

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum

Katarzyna Dyląg-Trojanowska

**Studies on the usefulness of identification of disseminated tumor cells (DTC) in the bone marrow and some parameters of the immune system in patients with colorectal cancer located in the left half of the colon and in the rectum**

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

*Praca doktorska*

Promotor: Dr hab. n. med. Antoni Szczepanik, Prof. UJ

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Radosław Pach

Pracę wykonano w I Katedrze Chirurgii Ogólnej i Klinice Chirurgii Ogólnej, Onkologicznej i Gastroenterologicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. n. med. Piotr Richter

Kraków, 2020 rok

*Dziękuję mojemu Promotorowi  
Profesorowi Antoniemu M. Szczepanikowi  
za pomoc i nieocenione wsparcie  
przy realizacji tej pracy doktorskiej*

## Spis treści

1. Wprowadzenie.....	4
2. Wykaz skrótów.....	6
3. Wstęp.....	7
4. Cele pracy.....	13
5. Materiał i metody.....	13
6. Podsumowanie wyników i wnioski.....	15
7. Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim.....	19
8. Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim.....	22
9. Piśmiennictwo.....	25
10. Artykuły stanowiące monotematyczny cykl publikacji.....	27

Artykuł nr 1: The impact of bone marrow disseminated tumor cells on survival and disease progression in left-sided colorectal cancer patients. Pach, R.; Dylag-Trojanowska, K.; Baran, J.; Czupryna A.; Siedlar, M.; Zybaczynska, J.; Brandt PH.,; Szczepanik AM. *Pol Arch Intern Med.* 2020 Feb 20. doi: 10.20452/pamw.15200. [Epub ahead of print]

Artykuł nr 2: The prognostic significance of HLAA2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers. Dylag-Trojanowska, K.; Pach, R.; Siedlar, M.; Baran, J.; Zybaczynska, J.; Szczepanik AM.

*Nowotwory J Oncol* 2020; 70: 47–53.

Artykuł nr 3: T Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Lymphocytes in the Peripheral Blood of Left-Sided Colorectal Cancer Patients. Dylag-Trojanowska, K.; Rogala, J.; Pach, R.; Siedlar, M.; Baran, J.; Sierzega, M.; Zybaczynska, J.; Lenart, M.; Rutkowska-Zapala, M.; Szczepanik, A.M. *Medicina (Lithuania)* 2019, 55, 307. doi:10.3390/medicina55060307

11. Oświadczenia współautorów prac.....	54
---	----

## 1.Wprowadzenie

Niniejsza rozprawa doktorska pt.: „Badania nad przydatnością oznaczania rozsianych komórek nowotworowych (DTC) w szpiku kostnym i niektórych parametrów układu odpornościowego u chorych na raka jelita grubego zlokalizowanego w lewej połowie okrężnicy i w odbytnicy” powstała w oparciu o monotematyczny cykl trzech artykułów opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie PubMed oraz znajdujących się na liście MNiSW.

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską :

Tytuł publikacji	Punkty MNiSW	Impact factor
<b>The impact of bone marrow disseminated tumor cells on survival and disease progression in left-sided colorectal cancer patients.</b> Pach, R.; Dyląg-Trojanowska, K.; Baran, J.; Czupryna A.; Siedlar, M.; Zybaczyńska, J.; Brandt PH.,; Szczepanik AM. <i>Pol Arch Intern Med.</i> <b>2020</b> Feb 20. [Epub ahead of print] DOI: 10.20452/pamw.15200	100	2,882
<b>The prognostic significance of HLAA2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers</b> Dyląg-Trojanowska, K.; Pach, R.; Siedlar, M.; Baran, J.; Zybaczyńska, J.; Szczepanik AM. <i>Nowotwory J Oncol</i> <b>2020</b> ; 70: 47–53.	20	
<b>T Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Lymphocytes in the Peripheral Blood of Left-Sided Colorectal Cancer Patients.</b> Dyląg-Trojanowska, K.; Rogala, J.; Pach, R.; Siedlar, M.; Baran, J.; Sierżęga, M.; Zybaczyńska, J.; Lenart, M.; Rutkowska-Zapała, M.; Szczepanik, A.M. <i>Medicina (Lithuania)</i> <b>2019</b> , 55, 307. DOI:10.3390/medicina55060307	40	1,467
Podsumowanie punktów	160	4,349

Rodzaj publikacji	Liczba	Punkty MNiSW	Impact factor
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	160	4,349
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	5	130	2,177
Streszczenia zjazdowe	6		
Razem	14	290	6,526

## 2. Wykaz skrótów

CEA – (carcinoembryonic antigen) - antygen rakowo-płodowy

CI – (confidence interval) – przedział ufności

CIN – (chromosomal instability – niestabilność chromosomalna

CK – cytokeratin - cytokeratyna

CRC – (colorectal cancer ) – rak jelita grubego

CTLA4 – (cytotoxic T-lymphocyte antygen 4) antygen limfocytów cytotoksycznych typu 4

CRM – (circumferential resection margin) okrężny (radialny) margines operacyjny

DTC – (disseminated tumor cells) - rozsiane komórki nowotworowe

dMMR /MSI- H – mismatch repair deficient/ micosatellite instability high - defekt w genach mutatorowych (geny naprawy błędnie sparowanych zasad) /wysoka niestabilność mikrosatelitarna

HLA (human leukocyte antigens) - ludzkie antygeny leukocytarne

HLA2 (human leukocyte antigen A2) - ludzki antygen leukocyтары A2

HR – (Hazard ratio) – współczynnik ryzyka

IL-10 – (interleukin 10) – interleukina 10

IL-12 – (interleukin 12) – interleukina 12

MSI – (microsatellite instability) – niestabilność mikrosatelitarna

MSS – (microsatellite stable) – stabilność mikrosatelitarna

PD-1 – (programmed death 1 receptor ) receptor indukujący apoptozę

PD-L1– (programmed death 1 receptor ligand) – ligand dla receptora indukującego apoptozę

PN/PNI – ( perineural invasion) inwazja okołonerwowa

SD – standard deviation – odchylenie standardowe

TAA – (tumor associated antigen) – antygeny obecne na komórkach guza ale też na komórkach somatycznych

TGFb – (transforming growth factor beta) – transformujący czynnik wzrostu beta

TD – (tumor deposits) – depozyty nowotworowe

TIL – (Tumor – infiltrating lymphocyte) – limfocyty naciekające mikrośrodowisko guza

UICC – (Union for International Cancer Control) – Międzynarodowa Unia Kontroli Raka

### 3. Wstęp

Rak jelita grubego (CRC) jest najczęstszym nowotworem przewodu pokarmowego, a według statystyki opublikowanej w 2018 roku przez UICC trzecim nowotworem jeśli chodzi o zachorowalność oraz drugą przyczyną zgonu z powodu chorób nowotworowych na świecie.

Standardowe leczenie chorych z rakiem jelita grubego obejmuje zabieg chirurgiczny – odcinkową resekcję jelita grubego wraz z guzem oraz regionalnym układem chłonnym odpowiedniej części okrężnicy oraz chemioterapię w stopniu zaawansowania III oraz u pacjentów z czynnikami ryzyka nawrotu choroby w II stopniu zaawansowania.

W przypadku raka odbytnicy w I i II stopniu zaleca się resekcję przednią lub brzuszno-kroczową odbytnicy z całkowitym wycięciem mezorektum, w III stopniu radioterapię przedoperacyjną, następnie zabieg operacyjny i pooperacyjną chemioterapię.

W IV stopniu zaawansowania klinicznego postępowanie i jego kolejność są uzależnione od zaawansowania nowotworu i stanu ogólnego chorego.

Mimo radykalnego zabiegu chirurgicznego i leczenia uzupełniającego u 25-50 % pacjentów w stopniu II i III dochodzi do nawrotu choroby w wyniku niewykrytego rozsiewu komórek nowotworowych [1].

W przypadkach zaawansowanych lub nawrotach choroby stosuje się leczenie biologiczne, celowane, przeciwko czynnikom wzrostu lub ich receptorom. W raku jelita grubego od wielu lat podejmowane są próby immunoterapii lub immunochemioterapii. W latach 90 XX wieku chemioterapia uzupełniona o niespecyficzną immunoterapię stanowiła jedną z często stosowanych alternatyw dla samej chemioterapii. Jednak postęp w dziedzinie chemioterapii i wdrożenie nowych leków pozwoliło na uzyskanie lepszych wyników odległych i te terapie zostały zarzucone. Kontynuowano badania w oparciu o szczepionki przeciwnowotworowe (komórkowe i peptydowe), terapię adoptywną, stymulację receptorów „toll-like”, przeciwciała monoklonalne, cytokiny, a w ostatnich latach o tzw. „checkpoints inhibitors” odhamowujące odpowiedź limfocytów T-cytotoksycznych. Z terapią opartą o odhamowywanie punktów kontroli (checkpoints) wiąże się aktualnie największe nadzieje.

Punkty kontroli odpowiedzi immunologicznej (checkpoints) utrudniają indukcję i propagację antygenowo swoistych limfocytów T w obrębie węzłów chłonnych (CTLA-4) oraz uniemożliwiają efektywną eliminację komórek nowotworowych w mikrośrodowisku guza (interakcja PD1-PD-L1).

Przeciwciała monoklonalne, które blokują cząsteczki CTLA-4 na powierzchni limfocytów T umożliwiają reaktywację swoistej odpowiedzi immunologicznej.

Kolejne badania między innymi doprowadziły do rejestracji pierwszego humanizowanego przeciwciała monoklonalnego ukierunkowanego na cząsteczkę CTLA4 - ipilimumabu. Blokada CTLA-4 w wyniku zastosowania ipilimumabu wzmacnia aktywność i proliferację limfocytów T, prowadząc w konsekwencji do zwiększonego nacieku tych komórek w mikrośrodowisku guza.

Zastosowanie przeciwciał anti-PD-L1 lub anti-PD-1 prowadzi natomiast do zahamowania indukowanej przez komórki nowotworowe apoptozy swoistych, aktywnych limfocytów T cytotoksycznych w obrębie mikrośrodowiska nowotworu.

Wyniki badania klinicznego CheckMate 142 (NCT02060188) dowiodły, że terapia ludzkim monoklonalnym p/c anti PD-1 (nivolumabem) pozwala na uzyskanie trwałych odpowiedzi i kontrolę choroby u pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego, ze stwierdzonym zaburzeniem mechanizmów naprawczych DNA (dMMR /MSI-H), którzy mieli progresję w czasie lub po chemioterapii opartej na fluoropirymidynie, oksaliplatynie czy irynotekanie [2].

Kolejne badania wykazały, że zastosowanie politerapii nivolumab + ipilimumab w stosunku do monoterapii p/c anti PD-1 charakteryzuje się wyższym odsetkiem odpowiedzi oraz ma korzystniejszy profil zysk-ryzyko u pacjentów z rakiem jelita grubego [3]. Jednak doświadczenia zebrane w większości prowadzonych badań klinicznych dotyczą IV stopnia zaawansowania raka.

Wydaje się, że połączenie immunoterapii z klasycznym leczeniem cytotoksycznym (poddane ocenie w badaniu III fazy COMMIT) także jest obiecującą strategią, a udowodniono już jej skuteczność (połączenie atezolizumabu z carboplatiną i paklitakselem) w terapii zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (badanie IMpower150) [4].

Trwają też badania kliniczne nad lekami celującymi w inne immunologiczne punkty kontrolne takie jak LAG-3, TIM-3, IDO itp. szczególnie u pacjentów z guzami opornymi na działanie przeciwciał anti-PD-1 lub anti PD-L1 (NCT03343613)

Ze względu na ewoluujące schematy terapii raka jelita grubego trudno odnosić dane sprzed ponad 20 lat do obecnych wyników leczenia chorych z tym nowotworem. Wykazane w badaniach korzyści z immunoterapii dotyczą najbardziej zaawansowanych stadiów tego



nowotworu. Można więc sądzić, że pewne elementy immunoterapii mogłyby być wprowadzone u chorych bez rozsiewu nowotworu.

Powyższe dane stanowią potwierdzenie tezy, że immunoterapia jest nie do końca wykorzystanym elementem leczenia raka jelita grubego.

Pogłębienie badań mających na celu ocenę mechanizmów odporności przeciwnowotworowej u chorych po potencjalnie radykalnym leczeniu operacyjnym może pozwolić na określenie miejsca immunoterapii także w tych przypadkach.

Według literatury czynnikami prognostycznymi kliniczno - patologicznymi w raku jelita grubego są głębokość naciekania guza, przerzuty w węzłach chłonnych, niski stopień zróżnicowania, obecność depozytów nowotworowych (tumor deposits – TD), stan marginesu okrężnego (CRM), perforacja guza, naciekanie wzdłuż przestrzeni okołonерwowych (PN), nacieki naczyń krwionośnych/chłonnych, niestabilność mikrosatelitarna (MSI), stopień zróżnicowania nowotworu po leczeniu neoadiuwantowym, mutacja genu KRAS i BRAF, utrata heterozygotyczności w locus 18q oraz wyjściowe stężenie antygenu rakowo – płodowego (CEA). Nowym i obiecującym czynnikiem rokowniczym jest profil molekularny nowotworu. Parametry te nie są jednak wystarczające aby przewidzieć przebieg choroby u indywidualnego pacjenta.

Trwają badania nad znaczeniem krążących komórek nowotworowych (CTC), rozsiały komórek nowotworowych w szpiku (DTC), krążącego nowotworowego DNA, exosomów na przebieg wielu nowotworów. DTC to pojedyncze komórki nowotworowe, które rozsiały się do innych organów takich jak np. szpik kostny (BM). Z większości opublikowanych prac wynika, że obecność CTC we krwi obwodowej jest niezależnym czynnikiem pogarszającym całkowite przeżycie. Jednak nie można spodziewać się, że w stadium rozsiewu nowotworu obecność CTC lub DTC będzie wpływała na przebieg choroby.

Niniejsza praca przynosi analizę badań nad znaczeniem obecności tych komórek w przypadkach mniej zaawansowanych, poddanych leczeniu radykalnemu.

Kontakt komórek immunokompetentnych z komórkami nowotworowymi może mieć różne konsekwencje w zależności od kontekstu „środowiska immunologicznego ” w którym do niego dochodzi. Obserwowane w mikrośrodowisku guza nacieki komórek immunokompetentnych, w tym makrofagów i limfocytów nie zawsze przyczyniają się do supresji wzrostu nowotworu, a część z nich może wręcz przyspieszać jego wzrost.

Wśród makrofagów obecnych w sąsiedztwie guza i w samym guzie występuje dwukierunkowe różnicowanie zwane polaryzacją - powstają dwa typy tych komórek: aktywowane klasycznie M1 i aktywowane drogą alternatywną M2. Makrofagi M1 lokalizują się głównie na obrzeżach guza nowotworowego i wydzielają antyangiogenną IL-12, natomiast makrofagi M2 wnikają w tkankę nowotworu, często do ognisk martwicy i niedotlenienia i pozbawione są zdolności wydzielania IL-12 czy wolnych rodników tlenowych, za to potęgują odczyn zapalny wspomagając progresję guzów. Podobnie obecność w guzie i wokół limfocytów T- regulatorowych może powodować tolerancję komórek nowotworowych.

Inną sytuacją jest występowanie DTC w różnych przedziałach organizmu, gdzie nie istnieje typowe środowisko guza, a komórki nowotworowe kontaktują się z szeregiem komórek układu immunologicznego bez wpływu tego środowiska. Niewątpliwie najbardziej modelowym jest w tej sytuacji środowisko szpiku kostnego. W tym przedziale wystąpić może prezentacja antygenów nowotworowych niezakłócona wpływem środowiska guza.

Zachodzi zatem pytanie, czy ta hipotetyczna reakcja immunologiczna może mieć wpływ na przebieg choroby. Mogłoby to mieć znaczenie u chorych po operacji radykalnej, kiedy nawet słaba reakcja przeciwnowotworowa może wpłynąć na dalszy przebieg choroby.

Dlatego celowa jest ocena wpływu obecności DTC w szpiku kostnym na przeżycia odległe w tej grupie chorych.

Większość badań nad znaczeniem DTC w BM nie bierze pod uwagę lokalizacji nowotworu. Nowotwory jelita grubego zlokalizowane w jego prawej i lewej połowie mają różną biologię więc zjawiska immunologiczne tam zachodzące też mogą być różne.

U chorych na raka jelita grubego stwierdzano naturalne występowanie specyficznych limfocytów T cytotoksycznych dla epitopów antygenów nowotworowych. Jest to jednym z dowodów na reakcję immunologiczną organizmu wobec nowotworu. Te epitopy (determinanty antygeny) mogą być rozpoznawane przez limfocyty w kontekście antygenów HLA klasy I. Jednym z częstszych antygenów z tej grupy u rasy kaukaskiej jest antygen HLA-A2 (występuje u około 50% populacji tej rasy). Równocześnie znana jest liczna grupa antygenów nowotworowych rozpoznawanych w kontekście HLA-A2. Są to między innymi antygeny CSNK1A1, GAS7, HAUS3, SRPX, WDR46, ERBB2, AKAP13, MUC1. Występują one na

komórkach raka jelita grubego. Dlatego też, duża część badań nad szczepionkami nowotworowymi ograniczała się do populacji HLA-A2 dodatkowo. Zatem w kontekście naturalnej reakcji przeciwnowotworowej status HLA chorego może determinować jej rozwój. Do chwili obecnej dane dotyczące możliwego wpływu ekspresji antygenów HLA-A2 na przeżycie chorych na raka jelita grubego były skąpe a czasami sprzeczne. W przypadku innych nowotworów takich jak nowotwory głowy i szyji, rak piersi, jajnika, prostaty, krtani, niedrobnokomórkowy rak płuca czy czerniak na przestrzeni lat wyniki badań także nie były jednoznaczne [5,6,7,8,9,10,11,12]. Większość z tych badań oceniała wpływ zmniejszonej ekspresji lub całkowitej utraty antygenów HLA I klasy na komórkach nowotworu na rokowanie czyli zajmowała się jednym z mechanizmów ucieczki nowotworów spod kontroli układu odpornościowego. Z uwagi na istnienie tego zjawiska komórki nowotworu mogą różnić się pod tym względem od komórek somatycznych. Z drugiej strony komórki nowotworu nie wykazują nowych odmiennych od komórek gospodarza antygenów HLA klasy I. Dlatego odpowiedź na pytanie, czy ekspresja antygenów HLA-A2 na komórkach somatycznych lub nowotworowych ma wpływ na przeżycia odległe może dać pośrednią odpowiedź na temat znaczenia reakcji immunologicznej w raku jelita grubego.

Na przebieg i nasilenie swoistej reakcji immunologicznej wpływa szereg mechanizmów hamujących - są to indukcja limfocytów regulatorowych (Tregs), obecność molekuł immunosupresyjnych takich jak PD-1 (programmed death 1 receptor, receptor indukujący apoptozę) czy CTLA-4 (CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, antygen limfocytów cytotoksycznych typu 4) oraz zmniejszenie ekspresji antygenów HLA klasy I.

Limfocyty T-regulatorowe biorą udział w zjawisku immunotolerancji wobec auto- i alloantygenów. Zjawisko to jest jednym z mechanizmów ucieczki nowotworu spod kontroli układu odpornościowego. Limfocyty T-regulatorowe będące subpopulacją limfocytów CD4 hamują aktywność komórek efektorowych, ale także prezentację antygenów przez komórki dendrytyczne i komórki natural killer (przez wydzielanie immunosupresyjnych cytokin takich jak IL-10 i TGF $\beta$ , metabolitów takich jak adenozyne oraz interakcje międzykomórkowe). Aktualnie limfocyty te charakteryzuje się jako CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. W piśmiennictwie przeważają prace, w których obecność limfocytów T-regulatorowych oceniano w komórkach nacieku limfocytarnego guzów. Zwiększona obecność limfocytów T-regulatorowych w środowisku guza według większości autorów wpływała negatywnie na przebieg choroby – tak jak opisano to w

przypadku raka jajnika [13]] , raka piersi [14], żołądka [15] , czy trzustki [16] . W zależności od typu i lokalizacji nowotworu opisywano zarówno wzrost (u chorych z nowotworami trzustki i piersi) jak i spadek (u pacjentów z rakiem żołądka) poziomu limfocytów T regulatorowych we krwi obwodowej w stosunku do ich liczby u zdrowych osób z grup kontrolnych [17,18]. Niektóre dane wskazują, że w przebiegu nowotworów przewodu pokarmowego ich liczba we krwi obwodowej spada w porównaniu do osób zdrowych. Nie analizowano dotąd ewentualnego znaczenia rokowniczego tego zjawiska. Ponieważ skład nacieku okołoguzowego można ocenić dopiero po wycięciu chirurgicznym , poziom limfocytów Treg we krwi obwodowej mógłby być potencjalnym markerem dla powtarzalnego monitorowania nowotworu.

Przedstawione powyżej zjawiska wiążą się z zagadnieniem reakcji odpornościowej na obecność nowotworu, a poszerzenie wiedzy na ich temat może przyczynić się do rozwoju bardziej efektywnych form immunoterapii.

Rak jelita grubego nie jest jednorodną chorobą jeśli weźmiemy pod uwagę jego pierwotną lokalizację i są dowody, że nowotwory zlokalizowane w prawej i lewej połowie okrężnicy różnią się biologią i rokowaniem [19, 20, 21]. Dotychczas nowotwory zlokalizowane w lewej połowie okrężnicy i odbytnicy uważane były za mniej immunogenne. [22]. Charakteryzują się one zwykle ograniczoną liczbą mutacji DNA, stabilnością mikrosatelitarną (MSS) i niestabilnością chromosomalną (CIN). Za wysoce immunogenne uważa się natomiast nowotwory dominujące w prawej połowie okrężnicy (z wieloma mutacjami DNA, stabilnymi chromosomami (CS), niestabilnością mikrosatelitarną (MSI) i obecnością wielu limfocytów naciekających guza (TIL) [22]. Opublikowany w 2015 r przez CRCSC (Colorectal Subtyping Consortium) konsensus wyróżnia 4 podtypy molekularne raka jelita grubego: CMS1 (immunogeny, MSI-H), CMS2 (kanoniczny), CMS3 (metaboliczny), CMS4 (mezenchymalny). W odniesieniu do lokalizacji anatomicznej CMS1 dominuje w prawej części okrężnicy, CMS2 w lewej, a guzy CMS3 i CMS 4 nie mają określonej lokalizacji [23]. Klasyfikacja ta jest uważana za najsolidniejszą dostępną obecnie dla raka jelita grubego i stanowi podstawę przyszłego spersonalizowanego leczenia chorych w zależności od podtypu występującego nowotworu.

Nowotwory zlokalizowane w prawej części jelita grubego częściej występują u kobiet, są znacznie zaawansowane miejscowo (T3, T4) ale bez zajęcia węzłów chłonnych i przerzutów odległych, guzy są słabo zróżnicowane ( G2, G3), śluzowe, często towarzyszą im nacieki limfocytów T cytotoksycznych. Często występują jako

guzy synchronicznie i metachronicznie. Rokowanie jest korzystne po radykalnym leczeniu chirurgicznym, natomiast nowotwory nawrotowe rokują źle.

Rak jelita grubego zlokalizowany w lewej części jelita grubego z reguły jest wysokozróżnicowany, częściej daje przerzuty do węzłów chłonnych i narządów odległych, guzy rzadko są śluzowe, brak jest nacieków limfocytarnych w ich środowisku, ale lepiej rokują w przypadku nawrotów choroby.

Ograniczenie badania do chorych, u których guzy nowotworowe zlokalizowane były w lewej połowie okrężnicy i odbytnicy spowodowało, że populacja badana stała się bardziej jednorodna.

#### **4. Cele pracy**

W niniejszej pracy starano się pogłębić wiedzę na temat wybranych aspektów reakcji układu immunologicznego na nowotwór u chorych na raka lewej połowy jelita grubego.

W szczególności udało się uzyskać odpowiedzi na pytania:

1. Czy u chorych na raka lewej połowy jelita grubego poddanych radykalnemu leczeniu chirurgicznemu obecność rozsiaanych komórek nowotworowych w szpiku kostnym miała znaczenie rokownicze?
2. Czy w analogicznej grupie chorych ekspresja antygenu HLAA2 w komórkach gospodarza wpływała na rokowanie?
3. Czy liczba limfocytów T-regulatorowych we krwi obwodowej u chorych z rakiem lewej połowy jelita grubego była związana z zaawansowaniem choroby i rokowaniem?

#### **5. Materiał i metody**

Badanie ma charakter analizy retrospektywnej opartej o prospektywnie gromadzoną bazę danych. Do badań wykorzystano bazę danych stworzoną dla grantu „Badania nad znaczeniem klinicznym ekspresji genów HER 1/2, MAGE1/2 i MUC1 w komórkach guza i izolowanych komórkach nowotworowych w szpiku kostnym i krwi oraz zachowaniem się niektórych parametrów układu odpornościowego u chorych z rakiem jelita grubego”, nr grantu N N403 089735, nr zgody Komisji Bioetycznej KBET

86/B/2007, kierownik prof. dr hab. n. med. Antoni Czupryna, oraz „Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna mieloidalnych komórek regulatorowych w krwi obwodowej pacjentów z rakiem jelita grubego – implikacje dla immunoterapii nowotworów, nr zgody Komisji Bioetycznej KBET nr 122.6120.128.2015 z dnia 25 czerwca 2015 roku, kierownik prof. UJ, dr hab. n. med Jarosław Baran. Dane gromadzono w latach 2007-2012. Uzyskano zgodę głównych badaczy na wykorzystanie danych.

Wymieniona wyżej baza danych wykorzystanych w rozprawie doktorskiej stanowi unikalny materiał naukowy, gdyż oprócz danych klinicznych, oznaczeń laboratoryjnych i danych patomorfologicznych zawiera zweryfikowane przeżycia pięcioletnie i dłuższe chorych co w badaniach nad nowotworami ma znaczenie kluczowe.

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

Analizie poddano historie choroby z pobytu w szpitalu oraz kontrolnych wizyt ambulatoryjnych oraz wyniki badań histopatologicznych. Dane na temat przeżyć odległych uzyskano z rejestru MSWiA.

Ze względu na zmiany w systemach oceny zaawansowania TNM w okresie badania wszystkie badania histopatologiczne zostały ponownie ocenione zgodnie z 7. edycją TNM.

W celu uzyskania jednorodności grup do badania włączono pacjentów z lewostronną lokalizacją guza jelita grubego ponieważ ona przeważała wśród badanych chorych.

Przeprowadzono weryfikację przeżyć odległych.

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

Wszystkie dane zostały opracowane przy użyciu programu Statistica 13 w polskiej wersji. Szczegółowy opis metod statystycznych przedstawiono w artykułach stanowiących poszczególne części dysertacji.

## 6. Podsumowanie wyników i wnioski

### **Artykuł nr 1: „The impact of bone marrow disseminated tumor cells on survival and disease progression in left-sided colorectal cancer patients”.**

Praca pt „Wpływ rozsianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym na przeżycie i progresję choroby u chorych na raka jelita grubego zlokalizowanego w lewej połowie okrężnicy i w odbytnicy” przyniosła analizę potencjalnych czynników prognostycznych mogących mieć wpływ na ustalenia spersonalizowanego leczenia uzupełniającego u chorych z rakiem jelita grubego w jego lewostronnej lokalizacji – uważanej za korzystniejszą.

Rozproszone komórki nowotworowe (DTC) to podzbiór krążących komórek nowotworowych, które migrowały do szpiku kostnego. Rak jelita grubego jest heterogenną chorobą w zależności od lokalizacji guza pierwotnego.

Celem pierwszego badania była analiza związku między obecnością DTC w szpiku kostnym a charakterystyką guza nowotworowego oraz długoterminowymi wynikami leczenia chorych na raka jelita grubego zlokalizowanego w lewej połowie okrężnicy i odbytnicy

Przeprowadzono analizę danych dotyczących 91 pacjentów z rakiem jelita grubego zlokalizowanym w lewej połowie okrężnicy i odbytnicy (37 z rakiem okrężnicy i 54 z rakiem odbytnicy). Całkowite przeżycie i nawroty raka porównano u pacjentów z różnymi stadiami nowotworu i różnym statusem DCT. W badaniu DTC w szpiku kostnym zdiagnozowano u 42 pacjentów (46,1%). Występowanie DTC w szpiku kostnym nie było związane z głębokością naciekania guza, zajęciem węzłów chłonnych, odległymi przerzutami, stopniem złośliwości histopatologicznej ani lokalizacją pierwotnego guza. Całkowite 5-letnie przeżycie w grupie z obecnymi DTC wyniosło 59,5%, a u pacjentów bez DTC 53% ( $p = 0,190$ ). Widoczny był trend sprzyjający dłuższemu przeżyciu u pacjentów z DTC w szpiku kostnym, zarówno gdy analizowano pacjentów z chorobą w stadium II i III razem jak i osobno dla stadium II i III. Odległe przerzuty metachroniczne były statystycznie znamienne rzadsze u pacjentów z obecnością DCT w szpiku.

Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski: obecność DTC w szpiku kostnym nie jest związana z cechami charakteryzującymi guza

pierwotnego i wydaje się zmniejszać tendencję do tworzenia przerzutów w lewostronnym raku jelita grubego. U chorych poddanych leczeniu radykalnemu zaznacza się zaskakująca tendencja do dłuższego przeżycia całkowitego chorych z obecnością rozsianych komórek nowotworowych w szpiku w porównaniu z chorymi bez tych komórek.

Ponadto okazało się że DTC nie są ani negatywnymi czynnikami prognostycznymi ani negatywnymi czynnikami predykcyjnymi przerzutów odległych w badanej grupie.

Wyniki te wykraczają poza utarte schematy i wymagają dalszego potwierdzenia, ale wspierają tezę, że istnieją znaczne różnice między biologią nowotworów jelita w różnych lokalizacjach.

## **Artykuł nr 2: „ The prognostic significance of HLA-A2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers”.**

W pracy pt. „ Ocena znaczenia ekspresji HLA-A2 na komórkach somatycznych u chorych na raka jelita grubego zlokalizowanego w lewej połowie okrężnicy i w odbytnicy” uzyskano odpowiedź na pytanie czy ekspresja HLA-A2 bądź jej brak na komórkach somatycznych jest czynnikiem prognostycznym.

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

Celem tego badania była analiza związku między ekspresją HLA-A2 u pacjentów z lewostronnym rakiem jelita grubego w różnych stadiach choroby i długotrwałym przeżyciem oraz odpowiedź na pytanie, czy brak ekspresji HLA-A2 jest rzeczywiście negatywnym czynnikiem prognostycznym.

Do analizy włączono 58 pacjentów z lewostronnym rakiem jelita grubego. Ekspresję HLA-A2 określono na podstawie barwienia limfocytów z krwi pacjentów i analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Antygen HLA-A2 był obecny u 56% pacjentów z lewostronną lokalizacją raka okrężnicy i odbytnicy.



W grupie badanej pacjenci z ekspresją HLA-A2 żyli statystycznie znacznie dłużej niż pacjenci bez HLA-A2 ( $p = 0,027$ ). Nie było istotnej różnicy w ogólnym przeżyciu między grupami HLA-A2(+) i HLA-A2(-) z lewostronnym CRC w stopniu II i III. Jednak proporcjonalny model ryzyka Coxa wykazał, że brak ekspresji HLA-A2 był negatywnym czynnikiem prognostycznym w grupie pacjentów operowanych radykalnie bez odległych przerzutów.

Grupy pacjentów z obecnością lub brakiem ekspresji HLA-A2 miały podobną strukturę pod względem wieku, płci, stopnia zróżnicowania (G) i TNM.

Różnice zaobserwowano tylko jeśli chodzi o cechę T i lokalizację (lewa część okrężnicy, odbytnica). W grupie pacjentów z guzami T3 dominowali chorzy z obecnymi antygenami HLA-A2 natomiast w grupie pacjentów z guzami T4 większość była pozbawiona obecności tych antygenów limfocytarnych.

Wśród pacjentów z guzami odbytnicy dominował fenotyp HLA-A2 negatywny, podczas gdy wśród pacjentów z lewostronnymi guzami okrężnicy znacznie więcej pacjentów miało ekspresję HLA-A2.

W badaniu stwierdzono, że status HLA-A2 może wpływać na przebieg kliniczny pacjentów z rakiem okrężnicy i odbytnicy po lewej stronie, chociaż guzy lewostronne są mniej immunogenne niż guzy prawostronne.

Nie można wykluczyć, że istnieją antygeny prezentowane w kontekście HLA-A2, skutecznie indukujące przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną i w tym mechanizmie poprawiające przeżycie pacjentów HLA-A2 pozytywnych.

Aby lepiej zrozumieć interakcje między CRC a układem odpornościowym należy przeprowadzić jeszcze więcej badań.

### **Artykuł nr 3: „ T Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Lymphocytes in the Peripheral Blood of Left-Sided Colorectal Cancer Patients”**

W pracy pt „ Limfocyty T- regulatorowe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> we krwi obwodowej u chorych na raka jelita grubego zlokalizowanego w lewej połowie okrężnicy i w odbytnicy” starano się wyjaśnić, czy ilość limfocytów T - regulatorowych we krwi obwodowej przed leczeniem może wpływać na przebieg choroby.

Limfocyty T regulatorowe (Treg) są jedną z podgrup limfocytów T zaangażowanych w interakcję między nowotworem a układem odpornościowym gospodarza i mogą osłabiać przeciwnowotworową reakcję immunologiczną. Wykazano,

że poziom limfocytów Treg zwiększa się we krwi obwodowej pacjentów z różnymi nowotworami. Prognostyczne znaczenie limfocytów Treg w nowotworze jelita grubego pozostaje kontrowersyjne a rak jelita grubego jest chorobą heterogenną, z wieloma odmianami wynikającymi z pierwotnej lokalizacji guza.

Celem tego badania była analiza związku między ilością Treg we krwi obwodowej pacjentów z lewostronną lokalizacją raka jelita grubego w różnych stadiach choroby a przeżyciem odległym.

Analizie poddano 94 pacjentów z lewostronnym rakiem jelita grubego oraz grupę 21 zdrowych ochotników. Poziomy limfocytów Treg we krwi obwodowej analizowano za pomocą cytometrii przepływowej.

Badanie wykazało istotną statystycznie różnicę między ilością limfocytów Treg w I i II stopniu TNM ( $p = 0,047$ ). Bezwzględna liczba limfocytów Treg we krwi obwodowej pacjentów z lewostronnym rakiem jelita grubego była znacznie zmniejszona w porównaniu do zdrowych ochotników z grupy kontrolnej ( $p=0.008$ ), szczególnie widoczne było to u pacjentów z chorobą w stadium II + III w stosunku do grupy kontrolnej (odpowiednio  $p = 0,003$  i  $p = 0,018$ ).

Grupa pacjentów z guzami pT3 + pT4 również miała znacznie niższą liczbę Treg we krwi obwodowej niż grupa kontrolna ( $p = 0,005$ ).

U pacjentów w I stopniu zaawansowania nowotworu liczba limfocytów Treg była zbliżona do liczby limfocytów Treg w grupie kontrolnej (nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy)

W całej grupie badanej poziom limfocytów Treg we krwi obwodowej nie miał wpływu na przeżycie. Analiza podgrup pacjentów z różnymi stadiami nowotworu według TNM również nie wykazała różnicy w przeżyciu między pacjentami z „niską” i „wysoką” liczbą limfocytów Treg.

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

## 7. Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim

### Wprowadzenie

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Cel**

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

## **Metodyka**

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

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

## **Wyniki**

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

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

Różnica między ilością limfocytów Treg w I i II stopniu TNM była istotna statystycznie ( $p = 0,047$ ). Liczba limfocytów Treg w całej grupie badanej była znacznie niższa niż w grupie kontrolnej ( $p = 0,008$ ) i pomiędzy pacjentami w stadiach II i III a grupą kontrolną ( $p = 0,003$  i  $p = 0,018$ ). Grupa pacjentów pT3 + pT4 również miała znacznie niższą liczbę limfocytów Treg we krwi obwodowej niż grupa kontrolna ( $p = 0,005$ ). U pacjentów w I stopniu zaawansowania nowotworu liczba limfocytów Treg była zbliżona do liczby limfocytów Treg w grupie kontrolnej (nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy).

W całej grupie badanej poziom limfocytów Treg we krwi obwodowej nie miał wpływu na przeżycie. Analiza w podgrupach różnych stadiów TNM również nie wykazała różnicy w przeżyciu między pacjentami z „niską” i „wysoką” liczbą limfocytów Treg.

## **Wnioski**

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

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

Bezwzględna liczba limfocytów Treg we krwi obwodowej pacjentów z lewostronnym rakiem jelita grubego była znacznie zmniejszona w porównaniu do

zdrowych osób z grupy kontrolnej, szczególnie u pacjentów z chorobą w stadium II + III. Obecność limfocytów Treg we krwi obwodowej nie miała wpływu na przeżycie.

## **8. Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim**

### **Introduction**

Colorectal cancer (CRC) is the most common cancer of the gastrointestinal tract, the third cancer in incidence and second in cancer –related mortality in the world. Despite radical surgery and adjuvant treatment, 25-50% of patients with stage II and III disease relapse as a result of undetected tumor cell spread.

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

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

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

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

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

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

## **Aim**

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

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

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

## **Patients and methods**

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

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

## **Results**

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

In the study group 56% of patients were found to be HLA-A2 positive. Patients with HLA-A2 expression lived statistically longer than HLA-A2 negative patients ( $p=0.027$ ). There was no significant difference in overall survival

between the HLA-A+ and HLA-A2- groups with stage II and III left-sided CRC. However, the Cox proportional hazard model showed that the lack of HLA-A2 expression was a negative prognostic factor in the group of radically operated patients without distant metastases.

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

## **Conclusions**

The presence of DTC in the bone marrow is not associated with primary tumor characteristics and seems to diminish metastasis formation in left-sided colorectal cancer. There is also a trend for improved overall survival for DCT positive patients.. These results, however, require further confirmation in larger groups of patients.

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

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



## 9. Piśmiennictwo

1. Torino F, Bonmassar E, Bonmassar L, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer patients. *Cancer Treatment Reviews* 2013;39: 759-772  
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.12.007>
2. Overman MJ, McDermott R, Leach JL et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability- high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2017;18:1182–91.
3. Overman M.J, Lonardi S, Wong KYM et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair–Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer *J Clin Oncol* 2018;36: 773-779.  
[doi.org/10.1200/JCO.2017.76.9901](https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.9901)
4. Cohen R, Pellat A, Boussion H et al. Immunotherapy and metastatic colorectal cancers with microsatellite instability or mismatch repair deficiency. *Bull Cancer* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.09.004>
5. Ferris RL, Hunt JL, Ferrone S Human leukocyte antigen (HLA) class I defects in head and neck cancer: molecular mechanisms and clinical significance. *Immunol Res* 2005; 33(2): 113–133.
6. Madjd Z, Spendlove I, Pinder SE et al. Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int J Cancer* 2005; 117(2): 248–255.
7. Vitale M, Pelusi G, Taroni B et al. HLA class I antigen down-regulation in primary ovary carcinoma lesions: association with disease stage. *Clin Cancer Res* 2005;11(1): 67–72.
8. Gamzatova Z, Villabona L, Dahlgren L et al. Human leucocyte antigen (HLA) A2 as a negative clinical prognostic factor in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006 ;103(1):145-50. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.02.004.
9. De Petris L, Bergfeldt K, Hising C et all. Correlation between HLA-A2 gene frequency, latitude, ovarian and prostate cancer mortality rates. *Med Oncol.* 2004;21(1):49-52. doi: 10.1385/MO:21:1:49.
10. Ogino T, Shigyo H, Ishii H et al. HLA class I antigen downregulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res* 2006; 66(18): 9281–9289.

11. Mezquita L, Charrier M, Faivre L et al. Prognostic value of HLA-A2 status in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2017 ;112:10-15. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.07.004.
12. Pandolfi F, Boyle LA, Trentin L et al. Expression of HLA-A2 Antigen in Human Melanoma Cell Lines and its Role in T-Cell Recognition *Cancer Res* 1991; 51: 3164-3170.
13. Curiel, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest*, 2007, 117(5), 1167–1174. doi:10.1172/JCI31202.
14. Zhou, Y.; Shao, N.; Aierken, N. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in patients with breast cancer: a meta-analysis. *J Cancer*. 2017,8(19),4098-4105. doi:10.7150/jca.21030.
15. Shen, Z.; Zhou, S.; Wang, Y.; Li, R.L.; Zhong, C.; Liang, C.; Sun, Y. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010,136(10),1585-95. doi: 10.1007/s00432-010-0816-9
16. Gabitass, R.F.; Annels, N.E.; Stocken, D.D. et al. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother*. 2011,60(10),1419-30. doi: 10.1007/s00262-011-1028-0.
17. Liyanage, U.K.; Moore, T.T.; Joo, H.-G. et al. Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *J Immunol* 2002, 169 (5), 2756-2761. doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2756.
18. Szczepanik, A.M.; Siedlar, M; Sierżęga, M. et al. T-regulatory lymphocytes in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2011, 17(3),343-348 doi:10.3748/wjg.v17.i3.343.
19. Benedix F, Kube R, Meyer F. et al. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: Differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis. Colon Rectum*. 2010; 53: 57–64. doi:10.1007/DCR.0b013e3181c703a4.
20. Derwinger, K.; Gustavsson, B. Variations in Demography and Prognosis by Colon Cancer Location. *Anticancer Res* 2011,31,2347-2350.

21. Shen H, Yang J, Huang Q. et al. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. *World J. Gastroenterol.* 2015; 21: 6470–6478. doi:10.3748/wjg.v21.i21.6470.
22. de Vries NL, Swets M, Vahrmeijer AL et al. The Immunogenicity of Colorectal Cancer in Relation to Tumor Development and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 1030. doi:10.3390/ijms17071030.
23. Guinney J, Dienstmann R, Wang X et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 ;21(11):1350-6. doi: 10.1038/nm.3967.

## **10. Artykuły stanowiące monotematyczny cykl publikacji**

**The impact of bone marrow disseminated tumor cells on survival and disease progression in left-sided colorectal cancer patients.** Pach, R.; Dyląg-Trojanowska, K.; Baran, J.; Czupryna A.; Siedlar, M.; Zybaczyńska, J.; Brandt PH.; Szczepanik AM. *Pol Arch Intern Med.* 2020 Feb 20. [Epub ahead of print]  
DOI: 10.20452/pamw.15200

# Impact of disseminated tumor cells in the bone marrow on survival and disease progression in patients with left-sided colorectal cancer

Radosław Pach<sup>1</sup>, Katarzyna Dyląg-Trojanowska<sup>2</sup>, Jarosław Baran<sup>3</sup>, Antoni Czupryna<sup>1</sup>, Maciej Siedlar<sup>3</sup>, Justyna Zybaczyńska<sup>4</sup>, Philip H. Brandt<sup>5</sup>, Antoni M. Szczepanik<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 1st Department of General, Oncological and Gastroenterological Surgery, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

<sup>2</sup> Department of General and Oncological Surgery, John Gawił Hospital, Sucha Beskidzka, Poland

<sup>3</sup> Department of Clinical Immunology, Institute of Pediatrics, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

<sup>4</sup> Penn State Health Milton S. Eisenhower Medical Center, Hershey, Pennsylvania, United States

<sup>5</sup> Baystate Medical Center, Springfield, Massachusetts, United States

## KEY WORDS

circulating tumor cells, distant metastases, left-sided colon cancer, overall survival, prognostic biomarker

## EDITORIAL

by Wysocki WM, see p. 371

## ABSTRACT

**INTRODUCTION** Disseminated tumor cells (DTCs) are a subset of circulating tumor cells that migrate to the bone marrow. Colorectal cancer is a heterogeneous disease depending on the site of the primary tumor.

**OBJECTIVES** We aimed to assess the association between the presence of DTCs in the bone marrow and tumor characteristics as well as long-term treatment outcomes in patients with left-sided colorectal cancer.

**PATIENTS AND METHODS** This prospective study included 91 patients with left-sided colorectal cancer (37 with colon cancer and 54 with rectal cancer) treated between 2007 and 2012 in a single tertiary center. Fifteen patients had stage I cancer; 26, stage II; 26, stage III; and 24, stage IV. Overall survival and cancer relapse rates were compared between patients with different cancer stages and DTC status.

**RESULTS** Bone marrow DTCs were identified in 42 patients (46.1%). The prevalence of DTCs was not related to tumor infiltration depth, nodal involvement, distant metastasis, tumor stage, or primary tumor site. The 5-year overall survival rates were 59.5% and 53% in the DTC-positive and DTC-negative groups, respectively ( $P = 0.19$ ). There was a notable trend favoring survival in patients with DTCs with stage II and III disease (both separately and when combined). The number of metachronous distant metastases was significantly lower in DTC-positive patients.

**CONCLUSIONS** The presence of DTCs in the bone marrow is not associated with primary tumor characteristics and seems to reduce metastasis formation in left-sided colorectal cancer. There is also a trend for improved overall survival in DTC-positive patients. These results are intriguing and warrant further confirmation.

## Correspondence to:

Antoni Szczepanik, MD, PhD,  
1st Department of General,  
Oncological and Gastroenterological  
Surgery, Jagiellonian University  
Medical College, ul. Jakubowskię 2,  
30-688 Kraków, Poland,  
phone: +48 12 400 24 00,  
email: antoni.szczepanik@uj.edu.pl  
Received: January 10, 2020.  
Revision accepted: February 12, 2020.  
Published online: February 20, 2020.  
Pol Arch Intern Med. 2020;  
130 (5): 382-389  
doi:10.20462/pamw.15200  
Copyright by the Author(s), 2020

**INTRODUCTION** The significance of disseminated tumor cells (DTCs) in the bone marrow of patients with colorectal cancer is unclear. The presence of DTCs in the bone marrow is identified in 17% to 64% of this population (median, 29%).<sup>1</sup> These cells are a subset of circulating tumor cells that migrate to the bone marrow and can form micrometastases. This phenomenon is mostly described in patients with breast cancer. Although DTCs in the bone marrow are present in a substantial percentage of cancer patients without distant or nodal metastases, most of them will not

develop distant metastases. Additionally, cancer cells in the bone marrow may be dormant for several years before re-entering the circulation; however, such situations are very uncommon in colorectal cancer. Two meta-analyses of studies on the prognostic significance of circulating cancer cells in colorectal cancer indicated that the presence of DTCs in the peripheral blood is a negative prognostic factor.<sup>2,3</sup>

At present, there is insufficient evidence to confirm that the presence of DTCs in the bone marrow of patients with colorectal cancer affects

## WHAT'S NEW?

Our study showed a significantly lower number of metachronous distant metastases in patients with left-sided colorectal carcinoma and disseminated tumor cells (DTCs) in the bone marrow than in those without DTCs. The presence of DTCs in the bone marrow was not a negative predictive factor of distant metastases or a negative prognostic factor in our study group. This supports the concept that there are substantial differences between the characteristics of colorectal cancer depending on affected sites. This issue should be addressed in future studies in order to develop a tailored approach for patients with this malignancy.

the prognosis.<sup>4,7</sup> Such studies, especially those on nondisseminated colorectal cancer, require a large number of patients and a long follow-up, because the median survival in patients with colorectal cancer undergoing radical surgery is longer than 5 years. In addition, colorectal cancer is a heterogeneous disease depending on the site affected by the primary tumor. What follows, right- and left-sided cancers may differ in terms of biological characteristics and prognosis.<sup>8-11</sup> Therefore, in this study, we focused on malignancies arising from the left colon and rectum, with an emphasis on locally advanced cancer. In particular, we aimed to assess the relationship between the presence of DTCs in the bone marrow and tumor characteristics, cancer progression, and survival in patients with left-sided colorectal cancer.

**PATIENTS AND METHODS** The study included 91 patients with colorectal cancer treated at a single institution between 2007 and 2012. Only patients with tumors located in the rectum or left colon were included. The term "left colon" was defined as a section of the colon distal to the left one-third of the transverse colon. The inclusion criteria were age over 18, histologically confirmed cancer, and elective surgical procedure. Patients with synchronous right-sided colon cancer or those with a history of other neoplastic diseases were excluded. None of the patients with colon cancer received preoperative chemotherapy, while 5 patients with rectal cancer received preoperative radiotherapy and 2—preoperative chemoradiotherapy. The group included 42 women and 49 men (mean [SD] age, 64.7 [10.2] years). The distribution of cancer stage according to the TNM classification was as follows: T1, 2 patients; T2, 16; T3, 60; T4, 13; N0, 42; N1, 20; N2, 25; Nx, 4; M0, 67; and M1, 24. The clinical and pathological characteristics of patients are summarized in **TABLE 1**.

A bone marrow biopsy of the posterior superior iliac spine was performed on the day of surgery after the induction of general anesthesia. A 5-ml sample of the bone marrow was collected into plastic EDTA tubes.

Pelleted cells from bone marrow samples were incubated with an excessive amount of lysing solution (BD Biosciences, San Jose, California, United States) for 10 minutes, repeated 3 to 4 times to remove erythrocytes. The remaining cells were

washed in phosphate-buffered saline (PBS) and adjusted to the concentration of  $1 \times 10^7$  cells  $\text{ml}^{-1}$  in PBS. Subsequently, the cells were stained with monoclonal mouse antihuman CD45 (phycoerythrin-labeled) antibodies (DAKO, Glostrup, Denmark) and sorted into CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> populations using flow cytometry (FACS Vantage SE, BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, United States) equipped with the TurboSort option (BD Biosciences) and Aerosol Protection System (Flexoduct International ApS, Greve, Denmark). The Innova Enterprise II ion laser (Coherent, Santa Clara, California, United States) operating at 488 nm was used as a light source. Sorting was performed using a 70- $\mu\text{m}$  nozzle tip with a drop drive frequency of 65 kHz, 1.5-drop envelopes and a "normal" sorting mode. Sorted CD45<sup>-</sup> cells were collected into polystyrene Falcon 2057 tubes (BD Biosciences) precoated with fetal calf serum and maintained in a refrigerated bath recirculator (Neslab Instruments, Portsmouth, New Hampshire, United States). About  $1 \times 10^6$  of CD45<sup>-</sup> cells ( $1 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) were used to prepare slides. The slides were dried, fixed with a mixture of ethanol and acetone (1:1 v/v<sup>3</sup>), and then stained for 30 minutes with A45-B/B3 monoclonal antibodies ( $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Micromet GmbH, Munich, Germany), which recognize common epitopes of cytokeratins (CKs) including CK8, CK18, and CK19. Subsequently, the slides were washed and stained for 30 minutes with goat anti-mouse IgG-FITC-labeled antibodies (DAKO). After washing with PBS, the slides were assayed within 2 days. The CK<sup>+</sup> cells were identified by 2 independent investigators under a BX60 fluorescent microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and documented with a DP10 camera (Olympus). At least 300 cells were examined per slide. The samples were regarded as positive when at least 3 CK<sup>+</sup> cells were found per slide. Accordingly, patients were classified into CK<sup>+</sup> and CK<sup>-</sup> groups. All CK<sup>+</sup> cells were cytologically malignant cells as seen under the microscope. We could not distinguish between different CKs. However, the antibody (A45-B/B3) was commonly used in research on DTCs in the bone marrow, so the comparison with other studies is possible. The cytokeratins CK8, CK18, and CK19 are the epitopes of normal colonic mucosa, colonic adenoma, and adenocarcinoma. Therefore, the staining of the tumor for these epitopes is not routinely used and was not performed in our patients.

The surgical procedures were carried out according to oncology guidelines. Due to the changes in the TNM staging system during the study period, all the specimens were re-staged according to the seventh edition. The clinical and pathological data were recorded. Patients received postoperative chemotherapy if indicated, regardless of their DTC status. All patients were followed for at least 5 years or until death, and the dates of death were verified with the census registry office.

All patients provided written informed consent to participate in the study. The study was

**TABLE 1** Clinical and pathological characteristics of study patients

Parameter	Patients, n (%)
<b>Tumor location</b>	
Left colon	37 (41)
Rectum	54 (59)
<b>Primary tumor</b>	
T1	2 (2)
T2	16 (18)
T3	60 (66)
T4	13 (14)
<b>Lymph nodes</b>	
N0	42 (46)
N1	20 (22)
N2	26 (27.6)
Nx	4 (4.5)
<b>Metastases</b>	
M0	67 (73.6)
M1	24 (26.4)
<b>UICC/AJCC stage</b>	
I	15 (16.4)
II	26 (28.6)
III	26 (28.6)
IV	24 (26.4)
<b>Grade</b>	
1	26 (28.66)
2	45 (49.45)
3	13 (14.3)
Not assessed	7 (7.7)
<b>Resection margins</b>	
R0	63 (69.2)
R1	5 (5.5)
R2	23 (26.3)

Abbreviations: AJCC, American Joint Committee on Cancer; UICC, Union for International Cancer Control

approved by the Jagiellonian University Ethical Committee (KBET no. 86/B/2007 and KBET no. 122.6120.128.2015) and was registered at ClinicalTrials.gov (registration number, NCT03640572).

**Statistical analysis** The statistical analysis was conducted using the Statistica 13 software (Dell, Inc., Tulsa, Oklahoma, United States). The distribution of variables was checked using the Kolmogorov–Smirnov test. Categorical variables were compared with the  $\chi^2$  test with Yates correction. Survival analysis was performed according to the Kaplan–Meier method and log-rank test. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

**RESULTS** In our study, CK+ cells were identified in the bone marrow of 42 patients (46.1%): 16 patients with left-colon cancer (43.2%) and 26 with rectal cancer (48.1%), without a significant difference (TABLE 2). The prevalence of DTCs was not related to the depth of infiltration (T feature)

and was similar in patients with T1-2 and T4 cancer. There was no significant difference between the prevalence of DTCs in patients with and without distant metastasis. These patients also showed similar rates of DTC detection in the bone marrow. The prevalence of DTCs in the bone marrow of patients with TNM stages I–IV was similar, with a slightly lower prevalence in patients with stage IV cancer. The presence of DTCs in the bone marrow was not related to either the tumor grade or radicality of resection.

The number of patients who received preoperative treatment was low. Nonetheless, 5 patients with rectal cancer received preoperative radiotherapy, and 3 of them had DTCs in the bone marrow. Moreover, 2 patients with rectal cancer received preoperative chemoradiotherapy, and 5 weeks after treatment completion, both of them were found to harbor DTCs in their bone marrow.

All patients were followed for at least 5 years. The 5-year survival rate for DTC-positive patients was 59.5%, while for DTC-negative ones, it was 53%. The difference between groups was not significant (FIGURE 1). As DTC could theoretically lead to distant metastasis and cancer progression, a further analysis of patients with stage II and III disease was performed. Stage IV patients were excluded, because they already had disseminated disease, while stage I patients were excluded due to a very low probability of tumor progression. In the group of patients with stages II and III, the 5-year survival rates were 59.2% and 76% for DTC-negative and DTC-positive patients, respectively (FIGURE 2A). Even though the difference was almost 17% in favor of DTC-positive patients, it was not significant. The number of patients in stages II and III in the DTC-negative group was 14 and 13, respectively, and in the DTC-positive group, 12 and 13, respectively. The mean age of DTC-negative patients was 63 years, while in the DTC-positive group, it was 65.3 years. A trend towards better survival in DTC-positive patients was also observed when we analyzed patients with stages II and III cancer separately; however, the number of patients was too small to obtain significant results (FIGURE 2B and 2C).

Disease recurrence was assessed in stages II and III. Metastatic disease was diagnosed in 13 patients (25%). The sites of metastasis differed, with the prevalence of liver metastasis (7 of the 13 patients). In the DTC-negative group, 10 cases of metastasis were observed, while in the DTC-positive group, only 3 cases (*P* = 0.038).

**DISCUSSION** This study was started in 2007 and we decided to use methodology already established for gastric cancer in patients with colorectal cancer.<sup>12</sup> The preliminary results were not published earlier, as such a study requires long-term follow-up. As of now, all participants have been followed for at least 5 years. Our population was more homogenous than those in other studies, because we recruited only patients with left-sided colon and rectal cancer. Most

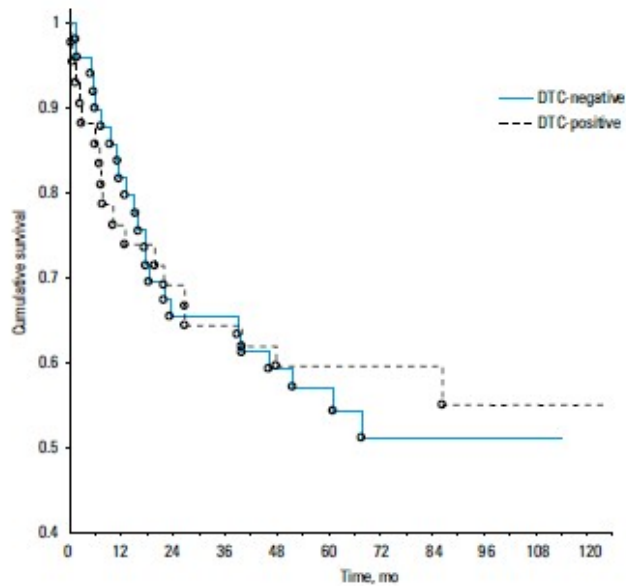
**TABLE 2** Patients with cytokeratin-positive cells identified in the bone marrow

Parameter	Left colon (16/37)	Rectum (26/64)	Both sites (42/91)
<b>Tumor</b>			
T1–T2	0/3	10/16 (66.6)	10/18 (55)
T3	13/29 (44.8)	12/31 (38.7)	25/60 (41.7)
T4	3/6 (50)	4/8 (50)	7/13 (53.8)
<b>Lymph nodes</b>			
N–	5/16 (33.3)	14/27 (51.9)	19/42 (45.2)
N+	10/21 (47.6)	9/24 (37.5)	19/45 (42.2)
Nx	1/1 (100)	3/3 (100)	4/4 (100)
<b>Metastases</b>			
M0	11/28 (39.2)	21/39 (53.8)	32/67 (47.7)
M1	5/9 (55.6)	5/16 (33.3)	10/24 (41.6)
<b>Grade</b>			
G1–G2	12/29 (41.3)	21/42 (50)	33/71 (46.5)
G3	3/6 (50)	0/7	3/13 (23)
Not assessed	1/2 (50)	5/6 (100)	6/7 (85.7)
<b>UICC/AJCC stage</b>			
I	0/3	7/12 (58.3)	7/16 (45.6)
II	5/12 (41.7)	7/14 (50)	12/26 (46.2)
III	6/13 (46.2)	7/13 (53.8)	13/26 (50)
IV	5/9 (55.6)	5/16 (33.3)	10/24 (41.6)
<b>Resection margins</b>			
R0	10/28 (36.7)	20/36 (57.1)	30/63 (47.6)
R1	1/1 (100)	0/4	1/5 (20)
R2	5/8 (62.5)	5/16 (40)	11/23 (47.8)

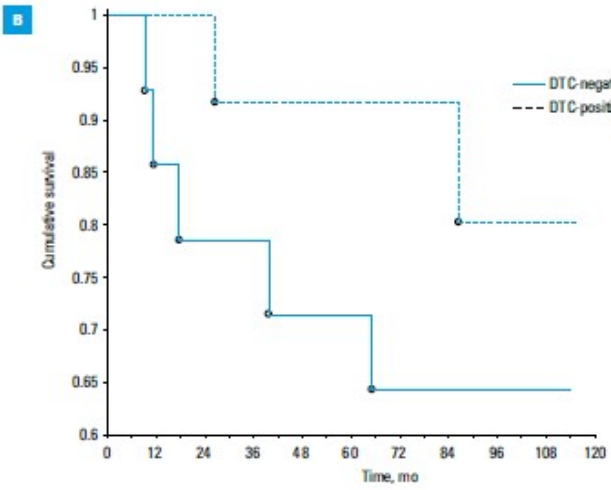
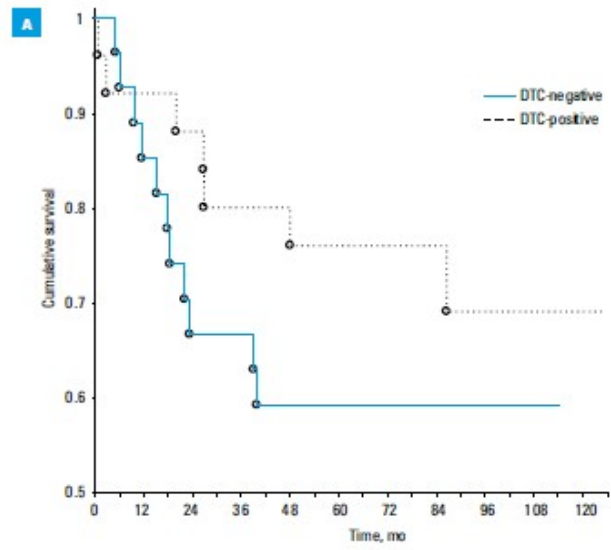
Data are presented as the number of disseminated tumor cell–positive patients/the total number of patients with cancer of particular stage, grade, or resection margins (percentage).

Abbreviations: see TABLE 1

**FIGURE 1** Cumulative survival in disseminated tumor cell (DTC)–positive and DTC–negative groups: all tumor stages

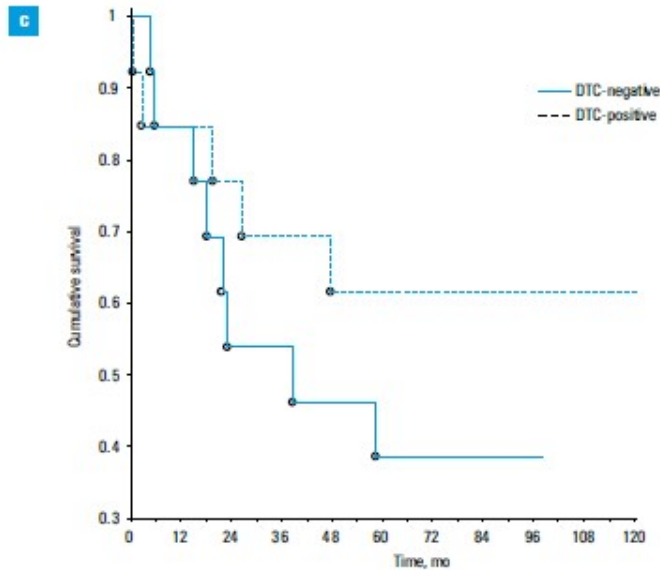


**FIGURE 2** Cumulative survival in patients with stage II and III cancer (A) and stage II cancer (B) in disseminated tumor cell (DTC)-positive and DTC-negative groups





**FIGURE 2** Cumulative survival in patients with stage III cancer (C) in disseminated tumor cell (DTC)-positive and DTC-negative groups



studies included patients with both left- and right-sided colorectal cancer or only those with rectal cancer. Right-sided colon cancer has different clinical and molecular characteristics than left-sided colon and rectal cancer; therefore, it should be analyzed separately in clinical and scientific studies.<sup>13</sup>

In our study, DTCs in the bone marrow were diagnosed in 46.1% of patients. Other studies reported an incidence between 10% and 63.6% of cases,<sup>7,14</sup> although the majority of studies reported a range between 25% and 40%. With the high number of epitopes of the tumor cells used and different methods of detection (immunocytochemistry, immunomagnetic assay, or reverse-transcription polymerase chain reaction), there is no standard method for identifying DTCs in the bone marrow.<sup>15</sup> The rate of detection differs depending on the technique used, even within a single study.<sup>16,17</sup> The method that we used in this study is based on fluorescence-activated cell sorting and the detection of cells expressing the common epitope of CK8, CK18, and CK19 within the sorted population. Therefore, this approach may be more sensitive than other simpler methods, because the cell population is enriched with the initial sorting.

In our study, the incidence of DTCs in the bone marrow was not related to the depth of tumor infiltration, nodal involvement, or distant metastasis. A similar finding was described in a German study of patients with colon cancer.<sup>18</sup> However, in that study, over 40% of patients had tumors in the right-sided colon. Our results were corroborated also by other studies in diverse groups of patients with colorectal cancer,<sup>4,7</sup> while some other

investigations provided contradictory results.<sup>18,19</sup> There is also a common opinion that the tumor grade does not influence the rate of DTCs in the bone marrow.<sup>4,18</sup>

We observed no difference in the prevalence of DTCs between patients with left colon and those with rectal cancer. This is in line with other studies.<sup>4,20</sup> For patients with colon cancer, neoadjuvant therapy is the exception and not the standard treatment, but patients with rectal cancer may receive preoperative radiotherapy or chemoradiotherapy according to indications. In our study, only 7 patients with rectal cancer underwent preoperative treatment. While this number is low, this method was not used routinely in the initial study period. It was not expected that the short-course radiotherapy would affect DTCs; however, 5 weeks of chemoradiotherapy could potentially eradicate such cells. The study on DTCs in rectal cancer showed that they are identified less frequently in patients who responded to preoperative chemoradiotherapy.<sup>21</sup> Moreover, in a study on gastric cancer, chemotherapy was reported to significantly reduce the prevalence of DTCs in the bone marrow.<sup>22</sup> We observed only 2 patients who received preoperative chemoradiotherapy. After this therapy, both of them were DTC positive. Although this observation has no statistical power, it shows that the preoperative treatment did not bias the results in patients with rectal cancer.

The overall survival at 5 years was similar between the DTC-positive and DTC-negative groups. Both groups also had comparable cancer stages according to the TNM classification. This finding alone is not surprising, as previous

studies demonstrated that the presence of DTCs in the bone marrow may not be a negative prognostic factor in patients with colorectal cancer. This is also in line with conclusions from a meta-analysis published in 2010.<sup>23</sup> However, the authors emphasized that the methods of DTC detection were inhomogenous. Therefore, new studies with new populations of patients diagnosed using a specific method are still needed. For further analysis in our study, we excluded patients with the most advanced disease stage, namely, stage IV. The prognostic significance of bone marrow DTCs was described in stage IV colorectal cancer, but only in patients after a curative resection of liver metastasis.<sup>24</sup> On the other hand, other investigators demonstrated that this phenomenon may be related to the method of detection.<sup>17</sup> We were unable to identify a study that would show the prognostic significance of DTCs in patients with stage IV colorectal cancer who did not undergo a radical resection of metastasis. In our study, only 1 patient with stage IV cancer had a simultaneous liver resection for metastasis. Also, stage I patients were excluded due to a very low probability of cancer progression with definitive treatment. Other studies, especially those with small sample sizes, included stage I patients,<sup>5</sup> but larger studies investigated mainly those with stage II and III disease.<sup>4</sup> When patients with stages II and III were analyzed together, the 5-year survival rate in our study was similar between patients with and without DTCs. These results are in contrast to a recent publication from Switzerland, where bone marrow cells were identified with the same type of pan-CK antibody, with a detection rate similar to that in our study, in patients with stages I–III. The authors found that the presence of DTCs in the bone marrow was a negative prognostic factor for survival.<sup>25</sup> However, in contrast to our study, they excluded patients with rectal cancer and only about 40% of patients had left-sided cancer. Moreover, their findings were not corroborated by some other studies.<sup>7,26</sup>

In our study, the survival plots showed a trend favoring patients with DTCs in the bone marrow, but the results were not significant. Therefore, we attempted to assess the incidence of distant metastasis during the 5-year follow-up. Theoretically, tumor cells located in the bone marrow could be the source of distant metastasis. What follows is that there should be a correlation between DTCs and metachronous metastasis. Such associations have been observed in breast,<sup>26</sup> prostate,<sup>27</sup> and esophageal cancer.<sup>28</sup> Surprisingly, in our study, there was a significantly lower number of metachronous distant metastases in patients with DTCs than in those without. The reason for this finding may be the low number of patients; however, this number is not significantly lower than in the majority of similar studies of patients with the same TNM stages. This observation may indicate that the presence of DTCs might have prevented the progression and metastasis formation. There are hypotheses explaining why DTCs

do not influence cancer progression,<sup>29</sup> but they do not focus on the beneficial effect of this phenomenon. Bone marrow is a specific site with a number of hematopoietic and immunocompetent cells and also stem cells. DTCs are present during the generation and maturation of various immunocompetent cells. It was demonstrated that the generation of monocytes from hematopoietic CD34<sup>+</sup> stem cells from the bone marrow of patients with colon cancer is possible, and these cells act as antigen-presenting cells. They may present tumor-specific antigens to cytotoxic T lymphocytes.<sup>30</sup> Moreover, it was shown that after *in vivo* exposure to blood-derived cell- and tumor-associated antigens, bone marrow dendritic cells were capable of inducing systemic protective T cell-mediated antitumor immunity upon adoptive transfer.<sup>31</sup> In contrast to the bone marrow, responses of lymph nodes to blood-circulating antigen were only weak. There is evidence that bone marrow-derived dendritic cells differ from peripheral blood-derived dendritic cells, but the significance of this difference is unclear.<sup>32</sup>

Bone marrow also seems to be a preferential site for migration and/or selective retention of memory T cells and becomes enriched with antigen-specific memory T lymphocytes in response to viral infection or tumor development.<sup>33,34</sup> This mechanism may underlie the finding observed in our study. Surrounded by immune cells, DTCs may be the source of tumor-related antigens and generate an immune reaction against these antigens. Therefore, DTCs may act as a kind of cancer vaccination.

Previous studies have shown that blood circulating breast cancer cells may settle in the bone marrow and spleen. At these sites, antigen-presenting cells may pick up, process, and cross-present tumor-associated antigens to prime naive T lymphocytes. This may lead to generation and maturation of specific effector and also memory T cells. Particular clones of so activated cytotoxic T lymphocytes, upon contact with tumor cells, may exhibit cytotoxic activity or even control dormant cancer foci.<sup>35</sup> It was also proposed that small amounts of persisting tumor-associated antigens produced by dormant tumor cells from the bone marrow may contribute to the maintenance of tumor-specific and long-term memory mediated by appropriate subsets of memory T lymphocytes.<sup>36</sup>

The presence of DTCs in the bone marrow is not associated with primary tumor characteristics and seems to reduce metastasis formation in left-sided colorectal cancer. There is a trend for improved overall survival in DTC-positive patients.

#### ARTICLE INFORMATION

**ACKNOWLEDGMENTS** This work was supported by the State Committee of Scientific Research (grant no., N N403 089735, to AC) and as statutory work at Jagiellonian University (project no., KZDS/007695, to JB).

**CONTRIBUTION STATEMENT** RE, KD-T, and AMS wrote the manuscript and prepared the tables and figures. RE, KD-T, AMS, MS, JB, and AC critically reviewed the initial version of the manuscript and participated in preparing the final version. JB, MS, and AC supervised the whole study and bone

marrow laboratory workup. RR, KD-T, JZ, PHS, and AMS were responsible for data acquisition and statistical analysis. PHS was responsible for language corrections as a native speaker. AC and JS were responsible for obtaining financial support. All authors reviewed the manuscript and approved the final version.

**CONFLICT OF INTEREST** None declared.

**OPEN ACCESS** This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License (CC BY-NC-SA 4.0), allowing third parties to copy and redistribute the material in any medium or format and to remix, transform, and build upon the material, provided the original work is properly cited, distributed under the same license, and used for noncommercial purposes only. For commercial use, please contact the journal office at [pernw@mp.pl](mailto:pernw@mp.pl).

**HOW TO CITE** Pech R, Dyląg-Trójcańska K, Baran J, et al. Impact of disseminated tumor cells in the bone marrow on survival and disease progression in patients with left-sided colorectal cancer. *Pol Arch Intern Med.* 2020; 130: 382-389. doi:10.20452/pamw.15200

## REFERENCES

- 1 Akagi Y, Kinugasa T, Adachi Y, Shirouzu K. Prognostic significance of isolated tumor cells in patients with colorectal cancer in recent 10-year studies. *Mol Clin Oncol.* 2013; 1: 582-592. [\[CrossRef\]](#)
- 2 Yang C, Zou K, Zhang L, Xiong B. Prognostic and clinicopathological significance of circulating tumor cells detected by RT-PCR in non-metastatic colorectal cancer: a meta-analysis and systematic review. *BMC Cancer.* 2017; 17: 725. [\[CrossRef\]](#)
- 3 Groot Koerkamp B, Rahbari NN, Schlier MW, et al. Circulating tumor cells and prognosis of patients with resectable colorectal liver metastases or widespread metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2013; 20: 2156-2165. [\[CrossRef\]](#)
- 4 Flatmark K, Borgen E, Nesland JM, et al. Disseminated tumor cells as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2011; 104: 1434-1439. [\[CrossRef\]](#)
- 5 O'Connor DJ, Cahill RA, Kirwan WD, Redmond HP. The impact of bone marrow micrometastases on metastatic disease-free survival in patients with colorectal carcinoma. *Colorectal Dis.* 2005; 7: 406-409. [\[CrossRef\]](#)
- 6 Koch M, Kienle P, Kastner D, et al. Prognostic impact of hematogenous tumor cell dissemination in patients with stage II colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2006; 118: 3072-3077. [\[CrossRef\]](#)
- 7 Steinhilber R, Hentschick M, Vieth M, et al. Influence of subclinical tumor spreading on survival after curative surgery for colorectal cancer. *Arch Surg.* 2008; 143: 122-128. [\[CrossRef\]](#)
- 8 Lim DR, Kuk JK, Kim T, Shin EJ. Comparison of oncological outcomes of right-sided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection: Which side is better outcome? *Medicine.* 2017; 96: 42. [\[CrossRef\]](#)
- 9 Benedix F, Kube R, Meyer E, et al. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum.* 2010; 53: 57-64. [\[CrossRef\]](#)
- 10 Darwinger K, Gustavsson B. Variations in demography and prognosis by colon cancer location. *Anticancer Res.* 2011; 31: 2347-2350.
- 11 Shan H, Yang J, Huang Q, et al. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. *World J Gastroenterol.* 2015; 21: 6470-6478. [\[CrossRef\]](#)
- 12 Płacz-Noworolska A, Drelak G, Szatanek R, et al. Immunophenotype of isolated tumor cells in the blood, bone marrow and lymph nodes of patients with gastric cancer. *Pol J Pathol.* 2007; 58: 93-97.
- 13 Yang SY, Cho MS, Kim NK. Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2016; 16: 351-358. [\[CrossRef\]](#)
- 14 Werthner K, Normark M, Brunner N, Nielsen HJ. Cytokeratin-positive cells in preoperative peripheral blood and bone marrow aspirates of patients with colorectal cancer. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002; 62: 49-57. [\[CrossRef\]](#)
- 15 Kaniyama H, Noda H, Konishi F, Rikiyama T. Molecular biomarkers for the detection of metastatic colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 8928-8938.
- 16 Hirz S, Hendricks A, Wittig A, et al. Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients – a prospective study. *BMC Cancer.* 2017; 17: 53. [\[CrossRef\]](#)
- 17 Vogeleer FJ, Mesker WE, Rijkse AM, et al. Clinical impact of different detection methods for disseminated tumor cells in bone marrow of patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases: a prospective follow up study. *BMC Cancer.* 2010; 10: 153. [\[CrossRef\]](#)
- 18 Kienle P, Koch M, Autschbach F, et al. Decreased detection rate of disseminated tumor cells of rectal cancer patients after preoperative chemotherapy: a first step towards a molecular surrogate marker for neoadjuvant treatment in colorectal cancer. *Ann Surg.* 2008; 238: 324-330. [\[CrossRef\]](#)
- 19 Vogel I, Soeth E, Röder C, et al. Multivariate analysis reveals RT-PCR-detected tumor cells in the blood and/or bone marrow of patients with colorectal carcinoma as an independent prognostic factor. *Ann Oncol.* 2000; 11 (suppl 4): 43.
- 20 Vogeleer FJ, van Pelt GW, van Leeuwen AM, et al. Are disseminated tumor cells in bone marrow and tumor-stroma ratio clinically applicable

for patients undergoing surgical resection of primary colorectal cancer? The Leiden MRO study. *Cell Oncol (Dordr).* 2016; 39: 537-544. [\[CrossRef\]](#)

- 21 Hirz S, Röder C, Tapel J, et al. Cytokeratin 20 positive circulating tumor cells are a marker for response after neoadjuvant chemotherapy but not for prognosis in patients with rectal cancer. *BMC Cancer.* 2015; 15: 953. [\[CrossRef\]](#)
- 22 Kolodziejczyk P, Płacz-Noworolska A, Drelak G, et al. The effects of preoperative chemotherapy on isolated tumor cells in the blood and bone marrow of gastric cancer patients. *Br J Cancer.* 2007; 97: 589-592. [\[CrossRef\]](#)
- 23 Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138: 1714-1728. [\[CrossRef\]](#)
- 24 Hirz S, Beckhans J, Röder C, et al. Disseminated tumor cells in the bone marrow negatively influence survival after resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19: 2530-2546. [\[CrossRef\]](#)
- 25 Velli CT, Welder B, Güller U, et al. Presence of bone marrow micro-metastases in stage I-II colon cancer patients is associated with worse disease-free and overall survival. *Cancer Med.* 2017; 6: 918-927. [\[CrossRef\]](#)
- 26 Marsden CG, Wright MJ, Carrier L, et al. Disseminated breast cancer cells acquire a highly malignant and aggressive metastatic phenotype during metastatic latency in the bone. *PLoS One.* 2012; 7: e47587. [\[CrossRef\]](#)
- 27 Teichgraber RS, Patel LR, Bedenis R, et al. GASS receptor status is associated with dormancy and bone metastatic tumor formation. *PLoS One.* 2013; 8: e61873. [\[CrossRef\]](#)
- 28 Chen SB, Su XD, Mo GW, et al. Prognostic value of bone marrow micrometastasis in patients with operable esophageal squamous cell carcinoma: a long-term follow-up study. *J Thorac Oncol.* 2014; 9: 1207-1213. [\[CrossRef\]](#)
- 29 Pestel K, Ali-Panifiliou C. Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients. *Bonekey Rep.* 2014; 3: 584. [\[CrossRef\]](#)
- 30 Stac M, Baran J, Szatanek R, et al. Properties of monocytes generated from hematopoietic CD34(+) stem cells from bone marrow of colon cancer patients. *Cancer Immun Immunother.* 2013; 62: 705-713. [\[CrossRef\]](#)
- 31 Feuerer M, Beckhova P, Garbi N, et al. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med.* 2003; 9: 1151-1157. [\[CrossRef\]](#)
- 32 van Leeuwen-Karlhoff N, Lundberg K, Westers TM, et al. Human bone marrow-derived myeloid dendritic cells show an immature transcriptional and functional profile compared to their peripheral blood counterparts and separate from S1a(+) non-classical monocytes. *Front Immunol.* 2018; 9: 1619. [\[CrossRef\]](#)
- 33 Feuerer M, Roche M, Bai L, et al. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2001; 92: 96-105. [\[CrossRef\]](#)
- 34 Feuerer M, Beckhova P, Bai L, et al. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient derived re-activated memory T cells from bone marrow. *Nat Med.* 2001; 7: 452-458. [\[CrossRef\]](#)
- 35 Schirmacher V, Feuerer M, Fournier P, et al. T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protective anti-tumor immunity. *Trends Mol Med.* 2003; 9: 526-534. [\[CrossRef\]](#)
- 36 Schirmacher V. Cancer-reactive memory T cells from bone marrow: spontaneous induction and therapeutic potential (Review). *Int J Oncol.* 2015; 47: 2005-2016. [\[CrossRef\]](#)

**The prognostic significance of HLAA2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers**

Dyląg-Trojanowska, K.; Pach, R.; Siedlar, M.; Baran, J.; Zybaczyńska, J.; Szczepanik AM. *Nowotwory J Oncol* **2020**; 70: 47–53.

**Redaktor Naczelny**  
Editor in Chief  
Wojciech M. Wysocki

**Redaktor Honorowy**  
Editor Emeritus  
Edward Tawpik

**Adres redakcji**  
Address of Editorial Office:  
Narodowy Instytut Onkologii  
Im. Marii Skłodowskiej-Curie  
- Państwowy Instytut Badawczy  
Ul. Roentgena 5  
02-781 Warszawa

**Adres korespondencyjny**  
Address for correspondence:  
Krakowska Akademia  
Im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego  
ul. G. Herlinga-Grudzińskiego 1  
30-705 Kraków  
Pok. 309

e-mail: [redakcja@nowotwory.edu.pl](mailto:redakcja@nowotwory.edu.pl)  
[www.nowotwory.edu.pl](http://www.nowotwory.edu.pl)



# Nowotwory

Journal of Oncology

Pismo ukazuje się od 1923 roku

Kraków, 20 kwietnia 2020 r.

SZ.P.  
Katarzyna Dyląg-Trojanowska

Szanowna Pani,  
z przyjemnością informuję, że Państwa artykuł *The prognostic significance of HLA-A2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers* został przyjęty do druku w czasopiśmie *Nowotwory. Journal of Oncology*.

Z wyrazami szacunku

prof. nadzw. dr hab. Wojciech Wysocki  
Redaktor Naczelny  
*Nowotwory. Journal of Oncology*

**Adres Wydawcy**  
Address of the Publisher  
VM Media sp. z o.o. VM Group sp.k.  
ul. Świętokrzyska 73  
80-180 Gdańsk  
tel. (58) 320 94 94  
faks: (58) 320 94 60  
e-mail: [viamedica@viamedica.pl](mailto:viamedica@viamedica.pl)  
[www.viamedica.pl](http://www.viamedica.pl)



## The prognostic significance of HLA-A2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers

Katarzyna Dyląg-Trojanowska<sup>1</sup>, Radosław Pach<sup>2</sup>, Maciej Siedlar<sup>3</sup>,  
 Jarosław Baran<sup>3</sup>, Justyna Zybaczynska<sup>4</sup>, Antoni M. Szczepanik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of General and Oncological Surgery, John Gawlik Hospital, Sucha Beskidzka

<sup>2</sup>First Department of General, Oncological and Gastroenterological Surgery, Jagiellonian University Medical College, Krakow

<sup>3</sup>Department of Clinical Immunology, Institute of Pediatrics, Jagiellonian University Medical College, Krakow

<sup>4</sup>Penn State Health Hershey Medical Center, Hershey, PA, USA

**Introduction.** Current knowledge about colorectal cancer (CRC) identifies tumor immunogenicity as one of the more important issues. In cancers, a prerequisite for immune system activation is the presentation of tumor associated antigen (TAA) epitopes to immunocompetent cells. HLA-A2 is one of the antigens in the context of which TAAs are present, but data on the possible impact of HLA-A2 antigen expression on the survival of patients with colorectal cancer are scarce and sometimes contradictory. The aim of this study was to analyse the relationship between HLA-A2 expression in patients with left-sided colorectal cancer in various stages of disease and their long-term survival, and to answer the question of whether a lack of HLA-A2 expression is actually a negative prognostic factor.

**Material and methods.** A prospective analysis of 58 patients with left-sided colorectal cancer was carried out. Expression of HLA-A2 was determined by patient blood lymphocyte staining, and analysed using flow cytometry.

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

**Conclusion.** HLA-A2 status may affect the clinical course of patients with left-sided colon and rectal cancer, although left-sided tumors are less immunogenic than right-sided ones. HLA-A2 positive patients with left-sided colorectal cancer lived statistically longer than those who were HLA-A2 negative ( $p = 0,027$ ). Lack of HLA-A2 expression was a negative prognostic factor in the group of radically operated patients.

Biuletyn PTO NOWOTWORY 2020; 5, 3: 64–69

**Key words:** HLA; HLA-A2; left-sided colon cancer; overall survival; prognostic biomarker

### Introduction

The appropriate immune response to tumor cells is dependent on their ability to be recognized by immunocompetent

cells. Tumor associated antigens (TAA), or their epitopes, are presented by antigen presenting cells (APCs) in the context of human leukocyte antigen (HLA) expression. Some TAA-derived

#### How to cite:

Dyląg-Trojanowska K, Pach R, Siedlar M, Baran J, Zybaczynska J, Szczepanik AM. *The prognostic significance of HLA-A2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers.* NOWOTWORY J Oncol 2020; 70: 47–53.

epitopes require a specific HLA, or other antigens, for presentation. HLA class I antigens are integral membrane glycoproteins that are inherited and expressed at varying levels on the surface of virtually all somatic cells [1]. It is known that HLA-A2 (MHC class I) is common among Caucasians (approximately 45% of the Caucasian population) [2] and that some antigens characteristic for colorectal cancer (CRC) are presented in its context. These include CSNK1A1, GAS7, HAUS3, SRPX, WDR46, ERBB2, AKAP13, and MUC1 antigens.

A large proportion of cancer vaccine research has been limited to the HLA-A2 positive population, and HLA-A2 negative patients have been used as a control group in targeted immunotherapy studies [3]. However, some findings show that HLA status itself can influence the clinical course of the disease, as the natural immune response may differ between patients with or without this antigen expression.

Many studies have described HLA expression in patients with cancers of the head and neck [4], breast [5], ovary [6, 7, 8], prostate [8], primary laryngeal squamous cell cancers [9], non-small cell lung cancer [10], melanoma [1], as well as on tumor cells.

Data on the possible impact of HLA-A2 antigen expression on the survival of patients with colorectal cancer are limited and sometimes contradictory. Most data covers a mixed population of right and left-sided colon and rectal cancer patients. Since we know that MHC class I expression is often absent in micro-satellite instability (MSI) tumors [11, 12], which are clinically characterized as having a favorable prognosis and are more frequently observed in right-sided colon tumors [13, 14], the results obtained from a mixed population of all colon and rectal cancer patients might not be representative [15].

According to UICC cancer statistics published in 2018, colorectal cancer is the third cancer in terms of incidence and second in cancer-related mortality in the world. Despite progress in prevention and therapy, there is still space for new therapies and translational research in colorectal cancer. In recent years, several trials on immunotherapy using checkpoint inhibitors in colorectal cancer have produced promising results [16]. However, more than 50–80% of cancer patients fail to respond to checkpoint inhibitor therapy [17]. Therefore, the investigation of predictive and prognostic factors in various subgroups of colorectal cancer patients is justified.

Colorectal cancer is not a homogenous disease in terms of primary tumor location, and there is evidence that right-sided and left-sided cancers may have different biologies and prognoses [18–21]. CRC immunogenicity, understood as the ability to induce an immune response, also differs between the right and left sides of the colon. There are two different types of colorectal cancer – those which are highly immunogenic (with multiple DNA mutations, chromosomal stability (CS), microsatellite instability (MSI) phenotype and the presence of multiple tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), prevalent in the right colon) and those with low immunogenicity (with a limited number of DNA mutations, a microsatellite stable (MSS) and

chromosomally unstable (CIN) phenotype located in the left side of the colon and rectum) [22]. This heterogeneity should be used to stratify patients in order to provide them with the most optimal, current, and novel immune-based therapeutic strategies available in clinical practice [21].

In this study, we concentrated on tumors located in the left colon and rectum – a more homogenous sub-group of CRC. Locally advanced malignancies were the main area of interest.

The aim of this study was to answer the question of whether HLA-A2 expression is an important prognostic factor in left-sided CRC, which may present with decreased immunogenicity compared to right-sided CRC.

## Material and methods

The study group consisted of 58 colorectal cancer patients treated in a single institution between 2007 and 2012. Only patients with tumors located in the rectum or left colon were included. The term left colon was defined as the large intestine, from the left 1/3 of the transverse colon distally. All patients had histologically confirmed disease, were over 18 years-old, and had had an electively performed surgical procedure. Patients with simultaneous right-sided colon cancer or patients with a history of other neoplastic diseases were excluded. Preoperative radiotherapy was used in 3 of the rectal cancer patients. All patients had no history of autoimmune diseases or recent infections. The group was composed of 25 women and 33 men, with a mean age of 66 (SD 11), in varying stages of disease (Tab. I).

The surgical procedures were carried out according to oncological guidelines. Due to the changes of the TNM staging systems during the study period, all the specimens were re-staged according to the 7<sup>th</sup> edition of the TNM. The clinical and pathological data were recorded. Patients received postoperative chemotherapy if indicated. All patients were followed up for at least 5 years, or until death, and dates of death were verified by the census registry office.

All patients provided their informed, written consent. The study was approved by the Jagiellonian University Ethical Committee KBET no. 86/B/2007 and KBET no. 122.6120.128.2015. The study was registered at ClinicalTrials.gov, registration number NCT03640572.

Blood samples were collected prior to any interventional procedure in sterile EDTA vacutainers. Cell preparation was started 1–2 hours after a blood draw. Expression of HLA-A2 was determined by patient blood lymphocyte staining, using PE-conjugated mouse anti-human HLA-A2 mAb or PE-conjugated isotype-matched mouse immunoglobulins (both BD Pharmingen) as a negative control, followed by lysis of erythrocytes (FACS Lysing Solution, BD Biosciences) and flow cytometry analysis (FACS Canto).

## Statistics

The statistical analysis was conducted using the software Statistica 13 (StatSoft Inc.). The Kaplan-Meier method was used for the calculation of survival probabilities and the Wilcoxon-Ge-

**Table I.** Clinicopathological characteristics of the patients

Tumor location	Number of patients
Left colon	27
Rectum	31
T1	0
T2	9
T3	39
T4	10
N0	25
N1	15
N2	14
Nx	4
M0	46
M1	12
Stage I	7
Stage II	18
Stage III	21
Stage IV	12
Grade 1	17
Grade 2	25
Grade 3	9
Grade not assessed	7
R0	44
R1	2
R2	12

han test for the comparison of survival curves between groups. The Cox proportional hazard model was used for multivariate analysis. The Chi-square test and the Fisher exact test were used to compare the clinical and pathological features between the HLA-A2 positive and negative groups. Mean patient age was compared using Mann Whitney's U test. A p-value of <0.05 was established as statistically significant.

## Results

Fifty-eight colorectal cancer patients were evaluated; 33 were found to be HLA-A2 positive (56% of whole study group). The distribution of clinicopathological characteristics of patients in HLA-A2+ and HLA-A2- groups are listed in table II.

**Table II.** Clinicopathological characteristics of patients in HLA2+ and HLA2- groups

	HLAA2+ n = 33	HLAA2- n = 25	p
Age	65.85 (32–82)	65.95 (52–89)	0.863
Gender M/F	21/12	12/13	0.234
T1	0	0	>0.05*
T2	5	4	0.930
T3	27	12	0.007
T4	1	9	0.001
N-	15	10	0.678
N+	18	15	0.678
M0	28	18	0.232
M1	5	7	0.232
Stage I	4	3	0.989
Stage II	11	7	0.664
Stage III	13	8	0.562
Stage IV	5	7	0.232
Left colon	20	7	0.014
Rectum	13	18	0.014
G1	10	7	0.847
G2+G3	23	18	0.847

The groups of patients with the presence or absence of HLA-A2 had similar structures in terms of age, gender, grade of differentiation (G), and TNM, and differed significantly only in terms of their T3 and T4 characteristics and location (left colon/rectum).

The analysis of clinicopathological features showed that in the group of patients with T3 tumors, patients with HLA-A2 expression predominated, while in the group of patients with T4 tumors most patients were HLA-A2 negative.

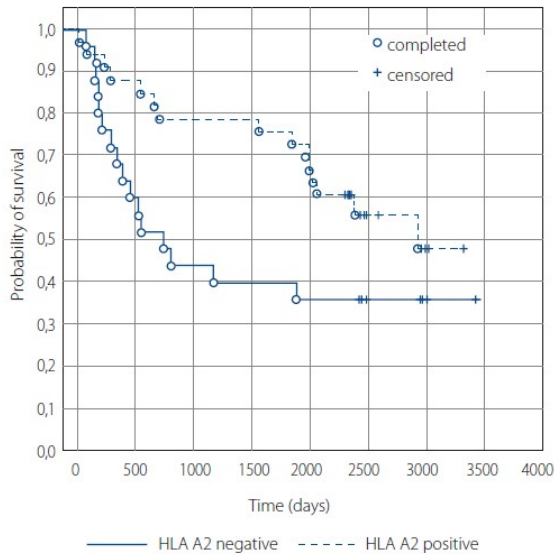
Among the patients with rectal tumors, the HLA-A2 negative phenotype dominated, while among patients with left-sided colon tumors, significantly more patients had HLA-A2 expression.

All the patients were followed-up for at least five years.

The 5-year survival rate for HLA-A2 positive patients in all stages was 72.7%, while for HLA-A2 negative patients it was 40% (Fig. 1).

The Kaplan Meier plot (Fig. 1) showed that in the entire study group HLA-A2 positive patients lived longer than





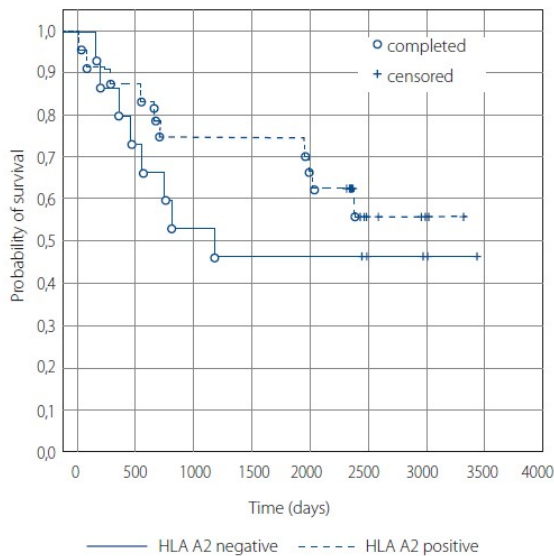
**Figure 1.** Cumulative proportion of survival for left-sided colorectal cancer patients in all tumor stages in HLAA2+ and HLAA2- groups

HLA-A2 negative ones. This difference was statistically significant ( $p = 0.027$ ) according to the Wilcoxon-Gehan test.

Therefore, in our patient cohort, we found that the expression of HLA-A2 was associated with prolonged survival. In a group consisting of stage II and III CRC analyzed together, the 5-year survival rates were 75% and 36% for HLA-A2 positive and HLA-A2 negative patients respectively. The difference between the groups however was not statistically significant (Fig. 2).

An analysis of the prognostic factors in locally advanced cancer was performed.

Variables with confirmed prognostic value, such as tumor stages I-III, radicality of resection, as well as HLA-A2 status were included in the Cox proportional hazard model.



**Figure 2.** Cumulative proportions of survival for HLA-A2+ and HLA-A2- groups of left-sided colorectal cancer patients – tumor stages II+III

HLA-A2 status was an independent prognostic factor in this group of patients ( $p = 0.012$ ; HR = 2.65; with 95% CI for HR: 1.23–5.72). This finding showed that the lack of expression of HLA-A2 was an independent negative prognostic factor.

## Discussion

The results from this study show that the presence of HLA-A2 in patients with left-sided colon and rectal cancers is an important prognostic for their outcomes. HLA-A2 is among the 8 most frequent HLA alleles (HLA A\*01, A\*02, A\*03, A\*24, B\*07, B\*08, B\*44, C\*07) in the Caucasian population [23]. In our study, the expression of HLA-A2 was observed in 56% patients with CRC. This percentage is slightly higher than the prevalence of HLA-A2 antigens in the Caucasian population in Central and Western Europe, which is around 45% (42.6-51.3%), and also higher than in the results of the study by Kiewe et al. who found a frequency of exactly 50% of HLA-A2 expression. [2] However, these findings are not statistically significant.

The groups of patients with the presence or absence of HLA-A2 expression had similar structures in terms of age, gender, grade of differentiation (G) and TNM, and differed significantly only in terms of T3 and T4 characteristics and location (left colon, rectum). These patients were not preselected, and the researchers were not aware of their HLA status during patient recruitment.

The location of tumors does not influence survival, because, as previously mentioned, rectal and left-sided colon cancer patients have very similar prognosis. Moreover, only 3 rectal cancer patients received pre-operative radiotherapy (two HLA-A2 negative and one HLA-A2 positive). The depth of the invasion itself, the T feature, is not a potent prognostic factor until the tumor cannot be radically resected. In order to overcome the imbalance in the above mentioned features, a multivariate proportional hazard model was constructed.

In our analysis, there was a significantly higher survival rate for HLA-A2 positive patients, with 72.7% 5-year survival for the HLA-A2 positive patients and 40% for HLA-A2 negative patients. The difference between these groups was found to be statistically significant ( $p = 0.027$ ).

Our results conflict with the study by Kiewe et al. who found no statistically significant difference in 5-year survival and overall survival between HLA-A2 positive and HLA-A2 negative groups of patients with colorectal cancer [2]. One possible explanation for these differences might be differences in the patient cohort.

In the group of patients with locally advanced cancer after radical surgery, the lack of expression of HLA-A2 was an independent prognostic factor which negatively affected survival ( $p = 0.012$ ; HR = 2.65; with 95% CI for HR: 1.23–5.72). This phenomenon is not observed in all cancers. In breast cancer, HLA positive status is a favorable prognostic factor, however, in ovarian cancer it is a negative prognostic factor [7].

The 2015 Consensus of Molecular Subtypes (CMS) is considered the most robust classification system currently available

for CRC – with clear biological interpretability – and a basis for future clinical stratification and subtype-based targeted interventions. This study identified 4 consensus molecular subtypes: CMS1 (MSI-immune), CMS2 (canonical), CMS3 (metabolic), CMS4 (mesenchymal) [24]. In relation to the anatomical location of CRC, CMS1 dominates in the right colon, CMS2 in the left colon, and CMS3 and CMS4 tumors do not have a specific anatomic location.

The group of patients in our investigation was more homogeneous than in other studies, as only left-sided colon and rectal cancer patients were included. Earlier studies analyzed a mixed population of colorectal [2, 25, 26], colon [27], or only rectal cancer patients [15, 28]. The authors of previously published papers did not take into account the fact that colorectal cancer may differ in biology, and thus the prognosis and response to treatment may vary, depending on the location of the tumor [18–21].

HLA-A2 expression is investigated in patients in several ways. One of the approaches uses the identification of HLA-A2 on the surface of cancer cells, other approaches identify its expression on somatic cells.

In publications, HLA status is mostly characterized in terms of the tumor environment, and its involvement in the evasion of the immune response, by analysis of its expression by the immunohistochemistry in tumor-infiltrating immune cells or in tumor cells. On the other hand, HLA status is detected in host peripheral blood cells, reflecting its role in the recognition of tumor antigens, by identifying the HLA protein using techniques such as immunoassays, flow cytometry etc., or the gene alleles, mainly by polymerase chain reaction (PCR) [10].

The interpretation and comparison of studies examining HLA class I antigen expression are generally very difficult, because the methods used for the analysis of HLA class I antigen expression vary substantially [29]. According to a recently published study, exposure to an inflammatory environment might be responsible for upregulating HLA class I gene expression in tumor cells, but the presence of HLA class I molecules at the cell surface is precluded by defects in other components of the antigen processing machinery. Besides, RNA expression analysis can detect HLA class I not only in tumors but also in immune and other stromal cells expressing this HLA. Therefore, HLA class I phenotypes should be supported by genetic data confirming mechanistic defects, while RNA expression level appears insufficient to determine HLA class I tumor status [30].

Although there are some studies assessing HLA-A on CRC tumor surface in the available literature [15, 25–28, 30], HLA-A2 expression on somatic cells in patients with CRC has not been extensively studied in the past [2].

In this study we decided to determine HLA-A2 expression on somatic cells from the peripheral blood, and therefore, it is very difficult to compare our findings with those of other studies. It would be interesting to assess HLA-A2 expression on somatic and cancer cells simultaneously, but unfortunately this was not possible due to organizational and financial constraints.

Tumor cells do not present distinctly different HLA class I antigens than the host cell, however, it should be noted that one mechanism of cancer escape from the control of the immune system is the loss, or reduction, of the expression of HLA class I antigens on cancer cell surfaces. Therefore, tumor cells may differ from somatic cells in this respect. The loss of HLA class I is rather rare (16–20%) among MMR-p (MSS) tumors which dominate in the left half of the colon, which was confirmed on a larger cohort by Ijsselstein et al. [30]. The conclusion from their study, that HLA class I is an important determinant of metastatic homing in CRCs, is in-line with our observation of better prognosis for patients with left-sided colorectal cancer and HLA-A2 expression.

Recently, Löffler et al. [23] provided comprehensive data on the HLA presented antigenic repertoire of CRC cells. They identified a set of 758 HLA-class I and 310 HLA class II presented peptides (ligandome), exclusively expressed on colorectal carcinoma tissue, and proposed 12 naturally presented HLA class I ligands out of 38 preselected peptides (five peptides each were selected for the seven most frequent HLA allotypes in the Caucasian population and three additional peptides were selected for HLA-C\*07), as putative candidates for future anti-CRC vaccination. Although among them only one HLA-A2 was presented, one cannot exclude the possibility that other non-selected peptides, including those related to HLA-A2, may be effective in the induction of an adaptive anti-tumor immune response, thus increasing the survival of HLA-A2 positive patients. Still more translational studies should be performed in order to understand CRC and immune system interactions.

## Conclusions

In summary, the results of our study show that:

1. Patients with left-sided colorectal cancer and HLA-A2 expression lived statistically longer than HLA-A2 negative patients.
2. Lack of HLA-A2 expression was a negative prognostic factor in the group of patients with radical resections without metastases.
3. HLA-A2 status may affect the clinical course of patients with left-sided colon and rectal cancer, even though these tumors are considered less immunogenic than right-sided cancers.

The question remains whether we should consider the status of HLA-A2 expression when qualifying patients for adjuvant treatment and choosing between more or less aggressive therapies to improve their treatment results.

**Funding.** This research was funded by Ministry of Science and Higher Education of Poland Grants 2P05C 001 29 and K/PBW/000421.

## Abbreviations

APC – antigen presenting cell

CI – confidence interval  
 CIN – chromosomal instability  
 CRC – colorectal cancer  
 HLA – human leukocyte antigen  
 HLAA2 – human leukocyte antigen A2  
 HR – hazard ratio  
 MHC – major histocompatibility complex  
 MMR – mismatch repair  
 MMR-d – mismatch repair deficient  
 MMR-p – mismatch repair proficient  
 MSI – microsatellite instability  
 MSS – microsatellite stable  
 MUC1 – mucin 1  
 OS – overall survival  
 TAA – tumor-associated antigen  
 TIL – tumor-infiltrating lymphocyte

**Conflict of interest:** none declared

**Antoni M. Szczepanik**

*Jagiellonian University Medical College*

*First Department of General, Oncological and Gastroenterological Surgery*

*ul. Jakubowskiego 2*

*31-501 Krakow, Poland*

*e-mail: antoni.szczepanik@uj.edu.pl*

*Received: 17 Feb 2020*

*Accepted: 20 Apr 2020*

## References






- Pandolfi F, Boyle LA, Trentin L, et al. Expression of HLA-A2 antigen in human melanoma cell lines and its role in T-cell recognition. *Cancer Res.* 1991; 51(12): 3164–3170, indexed in Pubmed: 1904004.
- Kiewe P, Mansmann V, Scheibenbogen C, et al. HLA-A2 expression, stage, and survival in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2008; 23(8): 767–772, doi: 10.1007/s00384-008-0488-y, indexed in Pubmed: 18461337.
- Hee Lee Ji, Park MS, Hwang JE, et al. Dendritic cell-based immunotherapy for colon cancer using an HLA-A\*0201-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope from tumor-associated antigen 90K. *Cell Mol Immunol.* 2013; 10(3): 275–282, doi: 10.1038/cmi.2012.74, indexed in Pubmed: 23524651.
- Ferris RL, Hunt JL, Ferrone S. Human leukocyte antigen (HLA) class I defects in head and neck cancer: molecular mechanisms and clinical significance. *Immunol Res.* 2005; 33(2): 113–133, doi: 10.1385/IR:33:2:113, indexed in Pubmed: 16234579.
- Madjd Z, Spendlove I, Pinder SE, et al. Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int J Cancer.* 2005; 117(2): 248–255, doi: 10.1002/ijc.21163, indexed in Pubmed: 15900607.
- Vitale M, Pelusi G, Taroni B, et al. HLA class I antigen down-regulation in primary ovary carcinoma lesions: association with disease stage. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(1): 67–72, indexed in Pubmed: 15671529.
- Gamzatova Z, Villabona L, Dahlgren L, et al. Human leukocyte antigen (HLA) A2 as a negative clinical prognostic factor in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006; 103(1): 145–150, doi: 10.1016/j.ygyno.2006.02.004, indexed in Pubmed: 16542716.
- De Petris L, Bergfeldt K, Hising C, et al. Correlation between HLA-A2 gene frequency, latitude, ovarian and prostate cancer mortality rates. *Med Oncol.* 2004; 21(1): 49–52, doi: 10.1385/MO:21:1:49, indexed in Pubmed: 15034213.
- Ogino T, Shigyo H, Ishii H, et al. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res.* 2006; 66(18): 9281–9289, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0488, indexed in Pubmed: 16982773.
- Mezquita L, Charrier M, Faivre L, et al. Prognostic value of HLA-A2 status in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2017; 112: 10–15, doi: 10.1016/j.lungcan.2017.07.004, indexed in Pubmed: 29191581.
- Diessen JW, de Miranda NF, Mulder A, et al. High-resolution analysis of HLA class I alterations in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2006; 6: 233, doi: 10.1186/1471-2407-6-233, indexed in Pubmed: 17014712.
- Kloor M, Becker C, Benner A, et al. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Res.* 2005; 65(14): 6418–6424, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0044, indexed in Pubmed: 16024646.
- Söreide K, Janssen EAM, Söiland H, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg.* 2006; 93(4): 395–406, doi: 10.1002/bjs.5328, indexed in Pubmed: 16555243.
- Kim K, Castro EJ, Shim H, et al. Differences Regarding the Molecular Features and Gut Microbiota Between Right and Left Colon Cancer. *Ann Coloproctol.* 2018; 34(6): 280–285, doi: 10.3393/ac.2018.12.17, indexed in Pubmed: 30630301.
- Speetjens FM, de Bruin EC, Morreau H, et al. Clinical impact of HLA class I expression in rectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57(5): 601–609, doi: 10.1007/s00262-007-0396-y, indexed in Pubmed: 17874100.
- Passardi A, Canale M, Valgiusti M, et al. Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(6), doi: 10.3390/ijms18061324, indexed in Pubmed: 28635639.
- Wang RF, Wang HY. Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Res.* 2017; 27(1): 11–37, doi: 10.1038/cr.2016.155, indexed in Pubmed: 28025978.
- Lim DRo, Kuk JK, Kim T, et al. Comparison of oncological outcomes of right-sided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection: Which side is better outcome? *Medicine (Baltimore).* 2017; 96(42): e8241, doi: 10.1097/MD.00000000000008241, indexed in Pubmed: 29049212.
- Benedix F, Kube R, Meyer F, et al. Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum.* 2010; 53(1): 57–64, doi: 10.1007/DCR.0b013e3181c703a4, indexed in Pubmed: 20010352.
- Derwinger K, Gustavsson B. Variations in demography and prognosis by colon cancer location. *Anticancer Res.* 2011; 31(6): 2347–2350, indexed in Pubmed: 21737663.
- Shen H, Yang J, Huang Q, et al. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(21): 6470–6478, doi: 10.3748/wjg.v21.i21.6470, indexed in Pubmed: 26074686.
- de Vries NL, Swets M, Vahrmeijer AL, et al. The Immunogenicity of Colorectal Cancer in Relation to Tumor Development and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(7), doi: 10.3390/ijms17071030, indexed in Pubmed: 27367680.
- Löffler MW, Kowalewski DJ, Backert L, et al. Mapping the HLA Ligandome of Colorectal Cancer Reveals an Imprint of Malignant Cell Transformation. *Cancer Res.* 2018; 78(16): 4627–4641, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1745, indexed in Pubmed: 29789417.
- Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015; 21(11): 1350–1356, doi: 10.1038/nm.3967, indexed in Pubmed: 26457759.
- Sandel MH, Speetjens FM, Menon AG, et al. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol Immunol.* 2005; 42(4): 541–546, doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.039, indexed in Pubmed: 15607811.
- Swets M, König MH, Zaalberg A, et al. HLA-G and classical HLA class I expression in primary colorectal cancer and associated liver metastases. *Hum Immunol.* 2016; 77(9): 773–779, doi: 10.1016/j.humimm.2016.03.001, indexed in Pubmed: 26968946.
- Zeebstraten ECM, Reimers MS, Saadatmand S, et al. Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients. *Br J Cancer.* 2014; 110(2): 459–468, doi: 10.1038/bjc.2013.696, indexed in Pubmed: 24196788.
- Reimers MS, Engels CC, Putter H, et al. Prognostic value of HLA class I, HLA-E, HLA-G and Tregs in rectal cancer: a retrospective cohort study. *BMC Cancer.* 2014; 14: 486, doi: 10.1186/1471-2407-14-486, indexed in Pubmed: 24997850.
- Kloor M, Michel S, von Knebel Doeberitz M. Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *Int J Cancer.* 2010; 127(5): 1001–1010, doi: 10.1002/ijc.25283, indexed in Pubmed: 20198617.
- Ijsselstein ME, Petitprez F, Lacroix L, et al. Revisiting immune escape in colorectal cancer in the era of immunotherapy. *Br J Cancer.* 2019; 120(8): 815–818, doi: 10.1038/s41416-019-0421-x, indexed in Pubmed: 30862951.

**T Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Lymphocytes in the Peripheral Blood of Left-Sided Colorectal Cancer Patients.**

Dyląg-Trojanowska, K.; Rogala, J.; Pach, R.; Siedlar, M.; Baran, J.; Sierżęga, M.; Zybaczyńska, J.; Lenart, M.; Rutkowska-Zapala, M.; Szczepanik, A.M. *Medicina (Lithuania)* **2019**, *55*, 307. DOI:10.3390/medicina55060307

Article

# T Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Lymphocytes in the Peripheral Blood of Left-Sided Colorectal Cancer Patients

Katarzyna Dylag-Trojanowska <sup>1</sup>, Joanna Rogala <sup>2</sup>, Radoslaw Pach <sup>2</sup>, Maciej Siedlar <sup>3</sup>,  
Jaroslaw Baran <sup>3</sup>, Marek Sierzega <sup>2</sup>, Justyna Zybachynska <sup>4</sup>, Marzena Lenart <sup>3</sup>,  
Magdalena Rutkowska-Zapala <sup>3</sup> and Antoni M. Szczepanik <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of General and Oncological Surgery, John Gawlik Hospital, 22 Szpitalna Street, 34-200 Sucha Beskidzka, Poland; kadgta@interia.pl

<sup>2</sup> First Department of General, Oncological and Gastroenterological Surgery, Jagiellonian University Medical College, 40 Kopernika Street, 31-501 Krakow, Poland; jrogala@su.krakow.pl (J.R.); radoslaw.pach@uj.edu.pl (R.P.); marek.sierzega@uj.edu.pl (M.S.)

<sup>3</sup> Department of Clinical Immunology, Institute of Pediatrics, Jagiellonian University Medical College, 265 Wielicka Street, 30-663 Krakow, Poland; misiedla@cyf-kr.edu.pl (M.S.); mibaran@cyf-kr.edu.pl (J.B.); m.lenart@uj.edu.pl (M.L.); magdalena.rutkowska@uj.edu.pl (M.R.-Z.)

<sup>4</sup> Jagiellonian University Medical College, 31-008 Cracow, Poland; justyna.zybachynska@gmail.com

\* Correspondence: antoni.szczepanik@uj.edu.pl; Tel.: +48-12-424-8007

Received: 28 April 2019; Accepted: 18 June 2019; Published: 25 June 2019



**Abstract:** *Background and objectives:* T regulatory lymphocytes (Treg) are one of the subsets of T-lymphocytes involved in the interaction of neoplastic tumors and the host immune system, and they may impair the immune reaction against cancer. It has been shown that Treg are increased in the peripheral blood of patients with various cancers. In colorectal cancer, the prognostic role of Treg remains controversial. Colorectal cancer is a heterogenous disease, with many variations stemming from its primary tumor location. The aim of this study is to analyse the relationship between the amount of Treg in the peripheral blood of patients with left-sided colorectal cancer in various stages of disease and long-term survival. *Materials and Methods:* A prospective analysis of 94 patients with left-sided colorectal cancer and a group of 21 healthy volunteers was carried out. Treg levels in peripheral blood were analysed using flow cytometry. *Results:* There was a statistically significant difference between the amount of Treg in the I and II TNM stages ( $p = 0.047$ ). The number of Treg in the entire study group was significantly lower than in the control group ( $p = 0.008$ ) and between patients in stages II and III and the control group ( $p = 0.003$  and  $p = 0.018$ ). The group of pT3+pT4 patients also had significantly lower Treg counts in their peripheral blood than the control group ( $p = 0.005$ ). In the entire study group, the level of Treg cells in the peripheral blood had no influence on survival. The analysis of the TNM stage subgroups also showed no difference in survival between patients with “low” and “high” Treg counts. *Conclusion:* The absolute number of Treg in the peripheral blood of patients with left-sided colorectal cancer was significantly decreased in comparison to healthy controls, especially for patients with stage II+III disease. Treg presence in the peripheral blood had no impact on survival.

**Keywords:** left-sided colon cancer; T-regulatory cells (Treg); peripheral blood; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells; prognosis; overall survival; prognostic biomarker

## 1. Introduction

T-regulatory lymphocytes (Treg) are one of the subsets of T-lymphocytes involved in the interaction of neoplastic tumors and the host immune system. These cells effectively suppress the immune response against self-antigens, preventing autoimmune-reactions. In spite of that, multiple preclinical and clinical studies have suggested that Treg cells may impair immune surveillance against cancer during oncogenesis, prevent the development of effective antitumor immunity in patients with established tumors, and possibly promote tumor progression.

However, their role in various cancers differs. In some studies, the presence of Tregs in peritumoral infiltrate was found to be a negative prognostic factor, such as in ovarian [1], breast [2], gastric [3], and pancreatic cancers [4]. On the other hand, the presence of the same cells within the tumor infiltrate was connected with better prognosis in oropharyngeal [5] and esophageal cancers [6]. In colorectal cancer, the prognostic role of Treg remains controversial [7]; some studies have reported a positive prognostic role of Treg, while others, a negative influence. T regulatory lymphocytes have also been investigated in the peripheral blood of cancer patients. Increases of Treg amounts were observed in some tumor types and sites, alongside decreases in comparison to healthy controls [8,9].

Since the composition of peritumoral infiltrate may be assessed only after surgical excision, the level of Treg cells in the peripheral blood is an attractive potential marker for repeated and long-term cancer monitoring. Examples of Treg cells serving as markers include the results of a pancreatic cancer study where peripheral blood Treg level predicted the tumor response to chemotherapy [10], and another study, where Treg levels changed markedly in rectal cancer patients after preoperative radiotherapy [11].

Colorectal cancer is one of the most frequent malignancies worldwide. According to the UICC data published in 2018, it is the third cancer in incidence and second in cancer-related mortality. Despite progress in prevention and therapy, there is still space for new therapies and translational research in colorectal cancer. In recent years, several trials on immunotherapy using checkpoint inhibitors in colorectal cancer have produced promising results [12]. Treg are involved in the mechanisms of immunosuppression and immunotolerance, which are the targets of such immunotherapy [13]. Therefore, the investigation of these cells in various subgroups of colorectal cancer patients is justified. Colorectal cancer is not a homogenous disease in terms of primary tumor location, and there is evidence that right-sided and left-sided cancers may have different biologies and prognoses [14–17]. In this study, we concentrated on tumors located in the left colon and rectum.

The aim of this study was to investigate the absolute count of T regulatory lymphocytes in the peripheral blood of patients with left-sided colorectal cancer in various stages, and its prognostic significance.

## 2. Materials and Methods

The study group consisted of 94 colorectal cancer patients treated in a single institution between 2007 and 2012. Only patients with tumors located in the rectum or left colon were included. The term left colon was defined as the large intestine, from the left 1/3 of the transverse colon distally. All patients had histologically confirmed disease, were over 18 years old, and had an electively performed surgical procedure. Patients with synchronous right-sided colon cancer or patients with a history of other neoplastic diseases were excluded. Preoperative radiotherapy was used in four of the rectal cancer patients, and two rectal cancer patients received preoperative chemoradiotherapy. All patients had no history of autoimmune diseases or recent infections. The group was composed of 39 women and 55 men, with a mean age of 65.6 (SD 9.8), in varying stages of disease (Table 1).

The surgical procedures were carried out according to oncological guidelines. Due to the changes of the TNM staging systems during the study period, all the specimens were re-staged according to the 7th edition of the TNM. The clinical and pathological data were recorded. Patients received postoperative chemotherapy if indicated. All patients were followed up for at least 5 years, or until death, and dates of death were verified by the census registry office.

**Table 1.** Clinicopathological characteristics of the patients.

Tumor Location	Number of Patients
Left colon	43
Rectum	51
T1	3
T2	15
T3	58
T4	18
N0	42
N1	28
N2	20
Nx	4
M0	73
M1	21
Stage I	15
Stage II	28
Stage III	30
Stage IV	21
Grade 1	27
Grade 2	51
Grade 3	10
Grade not assessed	6
R0	69
R1	3
R2	22

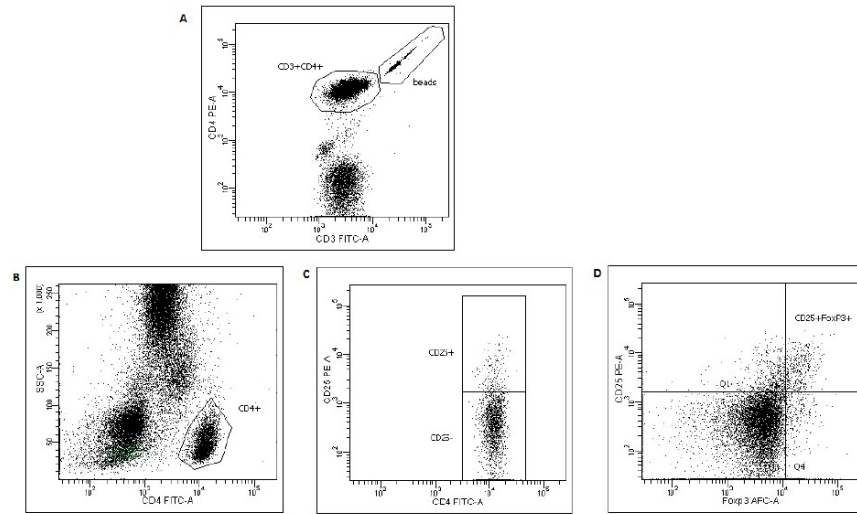
The control group consisted of 21 healthy adult volunteers—9 women and 12 men—with the mean age of 44 (range from 25–55 years).

All patients provided their informed, written consent. The study was approved by the Jagiellonian University Ethical Committee KBET no 86/B/2007 and KBET no 122.6120.128.2015. The study was registered at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), registration number NCT03640572.

Blood samples were collected prior to any interventional procedure in sterile EDTA vacutainers. Cells preparation was started 1–2 h after a blood draw. Peripheral blood samples (100  $\mu$ L) obtained from cancer patients were incubated in TruCount tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) with a monoclonal antibody cocktail: FITC-conjugated anti-CD3 (clone SK7) and PE-conjugated anti-CD4 (clone SK3) (5  $\mu$ L; BD Biosciences) for 30 min at 4 °C. The samples were treated with 400  $\mu$ L FACS Lysing Solution (BD Biosciences), and after erythrocyte lysis, 10,000 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells along with beads were acquired on a FACSCanto flow cytometer and analyzed with FACSDiva Software (BD Biosciences) (Figure 1).

The absolute amounts of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes in the samples were calculated on a basis of bead and lymphocyte counts. Treg cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) were stained in 200  $\mu$ L EDTA peripheral blood samples using the Human Regulatory T Cell Staining Kit (eBiosciences, UK), according to manufacturer's instructions, and acquired on the flow cytometer (clones RPA-T4 and BC96, and for Foxp3 clone PCH101). The absolute counts of Treg were calculated based on the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cell percentages of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells, and the absolute numbers of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells per microliter.

The statistical analysis was conducted with Statistica 13 software (StatSoft, Poland, Krakow), and the distribution of variables was checked using the Kolmogorow–Smirnov test. Variables with normal distribution were compared by means of the t-Student test. Categorical variables and variables without normal distribution were compared by means of the U Mann–Whitney test. The cut-off value of Treg count was established by the ROC method. Survival analysis was performed according to the Kaplan Meier method, and log-rank  $p < 0.05$  was established as statistically significant.



**Figure 1.** Gating strategy and analysis of Treg lymphocytes. Absolute numbers of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes were calculated on a basis of bead numbers (A). During Treg cells analysis, CD4<sup>+</sup> lymphocytes (B) were divided into CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> cells (C), and then Treg cells were determined as CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes (D).

**3. Results**

*3.1. The Count of T Regulatory Lymphocytes in the Peripheral Blood of the Study Group*

The absolute number of Treg in the peripheral blood did not differ significantly between colon cancer patients (median = 6, IQR = 6) and rectal cancer patients (median = 6, IQR = 9); therefore, these locations were not analysed separately. The number of Treg in the entire study group ranged from 1 to 123 per microliter, with a median value of 6.0 and an IQR of 7. The absolute number of Treg in different subgroups, according to tumor characteristics, was analysed (Table 2).

**Table 2.** Characteristics of Treg in the peripheral blood of the study group.

Group	Mean	Median	Min	Max	IQR
Study group	10.35	6.0	1	123	7
Stage I	14.46	9	1	52	8
Stage II	6.82	5	1	123	7.5
Stage III	8.9	6.5	1	37	6
Stage IV	9.4	6	1	43	5
pN0	9.5	5.5	1	52	8
pN1	9.96	6	1	37	9
pN2	7.75	5.5	1	43	5.5
pT1	11.33	12	9	13	4
pT2	12.7	7	1	52	8
pT3	7.8	6	1	37	6
pT4	10.6	6.5	2	123	14
G1	8.5	5	1	45	8
G2	10.2	7	1	123	8
G3	7.7	5	1	21	7



There was a statistically significant difference between Treg amounts in the Ist and IInd TNM stages ( $p = 0.047$ ), but the differences between stage I and III or IV, or between stage I and pooled stages II-IV, were found not to be statistically significant ( $p = 0.52$ ). The pooled stages I and II had similar Treg amounts to stages III and IV.

There was also no statistically significant difference between the number of Treg in pN- and pN+ patients, as well as between pN0, pN1, and pN2 patients.

The absolute number of Treg cells was higher in pT1 and pT2 tumors than in pT3 or pT4, but without statistical significance. Tumor grading (G) did not influence the number of Treg in the peripheral blood of patients.

### 3.2. The Count of T Regulatory Lymphocytes in the Peripheral Blood of Cancer Patients vs. Control Group

The control group consisted of 21 healthy adult volunteers. The mean absolute number of Treg cells in the control group was 14.9, the median value was 12.5, and IQR was 13.

When compared to the entire study group, the Treg amounts in the control group were found to be higher, with statistical significance ( $p = 0.008$ ) (Figure 2).

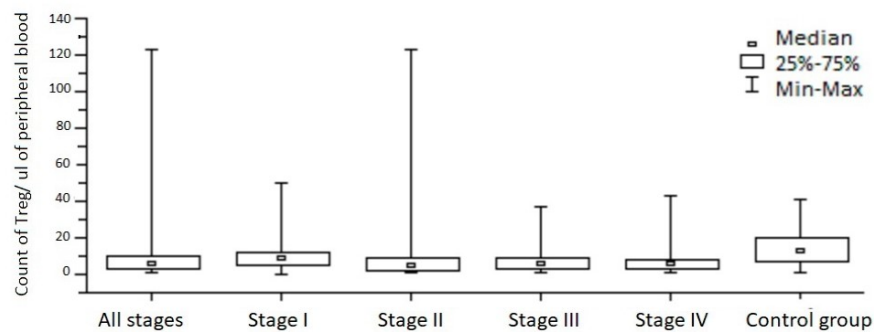


Figure 2. The absolute number of Treg lymphocytes ( $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ) in the peripheral blood of patients with left-sided colorectal cancer and the control group.

There was no statistically significant difference between Treg cell counts in the control group vs. stage I cancer patients. However, again the amount of Treg cells in controls was significantly higher than in patients with stages II and III cancer ( $p = 0.003$  and  $p = 0.018$ ).

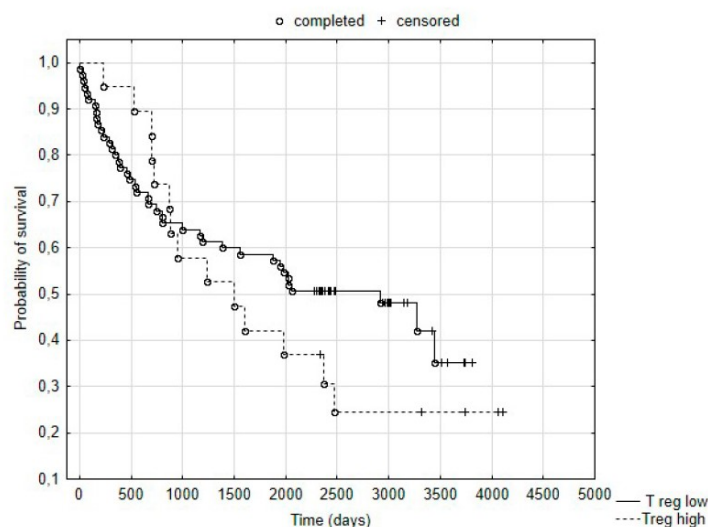
There was no difference between controls and pT1+pT2 patients, but the pT3+pT4 patients had significantly lower Treg counts in their peripheral blood than the control group ( $p = 0.005$ ).

### 3.3. The Impact of T Regulatory Lymphocytes Count in the Peripheral Blood on Survival

To assess the impact of Treg cells in the blood of the study group on survival, an ROC analysis was performed. The cut-off level was set at 13 cells/ $\mu$ L. The subgroup of patients with up to 12 Treg cells were coded as “Treg-low” and those with 13 or more cells as “Treg-high”.

The Kaplan–Meier plot (Figure 3) showed that in the entire study group, the level of Treg cells in the peripheral blood had no influence on survival.

The analysis in TNM stage subgroups also showed no difference in survival between patients with “low” and “high” Treg counts.



**Figure 3.** Probability of survival in “Treg-low” and “Treg-high” groups of left-sided colorectal cancer patients.

#### 4. Discussion

T-regulatory lymphocytes are investigated in cancer patients in several ways. The most common approaches use the identification of Treg cells within peritumoral infiltrate. This provides direct information about the interaction of different cells within the tumor’s microenvironment, and enables their correlation with clinical observations. Another approach investigates the levels of circulating Treg cells in the peripheral blood. Even though the cells in the tumor’s microenvironment are probably more important, circulating Treg cells are most likely involved in the regulation of the immune response to the tumor. As tumor cells spread to other organs through the blood to form metastases, it is possible that Treg cells, which are also circulating in the blood, react with them. While the composition of the peritumoral infiltrate can be analysed only once, the population of Treg cells in the peripheral blood may be examined many times, possibly allowing for cancer monitoring. It would be interesting to assess Treg in both compartments (blood and tumor), but due to limited resources we focused on the blood only.

Our patient population was limited to patients whose tumors were located in the left colon. This is not a weakness of the study, but may be a strength, as our patient population is therefore more homogenous. On the other hand, we cannot simply compare our results with others. Since the method of Treg identification has changed, it is impossible to compare our results with other formerly cited studies. The studies before 2007, and even before 2010, usually addressed T-cells with different characteristics [18,19]. Only the studies that identified Treg as CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> used the same method of cell identification as our study.

We have found that the absolute number of Treg in the peripheral blood of patients with left-sided colorectal cancer was significantly higher in stage I patients than in stage II patients ( $p = 0.047$ ). The difference between stage I and other stages did not reach statistical significance, but there was a tendency for lower Treg counts in stages III and IV than in stage I (Figure S1 supplementary materials). This was not investigated in our previous study [9] due to the small number of colorectal cancer patients. Our finding is potentially contrary to results of Sellitto et al. [20], where a linear relationship between the proportion of Treg within CD4<sup>+</sup> population and the tumor stage was observed. However, our study investigated the absolute count of Treg, which does not always correspond to the mentioned

above proportion. The group of patients in the Italian study was only half the size of our patient group. Another study that investigated the quantity of Treg in the peripheral blood of colorectal cancer patients showed that the amount of Treg cells in less advanced stages (I+II) was lower than in more advanced stages (III+IV) [21], but those authors investigated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, making their data difficult to compare with the data from our study.

We compared the absolute count of Treg cells in cancer patients and the control group. Our control group was smaller and younger than the studied group. This could influence the results. On the other hand, when we assessed Treg count in patients over 60 years vs. younger, we found no difference (data not shown). The count was significantly lower in cancer patients than in healthy controls. This observation is supported by our study in gastric and colorectal cancer patients [9], where the same trend was observed. However, when only colorectal cancer patients were analyzed, no statistically significant difference was detected. This was most probably due to the small number of colorectal cancer patients involved in that study.

In the present study, when compared to the control group, the count of Treg cells in the peripheral blood was similar to stage I. This finding shows that the early stage of colorectal cancer, at least located on the left side, has no impact on the quantity of T regulatory lymphocytes in the peripheral blood. On the other hand, the accumulation of Treg cells has been described in colonic adenomas, the precancerous lesions [22], and interpreted as the involvement of Treg cells at the very early stage of colonic carcinogenesis. This observation describes the population of Treg within the tissue, not in the peripheral blood, and therefore is not fully contrary to our results. Further analysis showed that there is a statistically significant difference between more advanced, but localized, stages and the control group. When the subgroup of patients who received preoperative radio or radiochemotherapy was excluded, the differences remained statistically significant (data not shown). There was no significant difference between controls and stage IV patients. This could be a surprising observation, but a similar phenomenon was described in the study concerning Treg cells in tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients [23]. In that study, Treg cells were increased in stages II and III, but not in stage IV. Authors speculated that the reason may be the Treg migration from tissue into circulation. Such a hypothesis may also clarify our results. The opposite findings were published in a study of 63 colorectal cancer patients, where the Treg cells were investigated in the blood and tumor tissue [24]. Authors found that there was an increase in the quantity of Treg in the blood and tissue of cancer patients in comparison to healthy controls. However, there were only 2 stage IV patients involved in the study, and their analysis was performed in the pooled I+II and III+IV stages. Their conclusion that there is a correlation of Treg quantity in both compartments with tumor stage may not be fully justified. Additionally, the study of Betts et al. suggested that in colorectal cancer patients in stages II and III the number of Treg in the peripheral blood is higher than in healthy controls [25]. However, they used 35 patients only for the blood testing and 7 healthy volunteers. Moreover, the definition of Treg cells was different as they included CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells.

In the final part of the present study, a survival analysis was performed. The ROC analysis method was adopted [26] for establishing the cut-off level. In our patient cohort, we did not find any difference in survival between Treg-high and Treg-low subgroups. We did not find any research directly addressing the issue of circulating Treg cells and survival. There are contradictory data concerning the prognostic value of the density of Treg cells within tumor tissue. A meta-analysis published in 2015, which included eight studies on colorectal cancer patients [27], concluded that the presence of Treg within TIL is a positive prognostic factor.

All mentioned above controversies indicate that there is a need for further, well designed studies with sufficient numbers of patients in subgroups, analyzing Treg importance in various compartments. This may help in improving recently accepted immunotherapy strategies.

## 5. Conclusions

In summary, the results from the current study show that the absolute number of T-regulatory lymphocytes in the peripheral blood of patients with left-sided colorectal cancer was significantly decreased in comparison to healthy controls. When the study group was split into subgroups, the decrease was only found to be significant between the control group and stage II and III patients. In stage I, when the disease is highly localized, the peripheral levels of Treg do not differ much from those in healthy controls. In stages II and III, as the disease progresses, the Treg levels drop significantly in the periphery. In stage IV, the disease becomes systemic, and Treg cell redistribution between compartments occurs. The presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes in the peripheral blood had no impact on survival.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1010-660X/55/6/307/s1>, Figure S1. (Exemplary plots of patients from the control group (A), stage I (B), stage II (C), Stage III (D), and stage IV (E)).

**Author Contributions:** Conceptualization, K.D.-T., R.P., M.S. (Maciej Siedlar), J.B., and A.M.S.; methodology, K.D.-T., J.R., M.S. (Maciej Siedlar), J.B., M.S. (Marek Sierzega), M.L., M.R.-Z., and A.M.S.; software, J.R., R.P., M.L., M.R.-Z., and M.S. (Marek Sierzega); validation, K.D.-T., J.R., R.P., M.S. (Marek Sierzega), J.Z., and A.M.S.; formal analysis, K.D.-T., J.R., R.P., and A.M.S.; investigation, K.D.-T., J.R., R.P., M.S. (Maciej Siedlar), J.B., M.S. (Marek Sierzega), J.Z., and A.M.S.; resources, M.S. (Maciej Siedlar), J.B., and A.M.S.; writing—original draft preparation, K.D.-T., J.R., R.P., M.S. (Maciej Siedlar), J.B., M.S. (Marek Sierzega), J.Z., M.L., M.R.-Z., and A.M.S.; writing—review and editing, K.D.-T., J.R., R.P., M.S. (Maciej Siedlar), J.B., M.S. (Marek Sierzega), J.Z., M.L., M.R.-Z., and A.M.S.; supervision, M.S. (Maciej Siedlar), and A.M.S.; project administration, K.D.-T., J.R., R.P., M.S. (Maciej Siedlar), J.B., M.S. (Marek Sierzega), J.Z., M.L., M.R.-Z., and A.M.S.; funding acquisition, K.D.-T., J.R., R.P., M.S. (Maciej Siedlar), and J.B.

**Funding:** This research was funded by Ministry of Science and Higher Education of Poland Grants 2P05C 001 29 and K/PBW/000421.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Curiel, T.J.; Coukos, G.; Zou, L.; Alvarez, X.; Cheng, P.; Mottram, P.; Evdemon-Hogan, M.; Conejo-Garcia, J.R.; Zhang, L.; Burow, M.; et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 942–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Zhou, Y.; Shao, N.; Aierken, N.; Xie, C.; Ye, R.; Qian, X.; Hu, Z.; Zhang, J.; Lin, Y. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in patients with breast cancer: A meta-analysis. *J. Cancer* **2017**, *8*, 4098–4105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Shen, Z.; Zhou, S.; Wang, Y.; Li, R.L.; Zhong, C.; Liang, C.; Sun, Y. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2010**, *136*, 1585–1595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gabitass, R.F.; Annels, N.E.; Stocken, D.D.; Pandha, H.A.; Middleton, G.W. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 1419–1430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Seminerio, I.; Descamps, G.; Dupont, S.; de Marrez, L.; Laigle, J.A.; Lechien, J.R.; Kindt, N.; Journe, F.; Saussez, S. Infiltration of FoxP3+ Regulatory T Cells is a Strong and Independent Prognostic Factor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* **2019**, *11*, 227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yoshioka, T.; Miyamoto, M.; Cho, Y.; Ishikawa, K.; Tsuchikawa, T.; Kadoya, M.; Li, L.; Mishra, R.; Ichinokawa, K.; Shoji, Y.; et al. Infiltrating regulatory T cell numbers is not a factor to predict patient's survival in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 1258–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhang, X.; Kelaria, S.; Kerstetter, J.; Wang, J. The functional and prognostic implications of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *J. Gastrointest. Oncol.* **2015**, *6*, 307–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Liyanage, U.K.; Moore, T.T.; Joo, H.-G.; Tanaka, Y.; Herrmann, V.; Doherty, G.; Drebin, J.A.; Strasberg, S.M.; Eberlein, T.J.; Goedegebuure, P.S.; et al. Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood

- and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 2756–2761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Szczepanik, A.M.; Siedlar, M.; Sierzega, M.; Goroszeniuk, D.; Bukowska-Strakova, K.; Czupryna, A.; Kulig, J. T-regulatory lymphocytes in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *World J. Gastroenterol.* **2011**, *17*, 343–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  10. Liu, C.; Cheng, H.; Luo, G.; Lu, Y.; Jin, K.; Guo, M.; Ni, Q.; Yu, X. Circulating regulatory T cell subsets predict overall survival of patients with unresectable pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* **2017**, *51*, 686–694. [[CrossRef](#)]
  11. Napolitano, M.; D'Alterio, C.; Cardone, E.; Trotta, A.M.; Pecori, B.; Rega, D.; Pace, U.; Scala, D.; Scognamiglio, G.; Tatangelo, F. Peripheral myeloid-derived suppressor and T regulatory PD-1 positive cells predict response to neoadjuvant short-course radiotherapy in rectal cancer patients. *Oncotarget* **2015**, *6*, 8261–8270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  12. Passardi, A.; Canale, M.; Valgiusti, M.; Ulivi, P. Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  13. Shitara, K.; Nishikawa, H. Regulatory T cells: A potential target in cancer immunotherapy. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2018**, *1417*, 104–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  14. Lim, D.R.; Kuk, J.K.; Kim, T.; Shin, E.J. Comparison of oncological outcomes of right-sided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection: Which side is better outcome? *Medicine* **2017**, *96*, 42. [[CrossRef](#)]
  15. Benedix, F.; Kube, R.; Meyer, F.; Schmidt, U.; Gastinger, I.; Lippert, H. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: Differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis. Colon Rectum.* **2010**, *53*, 57–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  16. Derwinger, K.; Gustavsson, B. Variations in Demography and Prognosis by Colon Cancer Location. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 2347–2350. [[PubMed](#)]
  17. Shen, H.; Yang, J.; Huang, Q.; Jiang, M.J.; Tan, Y.N.; Fu, J.F.; Zhu, L.Z.; Fang, X.F.; Yuan, Y. Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 6470–6478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  18. Curiel, T.J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1167–1174. [[CrossRef](#)]
  19. Takeuchi, Y.; Nishikawa, H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int. Immunol.* **2016**, *28*, 401–409. [[CrossRef](#)]
  20. Sellitto, A.; Galizia, G.; De Fanis, U.; Lieto, E.; Zamboli, A.; Orditura, M.; De Vita, F.; Giunta, R.; Lucivero, G.; Romano, C. Behavior of circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in colon cancer patients undergoing surgery. *J. Clin. Immunol.* **2011**, *31*, 1095–1104. [[CrossRef](#)]
  21. Ling, K.L.; Pratap, S.E.; Bates, G.J.; Singh, B.; Mortensen, N.J.; George, B.D.; Warren, B.F.; Piris, J.; Roncador, G.; Fox, S.B.; et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immun.* **2007**, *7*, 7. [[PubMed](#)]
  22. Hua, W.; Yuan, A.; Zheng, W.; Li, C.; Cui, J.; Pang, Z.; Zhang, L.; Li, Z.; Goll, R.; Cui, G. Accumulation of FoxP3+ T regulatory cells in the tumor microenvironment of human colorectal adenomas. *Pathol. Res. Pract.* **2016**, *212*, 106–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  23. Loddenkemper, C.; Schernus, M.; Noutsias, M.; Stein, H.; Thiel, E.; Nagorsen, D. In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *J. Transl. Med.* **2006**, *4*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  24. Liu, Z.; Huang, Q.; Liu, G.; Dang, L.; Chu, D.; Tao, K.; Wang, W. Presence of FOXP3(+)Treg cells is correlated with colorectal cancer progression. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2014**, *7*, 1781–1785. [[PubMed](#)]
  25. Betts, G.; Jones, E.; Junaid, S.; El-Shanawany, T.; Scurr, M.; Mizen, P.; Kumar, M.; Jones, S.; Rees, B.; Williams, G.; et al. Suppression of tumour-specific CD4+ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut* **2012**, *61*, 1163–1171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  26. Kamarudin, A.N.; Cox, T.; Kolamunnage-Dona, R. Time-dependent ROC curve analysis in medical research: Current methods and applications. *BMC Med. Res. Methodol.* **2017**, *17*, 53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  27. Shang, B.; Liu, Y.; Jiang, S.-J.; Liu, Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## 11. Oświadczenia współautorów

Kraków, dnia 24.02.2020

Lek. Katarzyna Dyląg-Trojanowska

.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „**The impact of bone marrow disseminated tumor cells on survival and disease progression in left-sided colorectal cancer patients**”, autorów Radosław Pach, Katarzyna Dyląg-Trojanowska, Jarosław Baran, Antoni Czupryna, Maciej Siedlar, Justyna Zybaczyńska, Philip H. Brandt, Antoni M. Szczepanik wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych polegał na opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Katarzyna Dyląg-Trojanowska  
.....

Kraków, dnia 24.02.2020

Dr n med. Radosław Pach

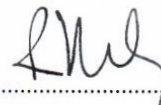
.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The impact of bone marrow disseminated tumor cells on survival and disease progression in left-sided colorectal cancer patients**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pisanie i poprawienie wersji pierwotnej manuskryptu, przygotowanie wersji finalnej publikacji oraz pozyskanie i analiza statystyczna danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

Dr hab. n med. Jarosław Baran, prof. UJ

.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The impact of bone marrow disseminated tumor cells on survival and disease progression in left-sided colorectal cancer patients**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: poprawienie wersji pierwotnej i przygotowanie wersji finalnej publikacji oraz nadzorowanie całego projektu i procedur przeprowadzanych dla uzyskanie statusu szpiku kostnego oraz pozyskanie finansowania projektu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

.....  
  
(podpis współautora)



Kraków, dnia 24.02.2020

Prof. dr hab. n med. Maciej Siedlar

.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The impact of bone marrow disseminated tumor cells on survival and disease progression in left-sided colorectal cancer patients**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: poprawienie wersji pierwotnej i przygotowanie wersji finalnej publikacji oraz nadzorowanie całego projektu i procedur przeprowadzanych dla uzyskanie statusu szpiku kostnego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

Dr hab. n med. Antoni M. Szczepanik prof. UJ  
.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The impact of bone marrow disseminated tumor cells on survival and disease progression in left-sided colorectal cancer patients**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pisanie i poprawienie wersji pierwotnej manuskryptu, przygotowanie wersji finalnej publikacji oraz pozyskanie i analiza statystyczna danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....

(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

**Lek. Katarzyna Dyląg-Trojanowska**

.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „**The prognostic significance of HLA-A2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers**” autorów: Katarzyna Dyląg-Trojanowska , Radosław Pach , Maciej Siedlar, Jarosław Baran , Justyna Zybaczyńska, Antoni M. Szczepanik wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych polegał na opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

*Katarzyna Dyląg-Trojanowska*

Kraków, dnia 24.02.2020

Dr n med. Radosław Pach


.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The prognostic significance of HLA-A2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pisanie i poprawienie wersji pierwotnej manuskryptu, przygotowanie wersji finalnej publikacji oraz analiza statystyczna danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

Prof. dr hab. n med. Maciej Siedlar

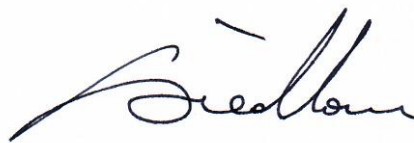
.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The prognostic significance of HLA-A2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: poprawienie wersji pierwotnej i przygotowanie wersji finalnej publikacji oraz nadzorowanie całego projektu i procedur przeprowadzanych dla uzyskanie statusu HLAA2.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

Dr hab. n med. Jarosław Baran, prof. UJ

.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The prognostic significance of HLA-A2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: poprawienie wersji pierwotnej i przygotowanie wersji finalnej publikacji oraz nadzorowanie całego projektu i procedur przeprowadzanych dla uzyskanie statusu HLAA2 oraz pozyskanie finansowania projektu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

Dr hab. n med. Antoni M. Szczepanik prof. UJ

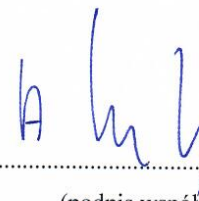
.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The prognostic significance of HLA-A2 expression on somatic cells in patients with left-sided colon and rectal cancers**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: pisanie i poprawienie wersji pierwotnej manuskryptu, przygotowanie wersji finalnej publikacji oraz pozyskanie i analiza statystyczna danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

**Lek. Katarzyna Dyląg-Trojanowska**

.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji „**T regulatory CD4+CD25+FoxP3+ lymphocytes in the peripheral blood of left sided colorectal cancer patients**”, autorów: Katarzyna Dyląg-Trojanowska, Joanna Rogala, Radosław Pach, Maciej Siedlar, Jarosław Baran, Marek Sierżęga, Justyna Zybaczyńska, Marzena Lenart, Magdalena Rutkowska-Zapała i Antoni M. Szczepanik wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych polegał na opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

*Katarzyna Dyląg-Trojanowska*  
.....



Kraków, dnia 24.02.2020

**Lek Joanna Rogala**

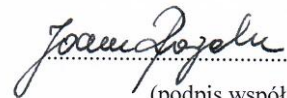
.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**T regulatory CD4+CD25+FoxP3+ lymphocytes in the peripheral blood of left sided colorectal cancer patients**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: opracowanie metodologii, oprogramowania walidacja, analiza i interpretacja danych, pisanie, administracja projektem i pozyskanie jego finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

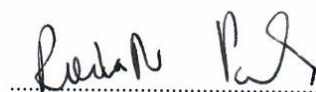
Dr n. med. Radosław Pach  
.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**T regulatory CD4+CD25+FoxP3+ lymphocytes in the peripheral blood of left sided colorectal cancer patients**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: opracowanie koncepcji, oprogramowania, , walidacja, analiza i interpretacja danych, pisanie, recenzja i edycja , administracja projektem i pozyskanie jego finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

Prof. dr hab. n med. Maciej Siedlar


.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**T regulatory CD4+CD25+FoxP3+ lymphocytes in the peripheral blood of left sided colorectal cancer patients**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: opracowanie koncepcji, metodologii, pisanie, recenzja i edycja, administracja projektem i pozyskanie jego finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020

Dr hab. n med. Jarosław Baran, prof. UJ


.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**T regulatory CD4+CD25+FoxP3+ lymphocytes in the peripheral blood of left sided colorectal cancer patients**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: opracowanie koncepcji, metodologii, zapewnienie zasobów, pisanie, recenzja i edycja , administracja projektem i pozyskanie jego finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

.....  
  
(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.02.2020


Dr hab. n med. Antoni M. Szczepanik prof. UJ  
.....  
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**T regulatory CD4+CD25+FoxP3+ lymphocytes in the peripheral blood of left sided colorectal cancer patients**”, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: opracowanie koncepcji, metodologii, zapewnienie zasobów, walidacja, analiza formalna, pisanie, recenzja i edycja , nadzór i administracja projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. Katarzynę Dyląg-Trojanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Katarzyny Dyląg-Trojanowskiej przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

  
.....  
(podpis współautora)