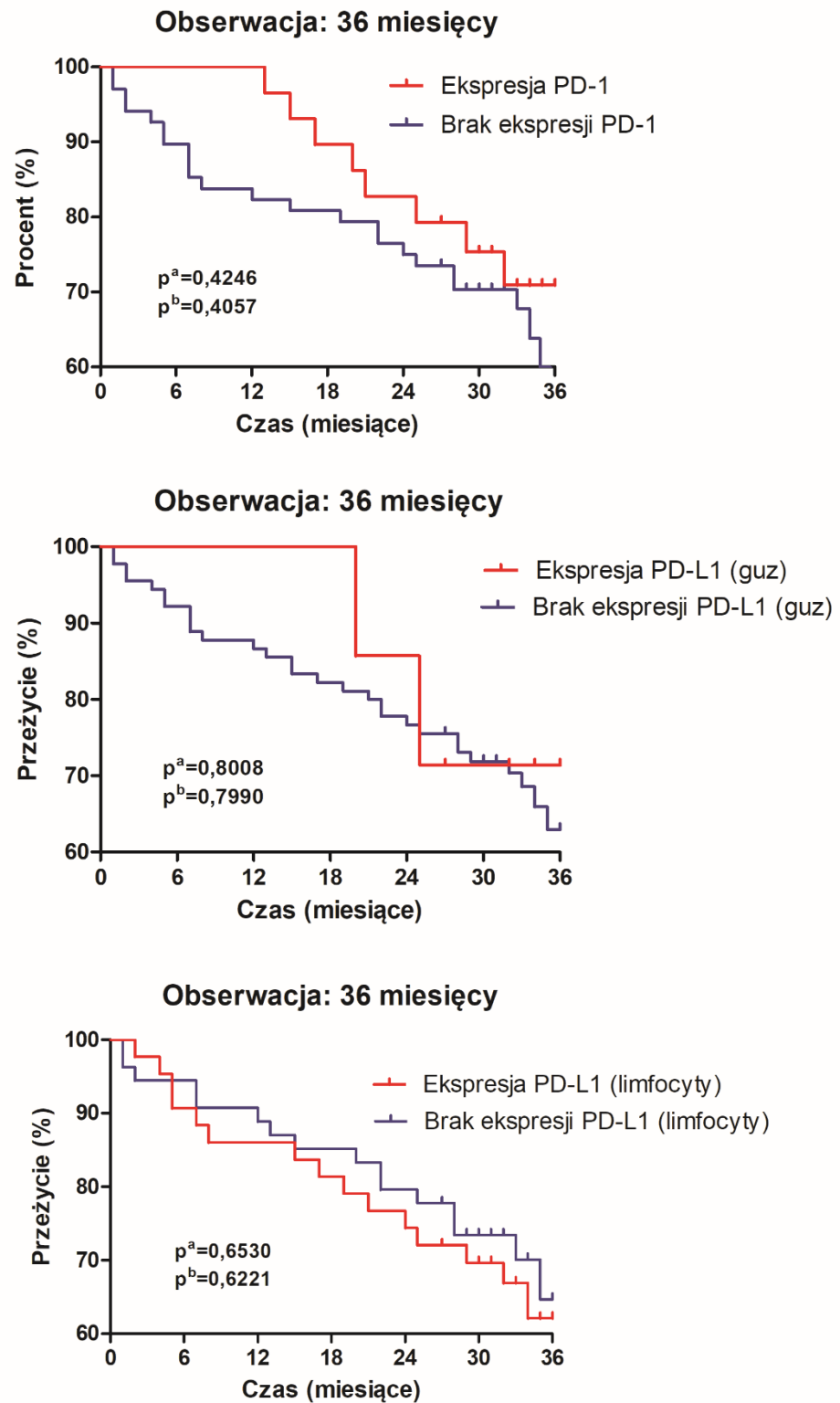
Ryc. 18. Przeżycie pacjentów po 12 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.



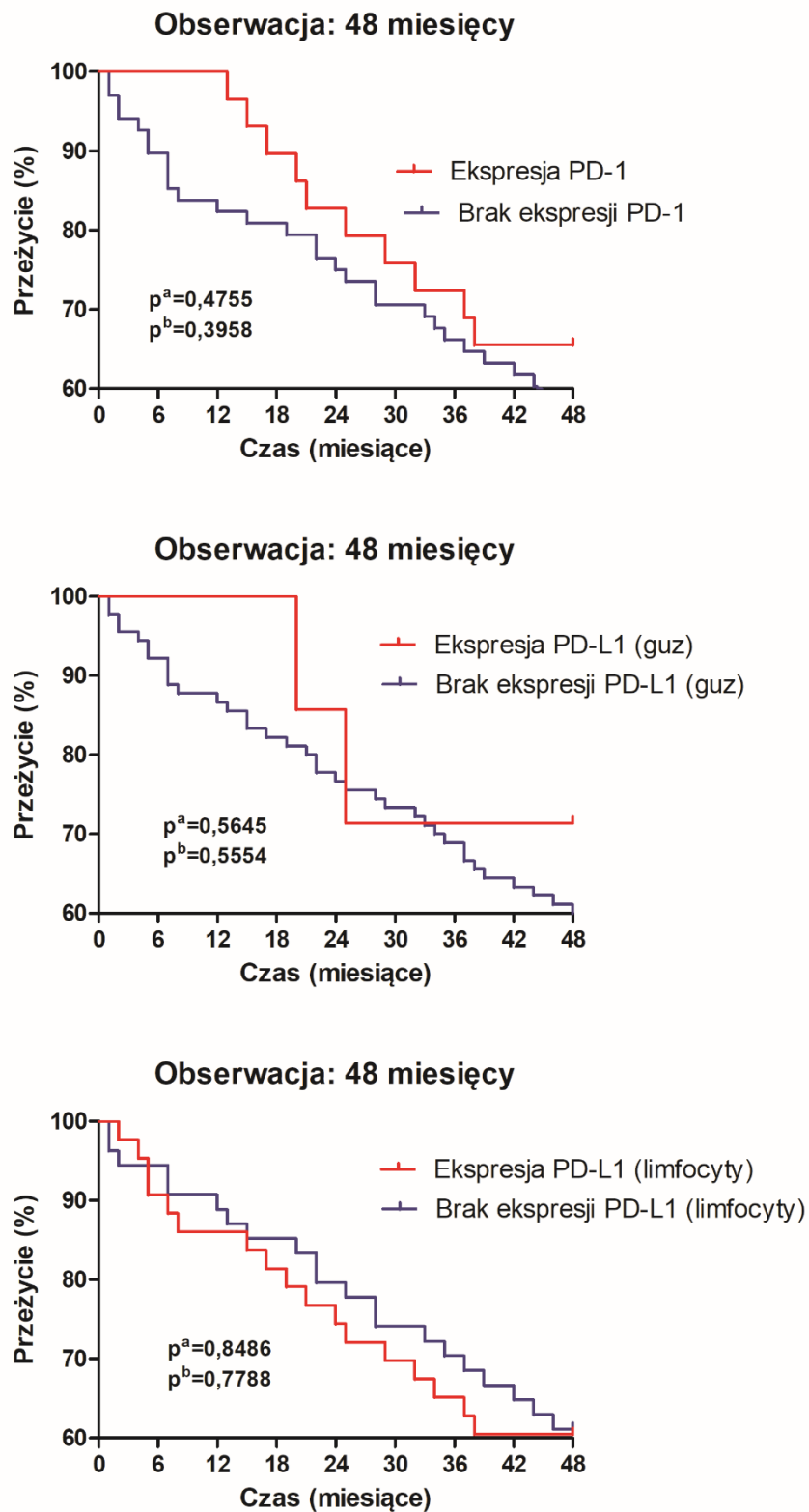
Ryc. 19. Przeżycie pacjentów po 24 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.



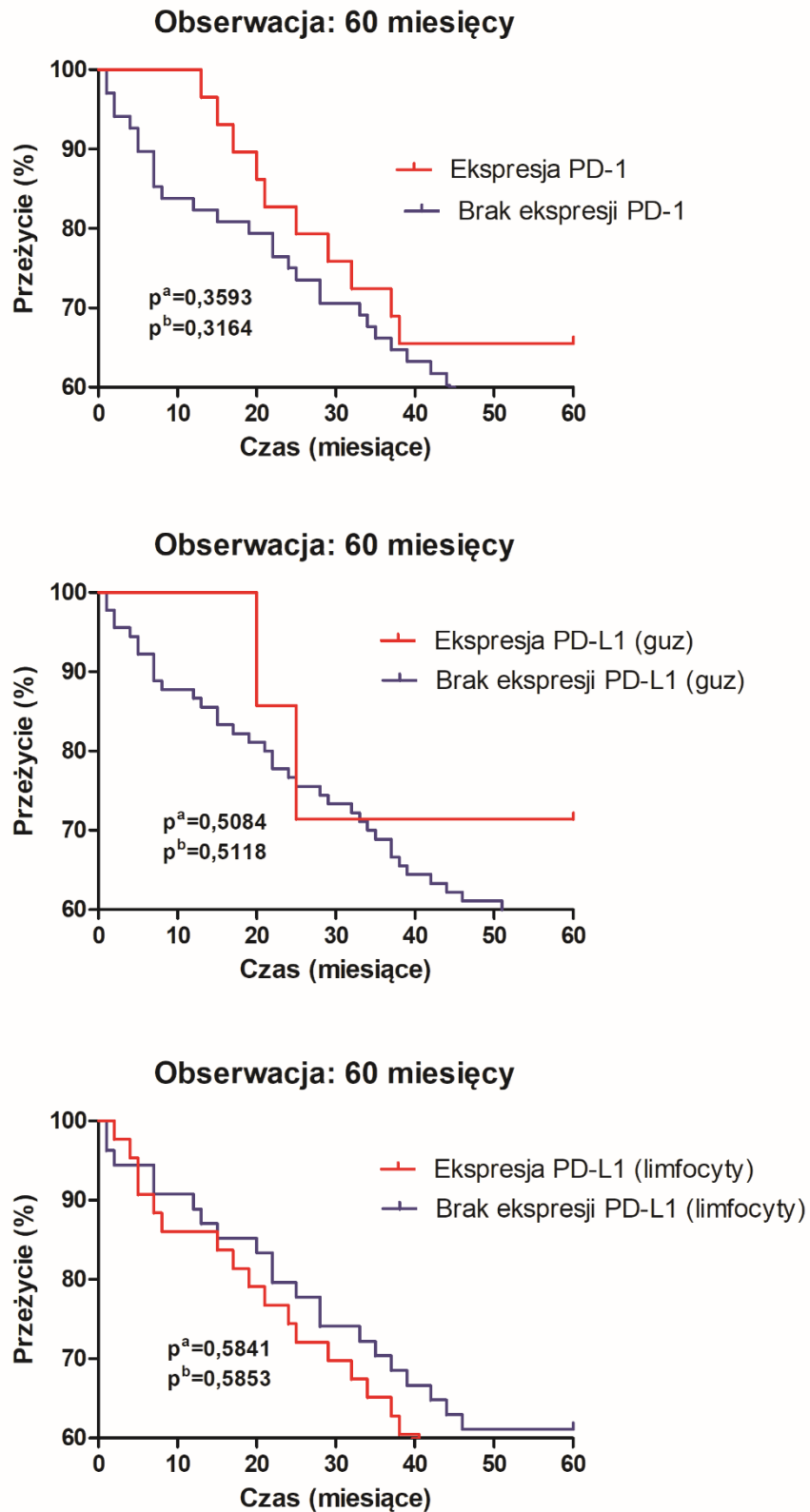
Ryc. 20. Przeżycie pacjentów po 36 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.



Ryc. 21. Przeżycie pacjentów po 48 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.



Ryc. 22. Przeżycie pacjentów po 60 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.



4.4. Podsumowanie wyników

1. Ekspresję białka PD-1 wykazano w 29 przypadkach, a jego ligandu – białka PD-L1 wykazano u 7 pacjentów w przypadku ekspresji w komórkach rakowych i u 43 pacjentów w przypadku ekspresji w limfocytach.
2. Wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między ekspresją białka PD-1 a ekspresją jego ligandu PD-L1 w komórkach rakowych, jak i w limfocytach, a także ujemną korelację między ekspresją białka PD-L1 w komórkach rakowych, a ekspresją białka PD-L1 w limfocytach. Wzajemne silne powiązania wskazują, że przypadki, w których stwierdzono występowanie ekspresji białka PD-1, wykazywały w większości także ekspresję białka PD-L1 w limfocytach lub w komórkach rakowych, co sugeruje synergistyczny mechanizm regulacji ekspresji tych białek. W przypadkach, w których wystąpiła ekspresja białka PD-L1 w komórkach guza, nie wykazano ekspresji białka PD-L1 w limfocytach.
3. W przypadku ekspresji białka PD-1 stwierdzono, że:
 - ekspresja PD-1 występuje częściej u pacjentów poniżej 69 roku życia niż u starszych pacjentów ($r=-0,2924$, $p=0,0035$)
 - ekspresja PD-1 jest częstsza u pacjentów, u których nie występują przerzuty do węzłów chłonnych ($r=-0,2705$, $p=0,0071$),
 - im wyższy stopień zaawansowania klinicznego tym u mniejszej liczby pacjentów stwierdza się ekspresję PD-1 ($r=-0,2600$, $p=0,0097$); wyjątek – stopień IV; grupa licząca tylko 4 pacjentów,
 - w przypadkach z mutacją w genie KRAS brak ekspresji białka PD-1 ($r=-0,6209$, $p=0,0004$),
 - w większości przypadków ekspresja białka PD-1 występuje w przypadkach z naciekiem limfocytarnym w utkaniu guza i jest ona wyższa niż u pacjentów, u których nie stwierdzono występowania TIL ($r=0,3840$, $p<0,0001$).

4. W przypadku ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych stwierdzono, że:
- ekspresja białka PD-L1 w komórkach rakowych występuje częściej u kobiet niż u mężczyzn ($r=-0,2432$, $p=0,0158$),
 - im wyższy stopień złośliwości histologicznej guza tym częściej występuje ekspresja białka PD-L1 w komórkach rakowych ($r=0,2280$, $p=0,0239$).
5. W przypadku ekspresji białka PD-L1 w limfocytach stwierdzono, że:
- ekspresja częściej występuje u pacjentów bez przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych i osiąga w tej grupie pacjentów wyższe wartości ($r=-0,2868$, $p=0,0042$),
 - ekspresja występuje najczęściej u pacjentów w II stopniu zaawansowania klinicznego, natomiast najniższy odsetek przypadków z ekspresją białka PD-L1 w limfocytach obserwuje się u pacjentów w III stopniu zaawansowania klinicznego nowotworu ($r=-0,2581$, $p=0,0103$).
6. Ekspresja białka PD-1 ma związek z przeżyciem w pierwszym roku po ustaleniu rozpoznania: 100% pacjentów z ekspresją białka PD-1 ($p=0,018$) przeżyło pierwszy rok od momentu ustalenia rozpoznania raka jelita grubego.

5. Dyskusja

Interakcje PD-1 (*programmed cell death protein 1*; białko programowanej śmierci komórki 1) i jego ligandu PD-L1 dotyczą procesów immunosupresyjnych w środowisku wzrostu nowotworów. W ostatniej dekadzie wprowadzono terapię przeciwciałami monoklonalnymi (anty-PD-1/anty-PD-L1) w celu blokowania aktywności pronowotworowej tego punktu kontrolnego. Wewnątrzkomórkowe procesy molekularne, z którymi jest związana aktywność PD-1 w limfocytach są skomplikowane. Aktywacja PD-1, poprzez połączenie z PD-L1, skutkuje supresją dwóch głównych szlaków sygnałowych PI3K-Akt-mTOR i RAS-MEK-ERK. Ma to wpływ na zahamowanie proliferacji i różnicowania limfocytów T, wyłączenie funkcji efektorowej limfocytów, upośledzenie aktywności limfocytów, a to z kolei pozwala komórkom rakowym uniknąć nadzoru immunologicznego poprzez uniknięcie procesu apoptozy [124]. Inhibitory PD-1/PD-L1 odgrywają istotną rolę jako środki immunomodulujące. Działają przeciwko wspomnianym procesom i powodują blokadę immunologicznego punktu kontrolnego [125]. Ekspresja białka PD-L1 na powierzchni komórek rakowych i białka PD-1 w limfocytach towarzyszących naciekowi raka jest istotnym wskaźnikiem predykcyjnym dla terapii przeciwciałami anty-PD-1 i anty-PD-L1 [126]. Odpowiedź kliniczną na terapię anty-PD-1/PD-L1 obserwuje się jednak tylko u nielicznych pacjentów. Obecnie bada się mechanizmy niezbędne do podniesienia skuteczności terapii anty-PD-1/PD-L1 [124].

Inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych znalazły zastosowanie w leczeniu różnych nowotworów złośliwych. W szczególności zastosowanie znalazły przeciwciała monoklonalne blokujące interakcję między PD-1 na powierzchni limfocytów, a PD-L1 na powierzchni komórek prezentujących antygen [127-129]. Wiele z tych produktów posiada licencję na leczenie rzutu pierwszego lub drugiego w przypadku złośliwych nowotworów u dorosłych [130]. Dobry efekt terapeutyczny osiągnęły przeciwciała monoklonalne anty-PD-1 niwolumab i pembrolizumab, które amerykańska FDA (*Food and Drug Administration*; Agencja ds. Żywności i Leków) w 2015 roku wprowadziła do programu leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca [131-132].

Dużym sukcesem terapeutycznym było połączenie inhibitorów PD-1 z chemioterapią jako leczenie pierwszego rzutu niedrobnokomórkowego raka płuca (*non-*

small cell lung carcinoma; NSCLC) [133-135]. Celowanie w syntezę i replikację DNA poprzez chemioterapię powoduje eliminowanie komórek rakowych, natomiast blokowanie punktu kontrolnego PD-1/PD-L1 stymuluje limfocyty T specyficzne dla nowotworu. Jest to spowodowane faktem, że po śmierci komórki następuje zwiększenie obecności antygenów nowotworowych, a to stymuluje limfocyty [136]. Biorąc zatem pod uwagę ten proces, wydaje się, że odpowiednie połączenie leczenia chemioterapeutykami z inhibitorami PD-1/PD-L1 może prowadzić do zwiększenia skuteczności terapii szczególnie u pacjentów z nowotworami mniej immunogennymi i wrażliwymi na chemioterapię [95]. Ponadto badania wskazują, że zastosowanie inhibitorów PD-1 i PD-L1 skojarzone z radioterapią u pacjentów z zaawansowanym NSCLC poprawia zarówno przeżycie całkowite jak i czas przeżycia wolny od wznowy. Jednakże przedmiotem badań pozostaje sekwencja podawania terapii skojarzonej z zastosowaniem inhibitorów PD-1/PD-L1 oraz radioterapii. Geng i współpracownicy wykazali, że stosowanie inhibitorów PD-1/PD-L1 po radioterapii było korzystniejsze niż jednoczesna terapia inhibitorami PD-1/PD-L1 z radioterapią czy zastosowanie radioterapii po podaniu inhibitorów PD-1/PD-L1 [137]. Wynik ten pokrywa się z teorią, mówiącą o tym, że radioterapia powoduje pęknięcia DNA dwuniciowego i zwiększa infiltrację limfocytów T CD8+, a to z kolei powoduje wzrost ekspresji białka PD-L1 [137-139].

Celem niniejszej pracy było porównanie ekspresji białek PD-1 i PD-L1 u pacjentów z rakiem jelita grubego z parametrami kliniczno-morfologicznymi takimi, jak: wiek i płeć, lokalizacja guza, stopień histologicznej złośliwości raka, głębokość naciekania i obecność przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych, obecność nacieku limfocytarnego, status genu KRAS, pączkowanie guza oraz przeżycie. W celu badania ekspresji białek PD-1 i PD-L1 zastosowano metodę immunohistochemiczną. Ekspresja białka PD-1 oznaczona w limfocytach wystąpiła w 29,6% przypadków i była słabsza niż ekspresja białka PD-L1, którą oznaczono zarówno w komórkach guza (7,1%) jak i w limfocytach (43,9%). Ekspresję białka PD-L1 oznaczono zarówno w komórkach rakowych jak i komórkach odpornościowych, ponieważ badania donoszą, że cytokiny obecne w immunoreaktywnym mikrośrodowisku guza mogą indukować ekspresję białka PD-L1 na komórkach nowotworowych i/lub komórkach odpornościowych za pomocą różnych mechanizmów sygnalizacyjnych. Potrzeba jednak kolejnych badań w celu zrozumienia mechanizmów, których rolą jest wzbudzenie ekspresji PD-L1 w

immunologicznym mikrośrodowisku guza. Pozwoli to na odpowiednie podejście terapeutyczne w celu wzmocnienia blokady punktu kontrolnego PD-1/PD-L1 [140].

Podobne badania związane z ekspresją białka PD-L1 w raku jelita grubego przeprowadził Shan i wsp., wykazując immunohistochemicznie obecność ekspresji w 42,5% badanych przypadków raka jelita grubego. Autorzy wykazali dodatnią korelację tej ekspresji z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych, przerzutów odległych, a także z głębokością naciekania guza. Nie wykazano jednak korelacji z płcią i stopniem zróżnicowania histologicznego guza [141], które z kolei wykazano w niniejszej pracy. Z kolei Masugi z zespołem przeanalizowali występowanie ekspresji białka PD-L1 zarówno w komórkach guza jak i w podścielisku, gdzie odpowiednio 89% i 5% przypadków wykazało ekspresję [142], czyli odwrotnie niż w niniejszej pracy, gdzie ekspresję białka PD-L1 w komórkach rakowych obserwuje się w niższym odsetku przypadków niż w limfocytach, tj. 7,1% przypadków z ekspresją PD-L1 w komórkach rakowych i 43,9% przypadków z ekspresją w limfocytach.

Masugi badał korelację ekspresji białka PD-L1 z gęstością komórek FOXP3+ [142], czyli limfocytami T regulatorowymi odgrywającymi istotną rolę w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej [143]. Zależność ta okazała się odwrotnie proporcjonalna do ekspresji białka PD-L1 w rakach jelita grubego, co może sugerować wpływ komórek rakowych z ekspresją PD-L1 na limfocyty T regulatorowe w mikrośrodowisku guza [142]. Zhao z zespołem także wykazali istotną statystycznie korelację między naciekiem limfocytów T regulatorowych, a ekspresją białka PD-L1 w komórkach rakowych (ekspresję wykazano w 48,21% przypadków, podczas gdy w limfocytach naciekających guz ekspresji PD-L1 nie zaobserwowano). Znaleziono związek ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych z głębokością naciekania guza i obecnością przerzutów do węzłów chłonnych [143]. W niniejszej pracy ekspresję białka PD-L1 w limfocytach wykazano w 43,9% przypadków. Wykazano także, że ekspresja białka PD-L1 w limfocytach ma związek ze stopniem zaawansowania klinicznego i z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Ekspresja białka PD-L1 w limfocytach występowała najczęściej u pacjentów w II stopniu zaawansowania klinicznego, a najrzadziej u pacjentów w III stopniu zaawansowania klinicznego nowotworu. Ponadto ekspresja białka PD-L1 w limfocytach była obserwowana częściej u pacjentów, u których nie występowały przerzuty do węzłów chłonnych.

Masugi w swoich badaniach nad ekspresją białka PD-L1 zaznacza, że w rakach jelita grubego w reakcji immunohistochemicznej zaobserwował zarówno odczyn błonowy, jak i cytoplazmatyczny [142], co potwierdzają inni badacze [49, 143-147]. Autorzy podkreślają, że ocena ekspresji PD-L1 w tkance stanowiła wyzwanie, ponieważ brak jest akceptowanej powszechnie metody immunohistochemicznej do wykazania tej ekspresji, a ekspresja PD-L1 w błonie komórkowej prawdopodobnie wiąże się z możliwością połączenia z receptorem PD-1. Ekspresja błonowa może być maskowana w komórkach z silną ekspresją cytoplazmatyczną, dlatego też do obliczeń wykorzystano zarówno poziomy ekspresji cytoplazmatycznej, jak i błonowej, co zostało ocenione niezależnie przez dwóch specjalistów [142]. Również w niniejszej pracy zastosowano ocenę dwupoziomową – preparaty oceniono przez doświadczonego patomorfologa, a następnie dokonano obliczeń z wykorzystaniem oprogramowania do analizy obrazu i określenia ekspresji białka PD-L1 w błonach komórkowych.

Wcześniejsze badania donoszą, że korelacja między ekspresją białka PD-L1 a rokowaniem jest różna w zależności od typu nowotworu [148-151]. Mittendorf z zespołem przeprowadzili badania w celu ustalenia nadekspresji białka PD-L1 w potrójnie ujemnym raku piersi. Wykorzystali dane z atlasu genomu raka (*The Cancer Genome Atlas*; TCGA) dotyczące sekwencjonowania RNA i wykazali znacznie wyższą ekspresję genu CD274 (PD-L1) w potrójnie ujemnym raku piersi w porównaniu z innymi typami tego nowotworu. Wykonali także mikromacierze tkanki guzów piersi i dokonali oceny pod kątem ekspresji białka PD-L1, która w potrójnie ujemnym raku piersi wystąpiła w 19% przypadków [152]. Ekspresja białka PD-L1 w raku piersi badana była także przez Ghebeh i wsp., którzy wykazali ekspresję PD-L1 w 50% guzów, przy czym w 34% guzów ekspresja występowała w komórkach nowotworowych, a w 41% przypadków występowała także w limfocytach naciekających guz [153].

Białko PD-L1 ulega ekspresji w wielu nowotworach takich, jak: rak jasnokomórkowy nerki (154-155), rak jajnika (156), rak przełyku (157), rak żołądka (158), rak wątrobowokomórkowy (159), czy rak trzustki (160). Bi ze współpracownikami analizowali ekspresję PD-1 i PD-L1 badając raka rdzeniastego tarczycy. Podobnie jak w niniejszej pracy, oznaczyli ekspresję białka PD-1 w limfocytach oraz białka PD-L1 w limfocytach i w guzie, jednak ekspresję PD-L1 niezależnie od lokalizacji oznaczyli jako jeden parametr, uzyskując ekspresję odpowiednio 25,3% w przypadku PD-1 i 21,8% w przypadku PD-L1, ukazując w swoim badaniu związek ekspresji białka PD-L1 z

obecnością przerzutów odległych [161]. Bongiovanni z zespołem, podobnie pracowali nad określeniem ekspresji białka PD-L1 w komórkach guza i w komórkach odpornościowych (w tym przypadku rozdzielając to na dwa parametry) w rakach tarczycy: anaplastycznym (niezróżnicowanym), pęcherzykowym i brodawkowym uzyskując ekspresję w komórkach raka odpowiednio w 22,2%, 7,6% i 6,1% przypadków oraz w komórkach odpornościowych odpowiednio w 11,1%, 9,1% i 28,5% przypadków. Bongiovanni wskazał, że im bardziej agresywny typ nowotworu, tym ekspresja PD-L1 jest wyższa, nie stwierdził natomiast związku ekspresji białka PD-L1 z progresją choroby, czy przeżyciem wolnym od wznowy ani z innymi parametrami kliniczno-patologicznymi [102].

Jak już wspomniano wcześniej, dobre efekty terapeutyczne z zastosowaniem leków: niwolumab i pembrolizumab, a także atezolizumab, uzyskano w leczeniu NSCLC. Mansour i wsp. badali metodą immunohistochemiczną zarówno próbki histologiczne utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie, jak i próbki cytologiczne raka płuca. W obu wariantach uzyskali oni ekspresję białka PD-L1 w 55% przypadków, jednak wysoka ekspresja PD-L1 w guzie w preparatach histologicznych korelowała z lepszą odpowiedzią na leczenie. Raki płaskonabłonkowe wykazywały wyższą ekspresję PD-L1 niż gruczolakoraki [162].

Istnieją doniesienia dotyczące związku statusu genów KRAS i EGFR z ekspresją PD-L1. Najwyższa ekspresja PD-L1 wystąpiła w przypadkach mutacji KRAS, a najniższa dla przypadków z mutacją EGFR oraz w przypadkach braku mutacji zarówno w KRAS i EGFR [162]. W przypadku raka jelita grubego status genu KRAS był jednym z pierwszych badanych biomarkerów, a obecnie stanowi podstawowe kryterium, które kwalifikuje pacjentów z rakiem jelita grubego do leczenia z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych cetuximab i panitumumab. Leki te skierowane są przeciwko receptorowi EGFR [163-166]. Skuteczność terapii skierowanej przeciwko EGFR u pacjentów bez mutacji w genie KRAS wynosi 8-11%. Mutacje w genie KRAS wykrywa się u około 40% pacjentów z rakiem jelita grubego [167-169]. Konieczne jest zatem znalezienie nowych biomarkerów predykcyjnych dla pacjentów, którzy pomimo posiadania genu KRAS typu dzikiego, są oporni na leczenie skierowane przeciwko receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR).

Evans z zespołem w swoich badaniach nad PD-L1 w NSCLC potwierdzili, że guzy bez mutacji w EGFR cechowały się wyższą ekspresją PD-L1. Nie zaobserwowali istotnego związku między występowaniem ekspresji PD-L1, a mutacją genu KRAS, ale zwracają uwagę, że prawdopodobnie jest to wynikiem niskiej liczebności badanych próbek [170]. Większość badań sugeruje jednak, że wyższy wskaźnik ekspresji białka PD-L1 jest skorelowany z mutacją KRAS w nowotworach [171-178]. W niniejszej pracy wykorzystano 28 przypadków, w których zbadano status genu KRAS, z czego w połowie przypadków wykryto mutację. Jednak u żadnego z 28 pacjentów, zarówno w przypadku braku jak i występowania mutacji w KRAS, nie wystąpiła ekspresja białka PD-L1 w komórkach raka jelita grubego. Badano związek ekspresji białka PD-L1 w limfocytach ze statusem genu KRAS, ale nie wykazano istotności statystycznej. Istotną korelację uzyskano analizując związek statusu genu KRAS z ekspresją białka PD-1 w limfocytach – w żadnym z przypadków, w których wystąpiła mutacja KRAS nie odnotowano ekspresji białka PD-1. Jednak należy tu mieć na uwadze niską liczebność przebadanych próbek pod kątem statusu genu KRAS.

Przeprowadzane badania donoszą, że odsetek odpowiedzi klinicznej w różnych typach nowotworów, w leczeniu których stosuje się inhibitory PD-1/PD-L1, wynosi 30%-50% [179]. W związku z tym wydaje się, że identyfikacja biomarkerów predykcyjnych w celu doboru pacjentów i polepszenia skuteczności leczenia bez dodatkowych i nieuzasadnionych skutków ubocznych, jest procesem niezbędnym w celu stworzenia terapii ukierunkowanych dla indywidualnego pacjenta. Chowdhury z zespołem zauważają, że we wcześniejszych badaniach, w których analizowano immunohistochemicznie ekspresję białek PD1 i PD-L1 w komórkach guza, któremu towarzyszył naciek limfocytarny, ekspresja białka PD-L1 w komórkach złośliwych występuje w zmiennej proporcji w NSCLC, czerniaku, glejaku wielopostaciowym, rakach głowy i szyi, jajników, piersi, przełyku, nerek, trzustki, a także chłoniaku Hodgkina [180]. W raku jelita grubego jak dotąd uzyskano obiecujące wyniki w przypadkach guzów z obecnością niestabilności mikrosatelitarnej, które charakteryzują się towarzyszącym naciekiem limfocytarnym w obrazie histologicznym. Badania wykazały, że limfocyty T infiltrujące tkanki nowotworowe reagują z przeciwciałem anti-PD-1 [181]. Li ze swoim zespołem wskazuje, że wyższa ekspresja białek PD-1 i PD-L1 związana jest z lepszym rokowaniem pacjentów z rakiem jelita grubego, a ekspresja białka PD-1 w limfocytach naciekających nowotwór jest niezależnym czynnikiem

prognostycznym dla przeżycia całkowitego i czasu przeżycia wolnego od progresji choroby, zwłaszcza w przypadku pacjentów z pMMR (*proficient DNA mismatch repair*; biegała naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych) [119]. W niniejszej pracy wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między ekspresją białka PD-1 a obecnością nacieku limfocytarnego towarzyszącego rozrostowi guza w ścianie jelita: ekspresja PD-1 występowała w większości u pacjentów, u których stwierdzono obecność limfocytów naciekających utkanie guza.

Należy jednak zaznaczyć, że wyniki dotyczące związku niestabilności mikrosatelitarnej i ekspresji PD-L1 w raku jelita grubego są sprzeczne. Niektórzy badacze wykazali istnienie słabej ekspresji PD-L1 w komórkach raka jelita grubego z niestabilnością mikrosatelitarną, jak i bez niestabilności [145, 181], a inni badacze przeciwnie [46]. Droeser i współpracownicy odnotowali w swoich badaniach silną ekspresję białka PD-L1 w 37% przypadków z pMMR oraz w 29% z dMMR (*deficient DNA mismatch repair*; niepełna naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych). W rakach jelita grubego z pMMR ekspresja PD-L1 korelowała z naciekiem limfocytów CD8+, które nie wykazywały ekspresji białka PD-1, ponadto ekspresja PD-L1 była istotnie związana z brakiem przerzutów do węzłów chłonnych, niskim parametrem T oraz niższym stopniem złośliwości nowotworu [46]. Inhibitory PD-1/PD-L1 znajdują kliniczne zastosowanie w przypadkach, w których obserwuje się dMMR oraz wysoki stopień niestabilności mikrosatelitarnej (*microsatellite instability – high*; MSI-H), a także w przypadku pMMR i niskim stopniu niestabilności mikrosatelitarnej (non-MSI-H), choć tutaj skuteczność przeciwciał anti-PD-1/anti-PD-L1 pozostaje niepewna. Dodatkowo niski odsetek pacjentów z dMMR/MSI-H wskazuje, że terapię inhibitorami PD-1/PD-L1 należałoby łączyć z innymi rodzajami terapii takimi, jak chemio- czy radioterapia, w celu osiągnięcia lepszego efektu terapeutycznego. Połączenie immunoterapii z leczeniem neoadjuwantowym może zmienić strategię leczenia raka jelita grubego u pacjentów z chorobą lokalnie zaawansowaną, jak i u pacjentów z obecnością przerzutów [182].

Prowadzone są badania nad zwiększeniem wrażliwości pacjentów ze stabilnością mikrosatelitarną (*microsatellite stability*; MSS) na immunoterapię. Liu i wsp. badali wpływ IL-17A na terapię anti-PD-1 u pacjentów bez niestabilności mikrosatelitarnej w guzach raka jelita grubego i wykazali, że blokowanie IL-17A poprawia skuteczność tej terapii w mysich modelach z MSS. Uwrażliwienie tej grupy pacjentów na przeciwciała anti-PD-1 poprzez zablokowanie IL-17A sprawia, że ten kierunek działania może

posłużyć jako istotny cel terapeutyczny [183]. Co ciekawe, przeciwciała monoklonalne anti-IL-17A (secukinumab i ixekizumab) są już dostępne: znajdują zastosowanie i wykazują skuteczność w leczeniu pacjentów z łuszczykowym zapaleniem stawów, łuszczyką, a także zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa [184-185]. Wdrożenie leczenia za pomocą kombinacji anti-PD-1 i anti-IL-17A u pacjentów bez niestabilności mikrosatelitarnej w raku jelita grubego wydaje się niezbędnym krokiem w dalszych badaniach klinicznych [183].

Immunoterapia, oparta na wykorzystaniu inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego, zrewolucjonizowała w ostatnich latach leczenie różnych typów nowotworów. Trwają badania kliniczne mające na celu ocenę skuteczności leczenia przy połączeniu inhibitorów PD-1/PD-L1 z innymi inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych, a także z chemioterapią, radioterapią oraz terapiami ukierunkowanymi molekularnie [186]. Należy dogłębnie zrozumieć złożoność funkcjonowania układu odpornościowego w mikrośrodowisku guza, co może zwiększyć prawdopodobieństwo opracowania nowych strategii terapeutycznych, a to z kolei pozwoli wzmocnić odporność przeciwnowotworową u pacjentów z rakiem jelita grubego. Dane dotyczące związku cech kliniczno-morfologicznych, genetyczno-molekularnych, czy rokowania w rakach jelita grubego z ekspresją białek PD-L1 i PD-1 pozostają jednak skąpe i niejednoznaczne [35, 187]. Cechy kliniczno-morfologiczne raka jelita grubego z ekspresją PD-L1 nie są dobrze zdefiniowane [2]. Rola ekspresji PD-L1 w raku jelita grubego nie jest ściśle określona, a opublikowane badania wykazują sprzeczne wyniki dotyczące związku ekspresji PD-L1 z rokowaniem [46, 148]. W niniejszej pracy niski odsetek pacjentów wykazujących ekspresję białka PD-L1 w komórkach rakowych także pokazuje, że badania należałoby przeprowadzić na większej liczbie pacjentów, co pozwoliłoby uzyskać bardziej miarodajne wyniki.

Pomimo nieznacznej poprawy przeżycia chorych z rakiem jelita grubego, średnio połowa chorych potrzebuje nowych terapii. W przeciwieństwie do innych nowotworów złośliwych takich, jak rak nerki, płuc, czy czerniak, rak jelita grubego wykazuje bardzo niski odsetek odpowiedzi na blokadę białka PD-1 lub PD-L1 [111, 127- 128], jednak badania prowadzone nad szlakiem PD-1/PD-L1 wskazują, że może być on istotnym mechanizmem ucieczki komórek rakowych spod nadzoru układu odpornościowego [84]. Pozwala to przypuszczać, że w przyszłości wykorzystanie terapeutyczne tego szlaku będzie miało coraz większe zastosowanie w terapii, również w przypadku raka jelita

grubego. Jednak badanie związku ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z parametrami kliniczno-morfologicznymi, genetyczno-molekularnymi, czy rokowaniem w przypadku raka jelita grubego wymaga dalszych badań.

6. Wnioski

1. Ekspresję białka PD-1 w limfocytach zaobserwowano w 29,6% przypadków i stwierdzono statystycznie istotny związek między występowaniem ekspresji białka PD-1, a wiekiem poniżej 69 roku życia, brakiem przerzutów do węzłów chłonnych, niskim stadium zaawansowania klinicznego, typem dzikim genu KRAS, a także przeżyciem w pierwszym roku od ustalenia rozpoznania, co sugeruje, że ekspresja białka PD-1 jest silniejsza u młodszych pacjentów we wcześniejszych stadiach zaawansowania choroby nowotworowej.
2. Ekspresję białka PD-L1 w limfocytach zaobserwowano w 43,9% przypadków. Stwierdzono związek między występowaniem ekspresji białka PD-L1 w limfocytach a brakiem przerzutów do węzłów chłonnych oraz niższym stopniem zaawansowania klinicznego, co sugeruje, że ekspresja białka PD-L1 w limfocytach także ma znaczenie u pacjentów, u których rozpoznanie następuje we wczesnych etapach zaawansowania choroby nowotworowej.
3. Wykazano także, że ekspresja białka PD-L1 w komórkach rakowych częściej występuje u kobiet niż u mężczyzn. Związek ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych z wyższym stopniem złośliwości histologicznej sugeruje, że ekspresja białka PD-L1 w komórkach rakowych może być wykorzystana jako cel terapeutyczny.

7. Streszczenie

Wstęp: Rak jelita grubego jest w Polsce trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym u mężczyzn i drugim u kobiet. Rokowanie w raku jelita grubego jest tym lepsze, im wcześniej jest on rozpoznany. W rakach jelita grubego, w zależności od stopnia klinicznego zaawansowania, stosuje się leczenie chirurgiczne, chemioterapię i terapię spersonalizowaną. W przypadku raka jelita grubego zastosowanie znalazły przeciwciała monoklonalne anty-EGFR, a najczęściej stosowane leki to cetuximab i panitumumab. Badanie genów RAS jest ważnym markerem predykcyjnym w przypadku terapii z zastosowaniem przeciwciał anty-EGFR, jednak w związku z ich ograniczonym działaniem w populacji ogólnej, a także ze względu na koszty i działania niepożądane wciąż poszukuje się nowych rozwiązań. Immunoterapie w znaczący sposób zrewolucjonizowały w ostatnim czasie strategie terapeutyczne różnych nowotworów, a białka PD-1 i PD-L1 są w ostatnich latach traktowane jako potencjalne cele terapii przeciwnowotworowej. Inhibitory PD1/PDL1 dają możliwość zastosowania różnych terapii, kombinacji leków i schematów leczenia, co może pomóc w osiągnięciu wysokiej skuteczności w przypadku różnych typów nowotworów, w tym raka jelita grubego.

Cel: Celem pracy była immunohistochemiczna ocena ekspresji białek PD-1 oraz PD-L1 w rakach jelita grubego oraz ocena związku ekspresji immunohistochemicznej białek PD-1 i PD-L1 z wybranymi parametrami kliniczno-morfologicznymi i z przeżyciem u pacjentów z rakiem jelita grubego.

Material i metody: Zbadano 98 przypadków z rakiem jelita grubego. W celu oceny ekspresji białek PD-1 i PD-L1 zastosowano metodę immunohistochemii. Zastosowano mysie przeciwciało monoklonalne przeciw PD-1 (NAT105; Roche Diagnostics Polska) oraz królicze przeciwciało monoklonalne przeciw PD-L1 (VENTANA SP263; Roche Diagnostics Polska). Dla zachowania tych samych warunków badanie wykonano na mikromacierzach tkankowych. W celu wystandaryzowania i ujednoczenia oceny preparatów immunohistochemicznych zastosowano wirtualną analizę obrazu.

Wyniki: Ekspresję białka PD-1 wykazano w 29 przypadkach, a jego ligandu – białka PD-L1 wykazano u 7 pacjentów w przypadku ekspresji w komórkach rakowych i u 43 pacjentów w przypadku ekspresji w limfocytach. Wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację między ekspresją białka PD-1 a ekspresją jego ligandu PD-L1 w

komórkach rakowych, jak i w limfocytach, a także ujemną korelację między ekspresją białka PD-L1 w komórkach guza, a ekspresją białka PD-L1 w limfocytach. W przypadku ekspresji białka PD-1 stwierdzono istotny statystycznie związek z wiekiem, stanem okolicznych węzłów chłonnych, stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu, naciekiem limfocytarnym oraz statusem genu KRAS. Ekspresja białka PD-L1 w komórkach rakowych jest istotnie statystycznie związana z płcią i stopniem złośliwości histologicznej. W przypadku ekspresji białka PD-L1 w limfocytach stwierdzono istotny statystycznie związek ze stanem okolicznych węzłów chłonnych i stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Wykazano, że ekspresja białka PD-1 ma związek z przeżyciem w pierwszym roku od momentu ustalenia rozpoznania.

Wnioski: Stwierdzono korelację między ekspresją białka PD-1 a wiekiem poniżej 69 roku życia, brakiem przerzutów do węzłów chłonnych, niskim stadium zaawansowania klinicznego, typem dzikim genu KRAS, a także ze 100% przeżyciem w pierwszym roku od postawienia diagnozy, co sugeruje, że ekspresja białka PD-1 ma znaczenie u pacjentów z wczesnym rozpoznaniem. Stwierdzona korelacja między ekspresją białka PD-L1 w limfocytach a brakiem przerzutów do węzłów chłonnych oraz niższym stopniem zaawansowania klinicznego sugeruje, że ekspresja białka PD-L1 w limfocytach także ma znaczenie u pacjentów, u których rozpoznanie następuje we wczesnych etapach choroby nowotorowej. Stwierdzenie korelacji między występowaniem ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych, a wyższym stopniem złośliwości histologicznej sugeruje, że ekspresja białka PD-L1 w komórkach rakowych może mieć znaczenie dla pacjentów z bardziej zaawansowaną chorobą nowotworową, co może być wykorzystane jako potencjalny cel terapeutyczny.

8. Abstract

Introduction: In Poland colorectal cancer is the third most common malignant tumor in men and the second in women. Surgical treatment, chemotherapy and personalized therapy are used in colorectal cancer, it depends on the clinical stage. In the case of colorectal cancer, anti-EGFR monoclonal antibodies have been used. The most commonly used drugs are cetuximab and panitumumab. The study of RAS genes is an important predictive marker in a therapy with anti-EGFR antibodies, however, due to their limited effect in the general population, as well as due to costs and side effects, new solutions are still being sought. Immunotherapies have recently significantly revolutionized the therapeutic strategies of various cancers. PD-1 and PD-L1 proteins have recently been considered as potential targets of anticancer therapy. PD1/PDL1 inhibitors offer the possibility of using various therapies, drug combinations and treatment regimens, which can help achieve high efficacy in various types of cancer, including colorectal cancer.

Aim: The aim of the study was the immunohistochemical evaluation of the expression of PD-1 and PD-L1 proteins in colorectal cancers and the evaluation of the relationship between the immunohistochemical expression of PD-1 and PD-L1 proteins with selected clinical and morphological parameters and survival in patients with colorectal cancer.

Material and Methods: 98 cases with colorectal cancer were studied. Immunohistochemistry was used to evaluate the expression of PD-1 and PD-L1 proteins. Mouse monoclonal antibody against PD-1 (NAT105; Roche Diagnostics Poland) and rabbit monoclonal antibody against PD-L1 (VENTANA SP263; Roche Diagnostics Poland) were used. To maintain the same conditions, the assay was performed on tissue microarrays. Virtual image analysis was used to standardize the evaluation of immunohistochemical preparations.

Results: PD-1 protein expression was demonstrated in 29 cases. PD-L1 protein expression in cancer cells was demonstrated in 7 patients and PD-L1 protein expression in lymphocytes was demonstrated in 43 patients. There was a statistically significant positive correlation between PD-1 protein expression and expression of its ligand PD-L1 in cancer cells as well as in lymphocytes, and a negative correlation between PD-L1 protein expression in tumor cells and PD-L1 protein expression in lymphocytes. In the

case of PD-1 protein expression, there was a statistically significant association with age, the status of the surrounding lymph nodes, the clinical stage of the tumor, lymphocytic infiltration and KRAS gene status. For PD-L1 protein expression in cancer cells, there was a statistically significant association with gender and histological malignancy grade. In the case of PD-L1 protein expression in lymphocytes, a statistically significant association was found with the status of the surrounding lymph nodes and the clinical stage of the tumor. PD-1 protein expression was shown to be related to survival in the first year after diagnosis: 100% survival in patients with PD-1 protein expression

Conclusions: There was a correlation between PD-1 protein expression and age below 69 years of age, lack of lymph node metastases, low clinical stage, wild-type KRAS gene, and survival (100%) in the first year after diagnosis. The correlation found between the expression of PD-L1 protein in lymphocytes and lack of lymph node metastases and the lower clinical stage. These associations suggest that the expression of PD-1 protein and the expression of PD-L1 protein in lymphocytes are important in patients whose diagnosis is confirmed early. The correlation between PD-L1 protein expression in cancer cells and a higher grade of histological malignancy suggests that PD-L1 protein expression in cancer cells may be important for patients with more advanced disease.

9. Piśmiennictwo

1. Phipps O, Brookes MJ, Al-Hassi HO. Iron deficiency, immunology, and colorectal cancer. *Nutr Rev.* 2021 Jan 1;79(1):88-97.
2. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer. *Lancet.* 2019;394:1467–1480.
3. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16:713–732.
4. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, et al. Colorectal Cancer 2016; *Nat Rev Dis Primers* 1: 15065.
5. Lewandowska M. Ekspresja epireguliny i amfireguliny w komórkach nowotworowych i w komórkach mikrośrodowiska raków jelita grubego uzyskanych za pomocą laserowej mikrodyssekcji. *Pomorski Uniwersytet Medyczny. Szczecin* 2016; s. 5, 14, 45.
6. Łacko A, Ekiert M, Soter K. Czynniki predykcyjne u chorych na raka jelita grubego poddawanych terapii ukierunkowanej na EGFR, *Onkol. Prak. Klin.* 2011;7,4:224–229.
7. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2012 roku. Warszawa: Ministerstwo Zdrowia 2014; ISBN 0867-8251.
8. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl> dostęp z dnia 24/11/2021.
9. Lee MS, Menter DG, Kopetz S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017 Mar;15(3):411-419.
10. Helvacı K, Eraslan E, Yildiz F, et al. Comparison of clinicopathological and survival features of right and left colon cancers. *J BUON.* 2019 Sep-Oct;24(5):1845-1851.
11. Zhao B, Lopez NE, Eisenstein S, et al. Synchronous metastatic colon cancer and the importance of primary tumor laterality - A National Cancer Database

- analysis of right- versus left-sided colon cancer. *Am J Surg*. 2020 Aug;220(2):408-414.
12. Yang CY, Yen MH, Kiu KT, et al. Outcomes of right-sided and left-sided colon cancer after curative resection. *Sci Rep*. 2022 Jul 5;12(1):11323.
 13. Klose J, Kloor M, Warschkow R, et al. Does side really matter? Survival analysis among patients with right- versus left-sided colon cancer: a propensity score-adjusted analysis. *Annals of Surgical Oncology*. 2021;28(5):2768–2778.
 14. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, et al. The worse prognosis of rightsided compared with left-sided colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Surg* 2016;20(3):648–655.
 15. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, et al. Prognostic survival associated with left-sided vs rightsided colon cancer a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol* 2017;3(2):211–219.
 16. Nakagawa-Senda H, Hori M, Matsuda T, et al. Prognostic impact of tumor location in colon cancer: the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *BMC Cancer*. 2019;19(1):431.
 17. Qin Q, Yang L, Sun YK, et al. Comparison of 627 patients with right- and left-sided colon cancer in China: Differences in clinicopathology, recurrence, and survival. *Chronic. Dis. Transl. Med*. 2017; 3, 51–59.
 18. Bustamante-Lopez LA, Nahas SC, Nahas CSR, et al. Is there a difference between right-versus left-sided colon cancers? Does side make any difference in long term follow-up?. *Arq. Bras. Cir. Dig*. 2019; 32, e1479.
 19. Moritani K, Hasegawa H, Okabayashi K, et al. Difference in the recurrence rate between right- and left-sided colon cancer: A 17-year experience at a single institution. *Surg. Today*. 2014; 44, 1685–1691.
 20. Lee JM, Han YD, Cho MS, et al. Impact of tumor sidedness on survival and recurrence patterns in colon cancer patients. *Ann. Surg. Treat. Res*. 2019; 96, 296–304.
 21. Karim S, Brennan K, Nanji S, et al. Association between prognosis and tumor laterality in early-stage colon cancer. *JAMA Oncol* 2017;3(10): 1386–1392.
 22. Warschkow R, Sulz MC, Marti L, et al. Better survival in right-sided versus left-sided stage I - III colon cancer patients. *BMC Canc* 2016;16(1):6–13.

23. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, et al. Mortality by stage for right - versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results-Medicare data. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(33):4401–4409.
24. Romanowicz H, Smolarz B, Fiks T, et al. The significance of DNA mismatch repair (MMR) in breast cancer. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*, 2010;9(2), pp.95-100.
25. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, et al. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res*. 2018 Aug;11(4):264-273.
26. Huang Y, Duanmu J, Liu Y, et al. Analysis of multi-omics differences in left-side and right-side colon cancer. *PeerJ*. 2021 May 12;9:e11433.
27. Temraz S, Mukherji D, Nassar F, et al. Treatment sequencing of metastatic colorectal cancer based on primary tumor location. *Semin Oncol*. 2021 Apr;48(2):119-129.
28. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer* 2016; 35, 4.
29. Kalady MF, Heald B. Diagnostic Approach to Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Clin Colon Rectal Surg*. 2015 Dec;28(4):205-14.
30. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, et al. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2044-58.
31. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann.Intern.Med*. 2003;138(7):560-70.
32. Gronowska A, Głuszek S, Bicki J, et al. Colorectal cancer in the course of familial adenomatous polyposis: natural history and treatment methods. *Medical Studies/Studia Medyczne*, 2020;36(4), pp.303-309.
33. Capelle LG, Van Grieken NC, Lingsma HF, et al. Risk and epidemiological time trends of gastric cancer in Lynch syndrome carriers in the Netherlands. *Gastroenterology*. 2010; 138:487–92.
34. Vasen HFA, Tomlinson I, Castells A. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 12:88–97.
35. Lee LH, Cavalcanti MS, Segal NH, et al. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol*. 2016 Nov;29(11):1433-1442.

36. DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer. Principles & Practice of Oncology 2015; 10th edition: 777-782.
37. Yiu AJ, Yiu CY. Biomarkers in Colorectal Cancer, *Anticancer Res.* 2016;36(3):1093-102.
38. Jomrich G, Silberhumer GR, Marian B, et al. Programmed death-ligand 1 expression in rectal cancer, *Eur Surg.* 2016;48(6):352-356.
39. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA.* 2021 Feb 16;325(7):669-685.
40. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, et al. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012;19:3706–3712.
41. Abbass MA, Kalady MF. Prognostic Factors in Colon Cancer. *Diseases of the Colon & Rectum*, 2019;62(6), 647–649.
42. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer - ready for diagnostic practice? *Human Pathology*, 2016;47(1), 4–19.
43. Ozer SP, Barut SG, Ozer B, et al. The relationship between tumor budding and survival in colorectal carcinomas. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2019 Dec;65(12):1442-1447.
44. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017 Sep;30(9):1299-1311.
45. Shin JH, Jeong J, Maher SE, et al. Colon cancer cells acquire immune regulatory molecules from tumor-infiltrating lymphocytes by trogocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Nov 30;118(48):e2110241118.
46. Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2013 Jun;49(9):2233-42.
47. Turksma AW, Coupé VMH, Shamier MC, et al. Extent and location of tumor-infiltrating lymphocytes in microsatellite-stable colon cancer predict outcome to adjuvant active specific immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2016;22:346–56.
48. Rodriguez-Ruiz ME, Rodriguez I, Garasa S, et al. Abscopal effects of radiotherapy are enhanced by combined immunostimulatory mAbs and are dependent on CD8 T cells and Crosspriming. *Cancer Res* 2016;76:5994–6005.

49. Jeschke J, Bizet M, Desmedt C, et al. DNA methylation–based immune response signature improves patient diagnosis in multiple cancers. *J Clin Invest* 2017;127:3090–102.
50. Governa V, Trella E, Mele V, et al. The interplay between neutrophils and CD8⁺ T cells improves survival in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23:3847–58.
51. Kong JC, Guerra GR, Pham T, et al. Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dis Colon Rectum* 2019;62:498–508.
52. Digiacomo N, Bolzacchini E, Veronesi G, et al. Neuroendocrine Differentiation, Microsatellite Instability, and Tumor-infiltrating Lymphocytes in Advanced Colorectal Cancer With BRAF Mutation. *Clin Colorectal Cancer*. 2019 Jun;18(2):e251-e260.
53. Zou Q, Wang X, Ren D, et al. DNA methylation-based signature of CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes enables evaluation of immune response and prognosis in colorectal cancer. *J Immunother Cancer*. 2021 Sep;9(9):e002671.
54. Harada S, Morlote D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020 Jan;27(1):20-26.
55. Bakhoun SF, Cantley LC. The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell*. 2018 Sep 6;174(6):1347-1360.
56. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759–767.
57. Frayling I, Arends M. Adenomatous Polyposis Coli. In: Maloy S, Hughes K, editors. *Brenner’s Encyclopedia of Genetics*. San Diego: Academic; 2013. pp. 27–29.
58. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016 Aug;469(2):125-34.
59. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2018 Dec 17;89(9-S):97-101.
60. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer - the stable evidence. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2010;7:153–62.
61. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):335–346.

62. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, et al. Colon Cancer Family Registry. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007; 133(1):48–56.
63. Urbano A, Smith J, Weeks RJ, et al. Gene-specific targeting of DNA methylation in the mammalian genome. *Cancers*. 2019;11:1515.
64. Koch A, Joosten SC, Feng Z, et al. Analysis of DNA methylation in cancer: Location revisited. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2018;15:459–466.
65. Karpiński P, Szaśiadek MM. CpG Island Methylator Phenotype-A Hope for the Future or a Road to Nowhere? *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 13;23(2):830.
66. Bae JM, Kim JH, Kang GH. Epigenetic alterations in colorectal cancer: the CpG island methylator phenotype. *Histol Histopathol.* 2013 May;28(5):585-95.
67. Ogino S, Chan AT, Fuchs CS, et al. Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut* 2011; 60: 397-411.
68. An B, Kondo Y, Okamoto Y, et al. Characteristic methylation profile in CpG island methylator phenotype-negative distal colorectal cancers. *Int J Cancer* 2010; 127: 2095-2105.
69. Advani SM, Swartz MD, Loree J, et al. Epidemiology and Molecular-Pathologic Characteristics of CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2021 Jun;20(2):137-147.e1.
70. Advani SM, Advani P, DeSantis SM, et al. Clinical, pathological, and molecular characteristics of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Translational oncology* 2018; 11: 1188-1201.
71. Bosman FT, Bujko K, Chmielik E, et al. Wybrane zagadnienia z patomorfologii i patokliniki jelita grubego i odbytu, *Polish Journal of Pathology* 2014; vol. 65 (4), issue 4 (suplement 1), 32-36.
72. Li J, Zhen L, Zhang Y, et al. Circ-104916 is downregulated in gastric cancer and suppresses migration and invasion of gastric cancer cells. *Onco Targets Ther.* 2017;10:3521-3529.
73. Gao Y, Li SU, Xu D, et al. Prognostic value of programmed death-1, programmed death-ligand 1, programmed death-ligand 2 expression, and CD8 (+) T cell density in primary tumors and metastatic lymph nodes from patients

- with stage T1–4N+ M0 gastric adenocarcinoma. *Chin J Cancer*. 2017;36:61-74.
74. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, et al. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol*. 2004 Apr 1;22(7):1209-14.
 75. Wu C. Systemic Therapy for Colon Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018 Apr;27(2):235-242.
 76. Utracka-Hutka B. Leczenie celowane chorych na raka jelita grubego – aktualny stan wiedzy, *Współczesna Onkologia* 2006;vol.10;3(121–127).
 77. Clarke SJ, Karapetis CS, Gibbs P, et al. Overview of biomarkers in metastatic colorectal cancer: tumour, blood and patient-related factors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Feb;85(2):121-35.
 78. Olmedillas López S, García-Olmo DC, García-Arranz M, et al. KRAS G12V Mutation Detection by Droplet Digital PCR in Circulating Cell-Free DNA of Colorectal Cancer Patients, *Int. J. Mol. Sci* 2016;17(4),484.
 79. Markowska A, Sajdak S, Lubin J, et al. Znaczenie PD-1 – receptora programowanej śmierci-1 – i jego ligandów w immunoterapii raka jajnika. *Curr Gynecol Oncol* 2016; 14 (2), p.117–120.
 80. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2015 Jun 10;33(17):1974-82.
 81. Welz JA. The promise of PD-1 pathway blockade in the treatment of metastatic cancer. *MOP Magnifier* 2014;1:1–7.
 82. Lai CY, Tseng PC, Chen CL, et al. Different Induction of PD-L1 (CD274) and PD-1 (CD279) Expression in THP-1-Differentiated Types 1 and 2 Macrophages. *J Inflamm Res*. 2021 Oct 13;14:5241-5249.
 83. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11: 3887-3895.
 84. Grzywnowicz M, Giannopoulos K. Znaczenie receptora programowanej śmierci 1 oraz jego ligandów w układzie immunologicznym oraz nowotworach, *Acta Haematologica Polonica* 2012; 43 (2a):132–145.
 85. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727-742.

86. Siwiec A, Majdan M. Rola białka PD-1 w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem reumatoidalnego zapalenia stawów oraz toczenia rumieniowatego układuowego, *Postepy Hig Med Dosw.* 2015;69:534-542.
87. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 2009; 114: 1537-1544.
88. Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999; 5: 1365-9.
89. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000; 192: 1027-34.
90. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12:252–264.
91. Kalim M, Iqbal Khan MS, Zhan J. Programmed cell death ligand-1: A dynamic immune checkpoint in cancer therapy. *Chem Biol Drug Des.* 2020 Jun;95(6):552-566.
92. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. CTLA-4 and PD-1 pathway blockade: combinations in the clinic. *Front. Oncol* 2015;15:385.
93. Seifert HA, Zhu W, Vandenbark AA, et al. Sex differences in the therapeutic effects of anti-PDL2 neutralizing antibody on stroke. *Metab Brain Dis.* 2019 Dec;34(6):1705-1712.
94. Cai J, Qi Q, Qian X, et al. The role of PD-1/PD-L1 axis and macrophage in the progression and treatment of cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2019; 145, 1377–1385.
95. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer.* 2021 Mar 5;12(9):2735-2746.
96. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 2018 18(3):153–167.
97. Hui E, Cheung J, Zhu J, et al. T cell Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 1 3 costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 2017; 355(6332):1428–1433.

98. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:467-477.
99. Willis BC, Sloan EA, Atkins KA, et al. Mismatch repair status and PDL1 expression in clear cell carcinomas of the ovary and endometrium. *Mod Pathol*. 2017;114:106-107.
100. Gangling T, Boran C, Jingzhang L, et al. MACC1 regulates PDL1 expression and tumor immunity through the c-Met/AKT/mTOR pathway in gastric cancer cells. *Cancer Medicine*. 2019;8:7044–7054.
101. Ferreira M, Pichon E, Carmier D, et al. Coronary Toxicities of Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 Immunotherapies: a Case Report and Review of the Literature and International Registries. *Target Oncol*. 2018 Aug;13(4):509-515.
102. Bongiovanni M, Rebecchini C, Saglietti C, et al. Very low expression of PD-L1 in medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2017 Jun;24(6):L35-L38.
103. Wong RM, Scotland RR, Lau RL, et al., Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int Immunol* 2007;19:1223-1234.
104. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab, *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1020-30.
105. Ganeshan B, Panayiotou E, Burnand K, et al. Tumour heterogeneity in non-small cell lung carcinoma assessed by CT texture analysis: A potential marker of survival. *Eur Radiol*. 2012;22:796–802.
106. Ganeshan B, Abaleke S, Young RC, et al. Texture analysis of non-small cell lung cancer on unenhanced computed tomography: Initial evidence for a relationship with tumour glucose metabolism and stage. *Cancer Imaging*. 2010;10:137–143.
107. Ganeshan B, Miles KA, Young RC, et al. Hepatic enhancement in colorectal cancer: Texture analysis correlates with hepatic hemodynamics and patient survival. *Acad Radiol*. 2007;14:1520–1530.
108. Kwapisz D. Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2021 Mar;70(3):607-617.
109. Luke JJ, Ott PA. PD-1 pathway inhibitors: The next generation of immunotherapy for advanced melanoma. *Oncotarget*. 2015;6:3479–3492.

110. Creelan BC. Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer. *Cancer Control*. 2014;21:80–89.
111. Horn L, Spigel DR, Vokes EE, et al. Nivolumab versus docetaxel in previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer: Two-year outcomes from two randomized, open-label, phase III trials (CheckMate 017 and CheckMate 057) *J Clin Oncol*. 2017;35:3924–3933.
112. Pastina P, Nardone V, Botta C, et al. Radiotherapy prolongs the survival of advanced non-small-cell lung cancer patients undergone to an immune-modulating treatment with dose-fractionated cisplatin and metronomic etoposide and bevacizumab (mPEBev) *Oncotarget*. 2017;8:75904–75913.
113. Pastina P, Nardone V, Croci S, et al. Anti-cancer activity of dose-fractionated mPE +/- bevacizumab regimen is paralleled by immune-modulation in advanced squamous NSLC patients. *J Thorac Dis*. 2017;9:3123–3131.
114. Nardone V, Pastina P, Giannicola R, et al. How to increase the efficacy of immunotherapy in NSCLC and HNSCC: Role of radiation therapy, chemotherapy, and other strategies. *Front Immunol*. 2018;9:2941.
115. Nardone V, Tini P, Pastina P, et al. Radiomics predicts survival of patients with advanced non-small cell lung cancer undergoing PD-1 blockade using Nivolumab. *Oncology Letters* 2020;19:1559-1566.
116. Hino R, Kabashima K, Kato Y, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 2010;116:1757–1766.
117. Wu P, Wu D, Li L, et al. PD-L1 and survival in solid tumors: a meta-analysis. *PLoS One* 2015;10:e0131403.
118. Chen S, Zhang Z, Zheng X, et al. Response Efficacy of PD-1 and PD-L1 Inhibitors in Clinical Trials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol*. 2021;11, 562315.
119. Li Y, Liang L, Dai W, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2016 Aug 24;15(1):55.
120. Biunno I, Paiola E, De Blasio P. The Application of the Tissue Microarray (TMA) Technology to Analyze Cerebral Organoids. *J Histochem Cytochem*. 2021 Jul;69(7):451-460.

121. Koo M, Squires JM, Ying D, et al. Making a Tissue Microarray. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:313-323.
122. Glinsmann-Gibson B, Wisner L, Stanton M, et al. Recommendations for Tissue Microarray Construction and Quality Assurance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2020 Apr;28(4):325-330.
123. Hu WH, Chen HH, Yen SL, et al. Increased expression of interleukin-23 associated with progression of colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2017 Feb;115(2):208-212.
124. Lei Q, Wang D, Sun K, et al. Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jul 21;8:672.
125. Oliveira AF, Bretes L, Furtado I. Review of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Metastatic dMMR/MSI-H Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2019 May 14;9:396.
126. Krawczyk P, Wojas-Krawczyk K. Przeciwciała monoklonalne przeciw immunologicznym punktom kontroli w leczeniu chorych na nowotwory, *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 2015; tom 11, nr 2, 76–86.
127. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2455–2465.
128. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443–2454.
129. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, et al. Resting dendritic cells induce peripheral CD8 β T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 2005;6:280e6.
130. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2019 Oct 17;381(16):1535-1546.
131. Liu E, Guha A, Jia K, et al. Cardiogenic shock in a patient being treated with Atezolizumab for metastatic non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2017;114:106-107.
132. Bar J, Kamer I, Bab-Dinitz L, et al. Investigating of immunotherapy and combination treatments in exvivo culture model of NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2017;12:S1538.

133. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2019 Nov 21;381(21):2020-2031.
134. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018;378:2078e92.
135. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med* 2018;378:2288e301.
136. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, et al. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale -based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ*. 2014; 21: 15 -25.
137. Geng Y, Zhang Q, Feng S, et al. Safety and Efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors combined with radiotherapy in patients with non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med*. 2021 Feb;10(4):1222-1239.
138. Sato H, Niimi A, Yasuhara T, et al. DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Nat Commun*. 2017;8(1):1751.
139. Choe E-A, Cha YJ, Kim J-H, et al. Dynamic changes in PD-L1 expression and CD8+ T cell infiltration in non-small cell lung cancer following chemoradiation therapy. *Lung Cancer*. 2019;136:30-36.
140. Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer*. 2019 Nov 15;7(1):305.
141. Shan T, Chen S, Wu T, et al. PD-L1 expression in colon cancer and its relationship with clinical prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019 May 1;12(5):1764-1769.
142. Masugi Y, Nishihara R, Yang J, et al. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer. *Gut*. 2017 Aug;66(8):1463-1473.
143. Zhao LW, Li C, Zhang RL, et al. B7-H1 and B7-H4 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumor FOXP3(+) regulatory T-cell infiltration. *Acta Histochem*. 2014; 116:1163–8.
144. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015; 372:2509–20.

145. Hua D, Sun J, Mao Y, et al. B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2012; 18:971–8.
146. Liang M, Li J, Wang D, et al. T-cell infiltration and expressions of T lymphocyte co-inhibitory B7- H1 and B7-H4 molecules among colorectal cancer patients in northeast China's Heilongjiang province. *Tumour Biol.* 2014; 35:55–60.
147. Song M, Chen D, Lu B, et al. PTEN loss increases PD-L1 protein expression and affects the correlation between PD-L1 expression and clinical parameters in colorectal cancer. *PLoS One.* 2013; 8:e65821.
148. Choueiri TK, Fay AP, Gray KP, et al. PD-L1 expression in nonclear-cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2014;25:2178–2184.
149. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20:2773–2782.
150. Yang CY, Lin MW, Chang YL, et al. Programmed cell death-ligand 1 expression is associated with a favourable immune microenvironment and better overall survival in stage I pulmonary squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2016;57:91–103.
151. Zhang Y, Kang S, Shen J, et al. Prognostic significance of programmed cell death 1 (PD-1) or PD-1 ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial-originated cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e515.
152. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014 Apr;2(4):361-70.
153. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia.* 2006 Mar;8(3):190-8.
154. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006;66:3381–5.
155. Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13:709s–15s.

156. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:3360–5.
157. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2947–53.
158. Wu C, Zhu Y, Jiang J, et al. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem*. 2006;108:19–24.
159. Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15:971–9.
160. Nomi T, Sho M, Akahori T, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2151–7.
161. Bi Y, Ren X, Bai X, et al. Z. PD-1/PD-L1 expressions in medullary thyroid carcinoma: Clinicopathologic and prognostic analysis of Chinese population. *Eur J Surg Oncol*. 2019 Mar;45(3):353-358.
162. Mansour MSI, Malmros K, Mager U, et al. PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Specimens: Association with Clinicopathological Factors and Molecular Alterations. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 19;23(9):4517.
163. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):3992-5.
164. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res*. 2007 Mar 15;67(6):2643-8.
165. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
166. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic

- colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 1;25(22):3230-7.
167. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):466-74.
 168. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jul 22;351(4):337-45.
 169. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1658-64.
 170. Evans M, O'Sullivan B, Hughes F, et al. The Clinicopathological and Molecular Associations of PD-L1 Expression in Non-small Cell Lung Cancer: Analysis of a Series of 10,005 Cases Tested with the 22C3 Assay. *Pathol Oncol Res*. 2020 Jan;26(1):79-89.
 171. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of nonsmall-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(21):2018–2028.
 172. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer* 2015; 89(2):181–188.
 173. Cha YJ, Kim HR, Lee CY, et al. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand-1 expression in lung adenocarcinoma and its relationship with p53 status. *Lung Cancer* 2016; 97:73–80.
 174. Vieira T, Antoine M, Hamard C, et al. Sarcomatoid lung carcinomas show high levels of programmed death ligand-1 (PD-L1) and strong immune-cell infiltration by TCD3 cells and macrophages. *Lung Cancer* 2016; 98:51–58.
 175. Huynh TG, Morales-Oyarvide V, Campo MJ, et al. Programmed cell death ligand 1 expression in resected lung adenocarcinomas: association with immune microenvironment. *J Thorac Oncol* 2016; 11(11):1869–1878.

176. Fang W, Hong S, Chen N, et al. PD-L1 is remarkably over-expressed in EBV-associated pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma and related to poor disease-free survival. *Oncotarget* 2015; 6(32):33019–33032.
177. Calles A, Liao X, Sholl LM, et al. Expression of PD-1 and its ligands, PD-L1 and PD-L2, in smokers and never smokers with KRAS-mutant lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015; 10(12):1726–1735.
178. Koh J, Go H, Keam B, et al. Clinicopathologic analysis of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand 1 and 2 expressions in pulmonary adenocarcinoma: comparison with histology and driver oncogenic alteration status. *Mod Pathol* 2015; 28(9):1154–1166.
179. Gandini S, Massi D, Mandala M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: a systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2016; 100 88–98.
180. Chowdhury S, Veyhl J, Jessa F, et al. Programmed death-ligand 1 overexpression is a prognostic marker for aggressive papillary thyroid cancer and its variants. *Oncotarget* 2016; 7 32318–32328.
181. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 2015;5:43–51.
182. Yang Z, Wu G, Zhang X, et al. Current progress and future perspectives of neoadjuvant anti-PD-1/PD-L1 therapy for colorectal cancer. *Front Immunol.* 2022 Sep 9;13:1001444.
183. Liu C, Liu R, Wang B, et al. Blocking IL-17A enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy in microsatellite stable colorectal cancer. *J Immunother Cancer.* 2021 Jan;9(1):e001895.
184. Blauvelt A. Ixekizumab: a new anti-IL-17A monoclonal antibody therapy for moderate-to severe plaque psoriasis. *Expert Opin Biol Ther* 2016;16:255–63.
185. Esfahani K, Miller WH. Reversal of autoimmune toxicity and loss of tumor response by interleukin-17 blockade. *N Engl J Med* 2017;376:1989–91.
186. Ooki A, Shinozaki E, Yamaguchi K. Immunotherapy in Colorectal Cancer: Current and Future Strategies. *J Anus Rectum Colon.* 2021 Jan 28;5(1):11-24.
187. Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, et al. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation,

medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes, *Mod Pathol.* 2016 29 Sep (9);1104-12.

10. Załączniki

Tab. 16. Szczegółowe dane kliniczno-morfologiczne grupy badanej.

| LP | STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI HISTOLOGICZNEJ | pTNM | LOKALIZACJA | | STAGE | PŁEĆ | WIEK |
|----|--|----------------|--------------------------------|---|-------|------|------|
| 1 | G2 | pT3 N1a Mx | esica | L | IIIB | K | 38 |
| 2 | G2 | pT4a N0 Mx | esica | L | IIB | K | 64 |
| 3 | G2 | pT3 N1b M1a | esica | L | IVA | M | 75 |
| 4 | G3 | pT3 N0 Mx | wstępnicza | P | IIA | K | 66 |
| 5 | G2 | pT3 N1 Mx | esica | L | IIIB | M | 63 |
| 6 | G2 | pT2 N0 Mx | poprzecznicza | P | I | M | 66 |
| 7 | G2 | pT3 N0 Mx | zagięcie śledzionowe | L | IIA | K | 58 |
| 8 | G2 | pT3 N2a M1a | esica | L | IVA | K | 55 |
| 9 | G2 | pT4b N0 Mx | esica | L | IIC | M | 75 |
| 10 | G2 | pT2 N0 Mx | odbytnicza | L | I | M | 61 |
| 11 | G2 | pT3 N0 Mx | wstępnicza | P | IIA | M | 70 |
| 12 | G2 | pT3a N2a M1 | poprzecznicza | P | IV | M | 74 |
| 13 | G3 | pT4a N2b Mx | zagięcie wątrobowe | P | IIIC | K | 71 |
| 14 | G2 | pT4a N2a Mx | esica | L | IIIC | K | 76 |
| 15 | G2 | pT3 N2b Mx | odbytnicza | L | IIIC | M | 68 |
| 16 | G2 | pT3 N1 Mx | odbytnicza | L | IIIB | M | 75 |
| 17 | G2 | pT3 N1b Mx | esica | L | IIIB | K | 65 |
| 18 | G2 | pT3 N1b Mx | wstępnicza | P | IIIB | K | 75 |
| 19 | G2 | pT4a N2a Mx | esica | L | IIIC | M | 57 |
| 20 | G2 | pT2 N0 Mx | kątnicza | P | I | M | 88 |
| 21 | G2 | pT3a N0 Mx | odbytnicza | L | IIA | M | 59 |
| 22 | G2 | pT2 N0 Mx | odbytnicza | L | I | M | 72 |
| 23 | G3 | pT3 N2b Mx | kątnicza | P | IIIC | M | 47 |
| 24 | G2 | pT3 N0 Mx | esica | L | IIA | K | 78 |
| 25 | G2 | pT4b N1 Mx | odbytnicza | L | IIIC | K | 47 |
| 26 | G2 | pT3 N2a Mx | wstępnicza | P | IIIB | M | 79 |
| 27 | G2 | pT3 N0 Mx | wstępnicza | P | IIA | M | 66 |
| 28 | G2 | pT4a N2a Mx | zagięcie esiczo- odbytnicze | L | IIIC | M | 85 |
| 29 | G2 | pT2 N0 Mx | kątnicza | P | I | K | 92 |
| 30 | G2 | pT4a N2a Mx | esica | L | IIIC | M | 46 |
| 31 | G2 | pT3 N1c Mx | odbytnicza | L | IIIB | M | 76 |
| 32 | G2 | pT2 N0 Mx | wstępnicza | P | I | K | 64 |
| 33 | G2 | pT3 N1a Mx | esica | L | IIIB | K | 81 |
| 34 | G2 | pT3 N0 Mx | odbytnicza | L | IIA | M | 59 |

| | | | | | | | |
|----|----|-------------|--------------------------------|---|------|---|----|
| 35 | G2 | pT3a N0 Mx | odbytnica | L | IIA | M | 73 |
| 36 | G2 | pT4b N1b Mx | kątnica | P | IIIC | K | 83 |
| 37 | G2 | pT4a N2a Mx | odbytnica | L | IIIC | M | 63 |
| 38 | G2 | pT3 N0 Mx | esica | L | IIA | M | 79 |
| 39 | G1 | pT2 N1a Mx | zagięcie esiczo- odbytnicze | L | IIIA | M | 64 |
| 40 | G2 | pT4b N1b Mx | odbytnica | L | IIIC | M | 50 |
| 41 | G2 | pT4a N0 Mx | poprzecznicza | P | IIB | M | 81 |
| 42 | G3 | pT3 N2a Mx | zagięcie esiczo- odbytnicze | L | IIIB | M | 78 |
| 43 | G2 | pT3 N0 Mx | odbytnica | L | IIA | M | 63 |
| 44 | G2 | pT3 N0 Mx | wstępnicza | P | IIA | M | 81 |
| 45 | G2 | pT2 N0 Mx | kątnica | P | I | M | 67 |
| 46 | G2 | pT3 N0 M | wstępnicza | P | IIA | M | 56 |
| 47 | G2 | pT3 N2a Mx | esica | L | IIIB | M | 83 |
| 48 | G2 | pT3 N0 Mx | esica | L | IIA | K | 70 |
| 49 | G2 | pT3 N2b Mx | zagięcie esiczo- odbytnicze | L | IIIC | M | 92 |
| 50 | G2 | pT3a N0 Mx | zstępnicza | L | IIA | K | 61 |
| 51 | G2 | pT3 N0 Mx | esica | L | IIA | K | 37 |
| 52 | G2 | pT4a N0 Mx | esica | L | IIB | K | 73 |
| 53 | G2 | pT3a N0 Mx | zstępnicza | L | IIA | K | 73 |
| 54 | G2 | pT3 N1b Mx | esica | L | IIIB | M | 75 |
| 55 | G1 | pT3a N0 Mx | poprzecznicza | P | IIA | M | 85 |
| 56 | G2 | pT4a N1b Mx | kątnica | P | IIIB | K | 81 |
| 57 | G3 | pT4a N2b Mx | esica | L | IIIC | K | 81 |
| 58 | G2 | pT2 N0 Mx | wstępnicza | P | I | K | 75 |
| 59 | G2 | pT3 N1b Mx | poprzecznicza | P | IIIB | M | 63 |
| 60 | G2 | pT2 N0 Mx | odbytnica | L | I | K | 44 |
| 61 | G2 | pT3 N2b Mx | esica | L | IIIC | K | 79 |
| 62 | G2 | pT2 N0 Mx | odbytnica | L | I | M | 67 |
| 63 | G2 | pT3 N0 Mx | odbytnica | L | IIA | K | 66 |
| 64 | G2 | pT3 N1 Mx | wstępnicza | P | IIIB | K | 83 |
| 65 | G3 | pT4a N0 Mx | poprzecznicza | P | IIB | K | 76 |
| 66 | G2 | pT4a N2b Mx | poprzecznicza | P | IIIC | K | 62 |
| 67 | G2 | pT3 N1a Mx | esica | L | IIIB | K | 70 |
| 68 | G2 | pT3 N2b Mx | esica | L | IIIC | K | 65 |
| 69 | G2 | pT3 N0 Mx | zagięcie esiczo- odbytnicze | L | IIA | K | 80 |
| 70 | G2 | pT3 N1 Mx | zagięcie wątrobowe | P | IIIB | K | 61 |
| 71 | G2 | pT3 N1a Mx | wstępnicza | P | IIIB | M | 78 |
| 72 | G2 | pT3 N0 Mx | poprzecznicza | P | IIA | M | 63 |
| 73 | G2 | pT4a N1a Mx | esica | L | IIIB | M | 65 |
| 74 | G2 | pT4a N1a Mx | kątnica | P | IIIB | M | 52 |
| 75 | G2 | pT4a N2b Mx | kątnica | P | IIIC | M | 69 |
| 76 | G2 | pT4b N2b Mx | esica | L | IIIC | K | 78 |

| | | | | | | | |
|----|----|-------------|--------------------------------|---|------|---|----|
| 77 | G2 | pT3 N2b Mx | poprzecznicza | P | IIIC | M | 65 |
| 78 | G2 | pT3 N0 Mx | esica | L | IIA | M | 65 |
| 79 | G2 | pT3 N0 Mx | esica | L | IIA | M | 67 |
| 80 | G2 | pT3 N0 Mx | esica | L | IIA | K | 85 |
| 81 | G2 | pT3 N1c Mx | odbytnica | L | IIIB | M | 64 |
| 82 | G2 | pT3 N0 Mx | wstępnicza | P | IIA | K | 89 |
| 83 | G2 | pT2 N1b Mx | odbytnica | L | IIIA | M | 73 |
| 84 | G2 | pT3 N2b Mx | esica | L | IIIC | M | 53 |
| 85 | G2 | pT4a N1b Mx | poprzecznicza | P | IIIB | K | 85 |
| 86 | G2 | pT2 N1 M1 | esica | L | IV | M | 76 |
| 87 | G1 | pT2 N0 Mx | zagięcie esiczo- odbytnicze | L | I | M | 55 |
| 88 | G2 | pT3 N0 Mx | odbytnica | L | IIA | M | 69 |
| 89 | G2 | pT3 N2b Mx | odbytnica | L | IIIC | M | 86 |
| 90 | G2 | pT4a N2b Mx | kątnica z wstępnicą | P | IIIC | M | 86 |
| 91 | G2 | pT3 N1a Mx | kątnica | P | IIIB | M | 57 |
| 92 | G2 | pT2 N0 Mx | kątnica | P | I | M | 52 |
| 93 | G2 | pT3 N1 Mx | odbytnica | L | IIIB | K | 72 |
| 94 | G2 | pT3 N0 Mx | esica | L | IIA | M | 64 |
| 95 | G2 | pT2 N0 Mx | esica | L | I | M | 85 |
| 96 | G2 | pT3 N0 Mx | kątnica | P | IIA | K | 75 |
| 97 | G2 | pT4a N2 Mx | kątnica | P | IIIC | K | 70 |
| 98 | G2 | pT2 N1 Mx | esica | L | IIIA | K | 67 |

Tab. 17. Odsetek limfocytów, które wykazują dodatnią reakcję w zależności od intensywności ekspresji białka PD-1 [0, odczyn słaby (1+), odczyn o średniej intensywności (2+), odczyn silny (3+)] oraz wyliczona wartość H-score dla każdego przypadku.

| L.p. | 3+ PD-1 | 2+ PD-1 | 1+ PD-1 | 0 PD-1 | H-score PD-1 |
|------|---------|---------|---------|---------|---------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 9,2621 | 90,7379 | 9,2621 |
| 3 | 27,326 | 10,37 | 6,2366 | 56,0674 | 108,95 |
| 4 | 0 | 15,327 | 7,3266 | 77,3464 | 37,98 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 5,3269 | 94,6731 | 5,3269 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 5,4285 | 94,5715 | 5,4285 |
| 9 | 0 | 20,154 | 14,846 | 65 | 55,154 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |

| | | | | | |
|----|---|--------|--------|---------|---------------|
| 11 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 18 | 0 | 9,6545 | 1,3514 | 88,9941 | 20,66 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 6,3654 | 93,6346 | 6,3654 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 6,3572 | 93,6428 | 6,3572 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 29 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 31 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 32 | 0 | 4,5674 | 1,1568 | 94,2758 | 10,292 |
| 33 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 34 | 0 | 8,5988 | 1,206 | 90,1952 | 18,403 |
| 35 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 36 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 37 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 38 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 39 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 40 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 41 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 42 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 43 | 0 | 9,9658 | 0,9633 | 89,0709 | 20,895 |
| 44 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 45 | 0 | 4,6953 | 2,327 | 92,9777 | 11,718 |
| 46 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 47 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 48 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 49 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 50 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 51 | 0 | 2,1665 | 3,3322 | 94,5013 | 7,6653 |
| 52 | 0 | 0 | 5,128 | 94,872 | 5,128 |
| 53 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 54 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 55 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 56 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 57 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |

| | | | | | |
|----|--------|--------|--------|---------|---------------|
| 58 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 59 | 0 | 0 | 5,6593 | 94,3407 | 5,6593 |
| 60 | 0 | 0 | 14,575 | 85,425 | 14,575 |
| 61 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 62 | 0 | 0 | 5,3649 | 94,6351 | 5,3649 |
| 63 | 0 | 0 | 7,1393 | 92,8607 | 7,1393 |
| 64 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 65 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 66 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 67 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 68 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 69 | 0 | 4,6851 | 1,0135 | 94,3014 | 10,384 |
| 70 | 0 | 0 | 63,672 | 36,328 | 63,672 |
| 71 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 72 | 0 | 0 | 5,2149 | 94,7851 | 5,2149 |
| 73 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 74 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 75 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 76 | 0 | 0 | 14,366 | 85,634 | 14,366 |
| 77 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 78 | 0 | 16,237 | 1,3298 | 82,4332 | 33,804 |
| 79 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 80 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 81 | 17,336 | 12,365 | 5,9443 | 64,3547 | 82,682 |
| 82 | 0 | 0,4296 | 4,8863 | 94,6841 | 5,7455 |
| 83 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 84 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 85 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 86 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 87 | 0 | 2,1582 | 2,912 | 94,9298 | 7,2285 |
| 88 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 89 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 90 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 91 | 0 | 7,3629 | 0,6497 | 91,9874 | 15,375 |
| 92 | 0 | 7,266 | 1,3146 | 91,4194 | 15,846 |
| 93 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 94 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 95 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 96 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 97 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 98 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |

Tab. 18. Odsetek komórek rakowych, które wykazują dodatnią reakcję w zależności od intensywności ekspresji białka PD-L1 [0, odczyn słaby (1+), odczyn o średniej intensywności (2+), odczyn silny (3+)] oraz wyliczona wartość H-score dla każdego przypadku.

| L.p. | 3+ PD-L1 guz | 2+ PD-L1 guz | 1+ PD-L1 guz | 0 PD-L1 guz | H-score PD-L1 guz |
|------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 4 | 9,735 | 34,307 | 51,55 | 4,408 | 149,37 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 29 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 31 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 32 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 33 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 34 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 35 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 36 | 0,3889 | 52,72 | 45,6 | 1,2911 | 152,21 |

| | | | | | |
|----|--------|-------|-------|---------|---------------|
| 37 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 38 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 39 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 40 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 41 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 42 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 43 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 44 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 45 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 46 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 47 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 48 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 49 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 50 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 51 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 52 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 53 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 54 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 55 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 56 | 1,95 | 39,05 | 50,48 | 8,52 | 134,43 |
| 57 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 58 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 59 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 60 | 52,7 | 22,61 | 23,83 | 0,86 | 227,15 |
| 61 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 62 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 63 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 64 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 65 | 0 | 2,848 | 39,1 | 58,052 | 44,796 |
| 66 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 67 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 68 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 69 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 70 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 71 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 72 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 73 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 74 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 75 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 76 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 77 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 78 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 79 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 80 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 81 | 7,072 | 46,38 | 42,6 | 3,948 | 156,58 |
| 82 | 0,3559 | 14,23 | 48,4 | 37,0141 | 77,928 |

| | | | | | |
|----|---|---|---|-----|---|
| 83 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 84 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 85 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 86 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 87 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 88 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 89 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 90 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 91 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 92 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 93 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 94 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 95 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 96 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 97 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 98 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |

Tab. 19. Odsetek limfocytów, które wykazują dodatnią reakcję w zależności od intensywności ekspresji białka PD-L1 [0, odczyn słaby (1+), odczyn o średniej intensywności (2+), odczyn silny (3+)] oraz wyliczona wartość H-score dla każdego przypadku.

| L.p. | 3+ PD-L1 limfocyty | 2+ PD-L1 limfocyty | 1+ PD-L1 limfocyty | 0 PD-L1 limfocyty | H-score PD-L1 limfocyty |
|------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 2 | 0 | 11,7 | 65,6 | 22,7 | 89 |
| 3 | 0,226 | 19,66 | 65,76 | 14,354 | 105,758 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 9 | 3,619 | 29,9 | 60,57 | 5,911 | 131,227 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 16 | 4,777 | 23,89 | 53,98 | 17,353 | 116,091 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |

| | | | | | |
|----|--------|-------|-------|---------|----------------|
| 18 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 20 | 7,143 | 19,29 | 62,14 | 11,427 | 122,149 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 67,16 | 32,84 | 67,16 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 24 | 0,787 | 3,15 | 59,06 | 37,003 | 67,721 |
| 25 | 0 | 5,556 | 44,44 | 50,004 | 55,552 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 27 | 0 | 1,538 | 53,85 | 44,612 | 56,926 |
| 28 | 1,546 | 22,16 | 59,28 | 17,014 | 108,238 |
| 29 | 0 | 6,32 | 50,93 | 42,75 | 63,57 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 31 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 32 | 0,3021 | 6,344 | 52,27 | 41,0839 | 65,8643 |
| 33 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 34 | 0 | 17,05 | 65,51 | 17,44 | 99,61 |
| 35 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 36 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 37 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 38 | 0 | 14,29 | 85,71 | 0 | 114,29 |
| 39 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 40 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 41 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 42 | 0 | 1,149 | 56,32 | 42,531 | 58,618 |
| 43 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 44 | 0,2789 | 11,02 | 56,07 | 32,6311 | 78,9467 |
| 45 | 0 | 11,32 | 77,36 | 11,32 | 100 |
| 46 | 0 | 7,627 | 64,41 | 27,963 | 79,664 |
| 47 | 0 | 6,13 | 76,25 | 17,62 | 88,51 |
| 48 | 5,714 | 17,14 | 71,43 | 5,716 | 122,852 |
| 49 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 50 | 8,197 | 21,31 | 45,9 | 24,593 | 113,111 |
| 51 | 0 | 11,86 | 70,62 | 17,52 | 94,34 |
| 52 | 4,314 | 17,43 | 58,43 | 19,826 | 106,232 |
| 53 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 54 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 55 | 0,8333 | 16,25 | 64,58 | 18,3367 | 99,5799 |
| 56 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 57 | 0 | 1,29 | 29,68 | 69,03 | 32,26 |
| 58 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 59 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 60 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 61 | 1,818 | 1,818 | 20 | 76,364 | 29,09 |
| 62 | 0,5682 | 14,2 | 49,81 | 35,4218 | 79,9146 |
| 63 | 4,835 | 12,98 | 55,47 | 26,715 | 95,935 |

| | | | | | |
|----|--------|-------|-------|---------|----------------|
| 64 | 1,538 | 0 | 36,92 | 61,542 | 41,534 |
| 65 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 66 | 3,481 | 17,09 | 59,81 | 19,619 | 104,433 |
| 67 | 1,389 | 20,83 | 44,44 | 33,341 | 90,267 |
| 68 | 4,321 | 9,877 | 55,56 | 30,242 | 88,277 |
| 69 | 0 | 7,143 | 53,57 | 39,287 | 67,856 |
| 70 | 0 | 17,02 | 38,3 | 44,68 | 72,34 |
| 71 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 72 | 0,9238 | 7,39 | 50,81 | 40,8762 | 68,3614 |
| 73 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 74 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 75 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 76 | 0 | 8,108 | 55,41 | 36,482 | 71,626 |
| 77 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 78 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 79 | 1,22 | 9,756 | 50,81 | 38,214 | 73,982 |
| 80 | 0 | 2,694 | 58,59 | 38,716 | 63,978 |
| 81 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 82 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 83 | 0 | 13,62 | 64,5 | 21,88 | 91,74 |
| 84 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 85 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 86 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 87 | 5,108 | 26,34 | 53,76 | 14,792 | 121,764 |
| 88 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 89 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 90 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 91 | 0 | 3,371 | 59,38 | 37,249 | 66,122 |
| 92 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 93 | 0 | 5,195 | 70,13 | 24,675 | 80,52 |
| 94 | 0 | 0 | 78,95 | 21,05 | 78,95 |
| 95 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 96 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 97 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 98 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |

11. Spis tabel

Tab. 1. Charakterystyka grupy badanej.

Tab. 2. Rozkład ekspresji białka PD-1 oraz białka PD-L1.

Tab. 3. Rozkład dodatniej ekspresji białka PD-1 oraz białka PD-L1.

Tab. 4. Korelacja ekspresji białka PD-1 i białka PD-L1 w badanych komórkach, gdzie * to $p < 0,05$.

Tab. 5. Ekspresja białek PD-1 i PD-L1 a wybrane parametry kliniczno-morfologiczne.

Tab. 6. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z płcią.

Tab. 7. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z wiekiem.

Tab. 8. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu.

Tab. 9. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 ze stopniem złośliwości histologicznej guza.

Tab. 10. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 ze stanem okolicznych węzłów chłonnych.

Tab. 11. Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 w limfocytach ze statusem genu KRAS (MUT - występowanie mutacji; WT - wild type = typ dziki = brak mutacji).

Tab. 12. Korelacja statusu genu KRAS z ekspresją białka PD-1 i białka PD-L1 w limfocytach.

Tab. 13. Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z występowaniem limfocytów naciekających utkanie guza i zlokalizowanych w okolicy guza („+” naciek limfocytny, a „-” brak nacieku limfocytnego).

Tab. 14. Korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z naciekiem limfocytnym.

Tab. 15. Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z występowaniem pączkowania guza.

Tab. 16. Szczegółowe dane kliniczno-morfologiczne grupy badanej.

Tab. 17. Odsetek limfocytów, które wykazują dodatnią reakcję w zależności od intensywności ekspresji białka PD-1 [0, odczyn słaby (1+), odczyn o średniej intensywności (2+), odczyn silny (3+)] oraz wyliczona wartość H-score dla każdego przypadku.

Tab. 18. Odsetek komórek rakowych, które wykazują dodatnią reakcję w zależności od intensywności ekspresji białka PD-L1 [0, odczyn słaby (1+), odczyn o średniej intensywności (2+), odczyn silny (3+)] oraz wyliczona wartość H-score dla każdego przypadku.

Tab. 19. Odsetek limfocytów, które wykazują dodatnią reakcję w zależności od intensywności ekspresji białka PD-L1 [0, odczyn słaby (1+), odczyn o średniej intensywności (2+), odczyn silny (3+)] oraz wyliczona wartość H-score dla każdego przypadku.

12. Spis rycin

Ryc. 1. Terapia celowana z przeciwciałami monoklonalnymi blokującymi białka PD-1 i PD-L1 (projekt własny).

Ryc. 2. Urządzenie do wykonywania mikromacierzy tkankowych Manual Tissue Arrayer (MTA).

Ryc. 3. Mikromacierz tkankowa (3a) oraz zabarwiony preparat wykonany z tej macierzy (3b).

Ryc. 4. Odczyn cytoplazmatyczny w limfocytach w migdałku jako kontrola pozytywna w reakcji z przeciwciałem przeciw receptorowi PD-1.

Ryc. 5. Reakcja z przeciwciałem przeciw białku PD-L1 - odczyn błonowy w komórkach trofoblastu kosmków łożyskowych jako kontrola pozytywna (5a) oraz reakcja z monoklonalną króliczą immunoglobuliną - brak odczynu w komórkach trofoblastu jako kontrola negatywna (5b).

Ryc. 6a. Zeskanowany preparat z macierzą tkankową z barwieniem immunohistochemicznym (przeciwciało anty-PD-L1).

Ryc. 6b. Fragment powyższej macierzy tkankowej z barwieniem immunohistochemicznym (przeciwciało anty-PD-L1)

Ryc. 6c. Fragment powyższej macierzy tkankowej z zastosowaniem kontroli negatywnej.

Ryc. 7. Ekspresja białka PD-1 w cytoplazmie limfocytów w obrębie guza.

Ryc. 8. Ekspresja białka PD-L1 w błonie komórkowej komórek rakowych (8a) i w błonie komórkowej limfocytów otaczających cewkę rakową (8b).

Ryc. 9. Związek ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych z płcią, gdzie * to $p < 0,05$.

Ryc. 10. Związek ekspresji białka PD-1 z wiekiem, gdzie ** to $p < 0,01$

Ryc. 11. Związek ekspresji białka PD-1 ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu, gdzie * to $p < 0,05$.

Ryc. 12. Związek ekspresji białka PD-L1 w limfocytach ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu, gdzie * to $p < 0,05$.

Ryc. 13. Związek ekspresji białka PD-L1 w komórkach rakowych ze stopniem złośliwości histologicznej guza, gdzie * to $p < 0,05$.

Ryc. 14. Związek ekspresji białka PD-1 ze stanem okolicznych węzłów chłonnych, gdzie ** to $p < 0,01$.

Ryc. 15. Związek ekspresji białka PD-L1 w limfocytach ze stanem okolicznych węzłów chłonnych, gdzie ** to $p < 0,01$.

Ryc. 16. Związek ekspresji białka PD-1 ze statusem genu KRAS, gdzie ** to $p < 0,01$.

Ryc. 17. Związek ekspresji białka PD-1 z występowaniem limfocytów naciekających utkanie guza, gdzie *** to $p < 0,001$.

Ryc. 18. Przeżycie pacjentów po 12 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.

Ryc. 19. Przeżycie pacjentów po 24 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.

Ryc. 20. Przeżycie pacjentów po 36 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.

Ryc. 21. Przeżycie pacjentów po 48 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.

Ryc. 22. Przeżycie pacjentów po 60 miesiącach od momentu rozpoznania względem ekspresji białka PD-1 oraz PD-L1 w komórkach rakowych i w limfocytach.

13. Wykaz skrótów

- ASRi – *Age-Standardized Incidence Rate*; częstość występowania według standardu wieku
- CEA – *CarcinoEmbryonic Antygen*; antygen rakowo-płodowy
- CIMP – *CpG Island Methylator Phenotype*; hipermetylacja wysp CpG
- CTL – *Cytotoxic T Cells*; limfocyty T cytotoksyczne
- DNMT – *DNA MethylTransferase*; metylotransferazy DNA
- dMMR – *deficient MisMatch Repair*; system niepełnej naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych
- EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*; receptor naskórkowego czynnika wzrostu
- EMT – *Epithelial-Mesenchymal Transition*; przejście nabłonkowo-mezenchymalne
- FAP – *Familial Adenomatous Polyposis*; rodzinna gruczolakowata polipowatość
- FDA – *Food and Drug Administration*; Agencja ds. Żywności i Leków
- HE – *Haematoxylin and Eosin stain*; barwienie hematoksyliną i eozyną
- HNPCC – *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*; dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością
- MAP – *MUTYH Associated Polyposis*; dziedziczna recesywnie polipowatość związana z MUTYH
- MMR – *MisMatch Repair*; system naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych
- MSI – *MicroSatellite Instability*; niestabilność mikrosatelitarna
- MSS – *MicroSatellite Stability*; stabilność mikrosatelitarna
- NSCLC – *Non-Small Cell Lung Carcinoma*; niedrobnokomórkowy rak płuc
- PD-1 – *Programmed cell Death protein 1*; białko programowanej śmierci komórki 1
- PD-L1 – *Programmed Death-Ligand 1*; ligand białka programowanej śmierci komórki 1
- PD-L2 – *Programmed Death-Ligand 2*; ligand białka programowanej śmierci komórki 1

pMMR – *proficient MisMatch Repair*; system bieglej naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*; atlasu genomu raka

TIL – *Tumor Infiltrating Lymphocytes*; naciek limfocytarny w utkaniu guza

VGFR – *Vascular Endothelial Growth Factor*; czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego