

ارتباط بیان گیرنده‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده-۱ در بافت تومورال روده‌ی بزرگ با ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناسی بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ

زهرا مختاری^۱، مرضیه رضائی^۲، محمدحسین صانعی^۳، زهرا فقیه^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: فعالیت سیستم ایمنی توسط نقاط بازرسی ایمنی، انواع مهارتی و تحریکی، تنظیم می‌گردد. گیرنده‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده-۱ (PD-1) از نقاط بازرسی مهارتی است که افزایش بیان آن، منعکس‌کننده‌ی فرسودگی سلول‌های ایمنی می‌باشد. اما هنوز اثر آن در پیش‌آگهی سرطان روده‌ی بزرگ به خوبی مشخص نیست. هدف از این مطالعه، بررسی اثر بیان این نشانگر در پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ برحسب محل اولیه‌ی تومور می‌باشد.

روش‌ها: این مطالعه‌ی مقطعی، در طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ انجام شد. تعداد ۱۳۶ بیمار مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ که در بیمارستان الزهراهای اصفهان بین سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۶ تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، انتخاب و به صورت گذشته‌نگر مورد ارزیابی قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نمونه‌های بافتی تهیه شده از بیماران برای نشانگر PD-1 انجام و بیان این نشانگر در مرکز و حاشیه‌ی تهاجمی تومور تعیین گردید. داده‌های مربوط به بقا و تاریخ مرگ بیماران از طریق پرونده‌ی بیمار و تأیید از طریق ثبت احوال تکمیل شد.

یافته‌ها: بیان بالای PD-1 در حاشیه‌ی تهاجمی با مرحله‌ی T پایین‌تر (T1/2) در تومورهای سمت چپ، مرحله‌ی M پایین (M0) در تومورهای سمت راست، عدم متاستاز در در تومورهای سمت راست و چپ، اندازه‌ی تومور بزرگتر (≤ 5 سانتی‌متر) در تومورهای سمت راست، ارتباط معنی‌دار داشت. بیان این نشانگر در هیچ‌کدام از نواحی تومور ارتباط معنی‌داری با بقا بیماران نداشت.

نتیجه‌گیری: بیان بالای PD-1 با مراحل پایین‌تر سرطان روده‌ی بزرگ در ارتباط می‌باشد اما به نظر می‌رسد این مولکول، نشانگر خوبی برای پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ نمی‌باشد.

واژگان کلیدی: سرطان روده‌ی بزرگ؛ پروتئین‌های نقاط کنترل ایمنی؛ ایمونوهیستوشیمی؛ پیش‌آگهی؛ پروتئین PD1

ارجاع: مختاری زهرا، رضائی مرضیه، صانعی محمدحسین، فقیه زهرا. ارتباط بیان گیرنده‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده-۱ در بافت تومورال روده‌ی بزرگ

با ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناسی بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۰۶): ۳۴-۲۷

به دلیل عدم قابلیت روش‌های طبقه‌بندی موجود در پاسخگویی به نیازهای مربوط به تشخیص و درمان، ارائه‌ی روش‌های جدیدتر برای دسته‌بندی جامع‌تر و کارآتر بیماران مبتلا به CRC از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مثلاً بر طبق روش‌های موجود بیمارانی که در یک رده قرار می‌گیرند، پیش‌آگهی متفاوتی دارند که این امر منجر به ایجاد چالش‌هایی در امر مدیریت بیماری می‌شود (۳).

شکل‌گیری و پیشرفت تومور تحت تأثیر ریزمحیط پیرامون تومور

مقدمه

سرطان روده‌ی بزرگ (Colorectal cancer) CRC، سومین سرطان شایع در جهان است و درصد مرگ و میر بالایی دارد (۱). CRC یک بیماری ناهمگن بوده و بر اساس محل اولیه‌ی شکل‌گیری تومور در روده، بیماران دارای مسیرهای مولکولی، ایمنی‌زایی، بقا و پیش‌آگهی متفاوتی هستند (۲). این تفاوت‌ها، تعیین پیش‌آگهی و انتخاب درمان مناسب در این بیماران را با چالش‌هایی روبرو کرده است. در هر حال

۱- دانشجوی پزشکی، گروه ایمنولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشیار، موسسه تحقیقات سرطان (ICR)، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مرضیه رضائی؛ استادیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

درمان بر پایه‌ی مهار PD-1 و PD-L1 در چند بدخیمی مانند ملانوما و CRC موفق بوده و توانسته عملکرد سلول‌های T را برگرداند، اما همه‌ی بیماران به این نوع درمان پاسخ نمی‌دهند (۱۴). امروزه PD-1 و PD-L1 علاوه بر اینکه به عنوان اهداف درمانی در بسیاری از سرطان‌ها شناخته می‌شوند، به عنوان عواملی برای تعیین پیش‌آگهی تومور مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۵-۱۷). تأثیر این گیرنده در عملکرد سلول‌های T و پیش‌آگهی تومور هنوز مبهم و نامشخص است؛ به طوری که برخلاف عملکرد مهارتی شناخته شده برای PD-1، بیان این نشانگر در بدخیمی‌هایی همچون سرطان معده و CRC با بقا بهتر بیماران مرتبط بوده است (۱۸، ۱۹). بنابراین، با وجود عملکرد مهارتی این نشانگر و اهمیت مهار آن در درمان سرطان، در زمینه‌ی اهمیت و نقش آن در تعیین پیش‌آگهی CRC اطلاعات متناقضی وجود دارد (۱۶، ۲۰-۲۳).

در این مطالعه، ما به بررسی ارتباط بیان PD-1 در بافت توموری بیماران مبتلا به CRC با ویژگی‌های بالینی، آسیب‌شناسی و بقا بیماران پرداخته‌ایم.

روش‌ها

این مطالعه به صورت مقطعی در طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در گروه ایمنی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گردید. در این مطالعه، ۱۳۶ بیمار مبتلا به CRC که بین سال‌های ۱۳۹۲-۹۵ در بیمارستان الزهرا(س) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، بر اساس اطلاعات موجود در پرونده‌ی بالینی انتخاب شدند و به صورت گذشته‌نگر مورد مطالعه قرار گرفتند. این بیماران قبل از جراحی تحت شیمی‌درمانی قرار نگرفته بودند و سابقه‌ی سرطان در روده بزرگ یا سایر نقاط بدن و همچنین سابقه‌ی بیماری‌های خودایمنی، نقص ایمنی و آلرژی نداشتند. اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) بیماران مورد مطالعه که در کتابخانه‌ی پاتولوژی موجود بود، توسط یک پاتولوژیست با تجربه جهت تأیید اطلاعات آسیب‌شناسی بیماران و انتخاب بهترین اسلاید که به‌طور هم‌زمان حاوی مرکز و حاشیه تومور باشد، مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت بلوک بافتی منطبق با بهترین اسلایدها از همان کتابخانه تهیه و برای رنگ‌آمیزی بافتی آماده گردید. داده‌های مربوط به بقا و تاریخ مرگ بیماران از طریق پرونده‌ی بیمار و تأیید از طریق ثبت احوال تکمیل شد.

به منظور رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی ابتدا برش‌های چهار میکرومتری از بلوک‌های بافتی پارافینه‌ی فیکس شده با فرمالین تهیه و روی اسلاید پوشش داده شده با پلی-ال-لیزین تثبیت گردید. برش‌های بافتی پارافینه در طول شب در فور با دمای ۴۵ درجه‌ی

(Tumor microenvironment) قرار دارد. از اجزاء مهم اطراف سلول‌های توموری در TME، سلول‌های ایمنی و ترکیبات تولید شده توسط این سلول‌ها می‌باشند (۴). وضعیت سیستم ایمنی در TME شامل نوع، تراکم و محل قرارگیری سلول‌های ایمنی در حاشیه و مرکز تومور و همچنین عملکرد آن‌ها از عوامل مهم در پیشرفت تومور محسوب می‌گردد. چنانکه در بسیاری از انواع تومورها مشخص شده است، تعداد بالای سلول‌های T در محیط تومور با پیش‌آگهی بهتر بیماری در ارتباط می‌باشد (۵).

در TME، سلول‌های ایمنی نفوذیافته طیف گسترده‌ای از وضعیت ناکارآمدی را نشان می‌دهند که توسط سیگنال‌های سرکوب‌کننده در TME شکل می‌گیرد (۶). نقش سلول‌های ایمنی در رشد و پیشرفت تومور متنوع است و وابسته به مولکول‌ها و لیگاندهایی که طی مراحل تکامل سلولی و سیگنال‌های دریافت‌شده از محیط بیان می‌کنند، متفاوت است (۷). افزایش بیان نقاط بازرسی ایمنی (ICPs) یکی از مشخصه‌های بارز TME است که می‌تواند منجر به اختلال عملکرد سلول‌های ایمنی گردد (۸).

یکی از عوامل مؤثر در تنظیم عملکرد سلول‌های ICP، Tها هستند که دارای انواع مهارتی و تحریکی می‌باشند (۹). در زمینه‌ی تومورهای مختلف نشان داده شده است که بیان ICPهای مهارتی بر سطح سلول‌های T نفوذ کرده به محیط تومور افزایش یافته که این فزونی بیان همراه با فنوتیپ غیرعملکردی یا فرسوده (Exhausted) در این سلول‌ها است (۱۰). امروزه این نشانگرها به عنوان اهداف درمانی و عواملی برای تعیین پیش‌آگهی در انواع سرطان‌ها از جمله CRC مورد توجه قرار گرفته‌اند.

گیرنده‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده-۱ (Programed death protein 1) PD-1 یک ICP مهارتی متعلق به خانواده بزرگ ایمونوگلوبولین‌ها (Immunoglobulin superfamily) است که در سطح سلول‌های T فعال و تنظیمی (Regulatory T cells) (Treg)، سلول‌های B، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های NK و سلول‌های دندریتیک (Dendritic cells) DCs بیان می‌شود (۱۱). مهم‌ترین لیگاندهای این گیرنده شامل PD-L1 و PD-L2 می‌باشد (۱۲).

در بسیاری از سرطان‌ها، PD-1 بر سطح درصد زیادی از لئوسیت‌های نفوذ کرده به محیط تومور (Tumor infiltrating lymphocytes) TIL بیان می‌شود. در میان TILهای CD4⁺، بیان افزایش یافته PD-1 غالباً در سلول‌های Treg مشاهده می‌شود؛ که نشان‌دهنده‌ی وضعیت فعال این سلول‌ها است. حضور این سلول‌های فعال نشان می‌دهد که ریزمحیط تومور در حالت سرکوب‌کننده‌ی سیستم ایمنی قرار دارد. در مقابل بیان افزایش یافته‌ی PD-1 در TILهای CD8⁺ نشان‌دهنده‌ی وضعیت آن‌ترزیک یا فرسودگی این سلول‌ها می‌باشد (۱۳). هرچند که

$P < 0/05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصات بالینی و آسیب‌شناسی بیماران مبتلا به CRC. پس از ارزیابی‌های بالینی و آسیب‌شناسی ۱۳۶ بیمار مبتلا به CRC، وارد این مطالعه شدند. اطلاعات بالینی و آسیب‌شناسی بیماران در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناسی بیماران وارد شده در مطالعه

ویژگی بیماران	تعداد (درصد)	میانگین \pm انحراف معیار
جنس		
مرد	۸۳ (۶۱)	
زن	۵۳ (۳۹)	
سن		$62/35 \pm 14/102$
> 63	۶۵ (۴۷/۸)	
≤ 63	۷۱ (۵۲/۲)	
سمت تومور		
سمت راست	۵۶ (۴۱/۲)	
سمت چپ	۷۶ (۵۵/۹)	
نامشخص	۴ (۲/۹)	
اندازه‌ی تومور		$5/56 \pm 2/47 (1-15)$
> 5	۵۶ (۴۱/۲)	
≤ 5	۷۸ (۵۷/۴)	
نامشخص	۲ (۱/۵)	
مرحله‌ی T		
T1	۴ (۳)	
T2	۴۳ (۳۱/۶)	
T3	۷۲ (۵۲/۹)	
T4	۱۷ (۱۲/۵)	
مرحله‌ی N		
N0	۹۰ (۶۶/۲)	
N1	۲۹ (۲۱/۳)	
N2	۱۷ (۱۲/۵)	
مرحله‌ی M		
M0	۱۲۴ (۹۱/۲)	
M1	۱۲ (۸/۸)	
مرحله‌ی TNM		
I	۳۸ (۲۸)	
II	۴۶ (۳۳/۸)	
III	۴۰ (۲۹/۴)	
IV	۱۲ (۸/۸)	
متاستاز (در زمان جراحی یا بعد از جراحی)		
منفی	۸۹ (۶۵/۴)	
مثبت	۳۴ (۲۵)	
نامشخص	۱۳ (۹/۶)	
وضعیت بقا		
زنده	۷۹ (۵۸/۱)	
مرده	۵۷ (۴۱/۹)	

ساختی‌گرا قرار داده شدند، سپس در زایلین (مرک، آلمان) پارافین‌زدایی شدند، پس از آن در اتانول با غلظت کاهشی (مرک، آلمان) هیدراته شدند. به منظور بازیابی آنتی‌ژن هدف، اسلایدها در محفظه‌ی حاوی بافر Tris-EDTA قرار داده شد و در دما و فشار بهینه شده به مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفتند ($pH = 9$). برای خنثی‌سازی فعالیت پراکسیداز درونی و کاهش رنگ غیراختصاصی، اسلایدها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه با یک تا دو قطره از معرف مهارکننده‌ی پراکسیداز (مستر دیاگنوزتیک، اسپانیا) انکوبه شدند. سپس اسلایدها با آنتی‌بادی ضد PD-1 انسانی (۱:۱۵۰، سیناپتوک، ایران) در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. رنگ‌آمیزی ایمنی با استفاده از کیت تشخیصی (مستر دیاگنوزتیک، اسپانیا) انجام شد. به این ترتیب که پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون با یک تقویت‌کننده‌ی آنتی‌بادی اصلی، اسلایدها به مدت ۴۰ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه (Master Polymer Plus HRP) در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس محلول دی‌آمینو بنزیدین (DAB (Diaminobenzidine) به عنوان سوبسترا اضافه شد. در نهایت، مقاطع تحت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین، آبگیری و تثبیت نهایی با اتلان (مرک، آلمان) قرار گرفتند. در تمام مراحل برش‌های بافت لوزه به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

جهت تعیین درصد بیان نشانگرهای هدف، اسلایدها توسط دو پاتولوژیست با تجربه که اطلاعی از نتایج بالینی بیماران نداشتند، به صورت جداگانه به این ترتیب بررسی شد:

ابتدا اسلاید مربوط به هر بیمار با بزرگ‌نمایی $\times 100$ بررسی و سه ناحیه‌ی نرمال، حاشیه‌ی تهاجمی (IM (Invasive margin) و مرکز تومور (Center of the tumor) CT مشخص شدند. سپس هر ناحیه با بزرگ‌نمایی $\times 100$ بررسی و منطقه‌ای که بیانگر متوسط بیان در آن ناحیه بود، انتخاب گردید. در نهایت درصد بیان سلول‌های بیان‌کننده‌ی PD-1 در بافت مشخص گردید. این درصد بیان نمایانگر نسبت نفوسیت‌های نفوذ کرده به محیط تومور دارای بیان مثبت PD-1 به کل سلول‌های استرومای تومور می‌باشد. همچنین پاتولوژیست‌ها، بیان در هر ناحیه‌ی بافت را بر اساس شدت رنگ‌پذیری در چهار طبقه ۰ (منفی)، ۱+، ۲+، ۳+ دسته‌بندی کردند.

تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۴ (version 24, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام گردید. ارتباط بیان بالا یا پایین PD-1 با ویژگی‌های کیفی بالینی و آسیب‌شناسی توسط آزمون‌های Chi-square یا Fisher's exact tests انجام گردید. بقا کلی (Overall survival) OS از زمان جراحی تا زمان مرگ بیماران تعریف شد. برای آنالیز تک متغیره و چند متغیره بقا از مدل Cox-regression استفاده گردید. تنها عواملی که در آنالیز تک متغیره داشتند ($P < 0/1$)، در آنالیز چند متغیره وارد شدند. در تمام بررسی‌ها

تومورهای سمت چپ، بیان بالای PD-1 با مرحله‌ی T پایین‌تر ($P = 0/023$)، عدم متاستاز ($P = 0/01$) ارتباط معنی‌داری نشان داد. **ارتباط بیان PD-1 و بقاء بیماران:** میانگین مدت زمان پیگیری بیماران در این مطالعه، $830/45 \pm 1622/6$ (میانگین \pm انحراف معیار) روز بود. در طول دوره‌ی پیگیری تا آبان ماه ۱۴۰۰، ۵۷ نفر (۴۱/۹ درصد) از بیماران فوت کرده بودند. آنالیز Cox-regression تک متغیره برای پیدا کردن ارتباط بیان PD-1 و بقاء انجام گردید. بیان PD-1 ارتباط معنی‌داری با OS نشان نداد (شکل ۲).

به منظور ارزیابی ارتباط بیان نشانگر هدف بر OS برحسب محل تومور اولیه، آنالیز OS بعد از گروه‌بندی بیماران بر اساس محل تومور انجام گردید. که در ارتباط بیان PD-1 و OS در هیچ کدام از زیر گروه‌های چپ و راست معنی‌دار نشد.

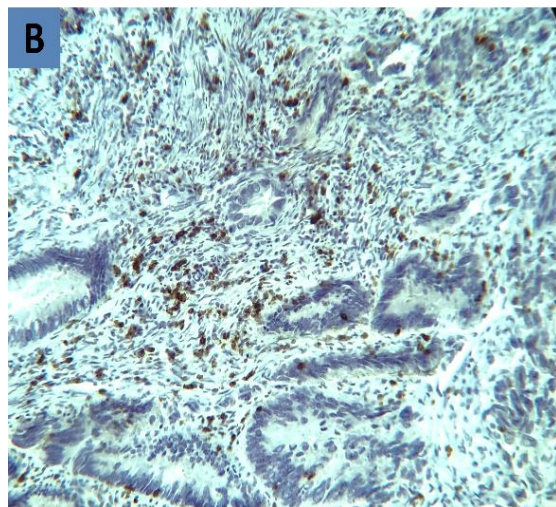
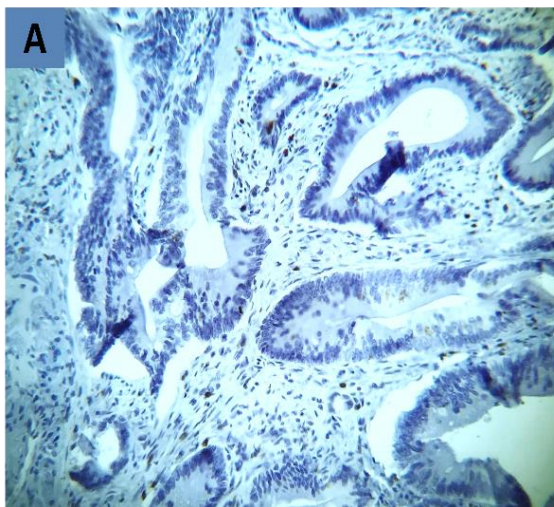
بحث

مطالعه‌ی حاضر، برای اولین بار، بیان PD-1 را در حاشیه‌ی تهاجمی و مرکز تومور بیماران مبتلا به CRC به تفکیک محل تومور اولیه می‌سنجد، تنها یک مطالعه در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم بیان PD-1 را در مرکز و حاشیه‌ی تهاجمی تومور به طور جداگانه بررسی کرده و نشان داده است که بیان بالای این نشانگر در هر دو ناحیه‌ی تومور با پیش‌آگهی ضعیف‌تر این بیماران مرتبط می‌باشد (۲۵). در این مطالعه، بیان بالای PD-1 در حاشیه‌ی تهاجمی با مراحل T پایین‌تر ($T1/2$) در تومورهای سمت چپ، مرحله‌ی MO در تومورهای سمت راست، عدم متاستاز در تومورهای سمت راست و چپ و اندازه‌ی تومور بیشتر در تومورهای سمت راست مرتبط می‌باشد.

میانگین سنی بیماران در زمان تشخیص ۶۲/۳۵ سال بود. در این مطالعه، بیماران برحسب محل تومور در دو گروه تومورهای سمت راست و چپ روده‌ی بزرگ قرار گرفتند. مراحل بالینی بیماری مطابق با معیارهای TNM system (American Joint Committee on Cancer) (AJCC) تعریف شد (۲۴). بر این اساس، بیشتر بیماران به ترتیب در مرحله‌ی II TNM (۳۳/۸ درصد) و III TNM (۲۹/۴ درصد) بوده و در زمان جراحی فاقد متاستاز دور دست (MO) (۹۱/۲ درصد) بودند.

ارزیابی بیان PD-1 و تعیین الگوی بیان در نواحی مختلف بافت در جمعیت کلی و برحسب محل تومور اولیه: بعد از رنگ‌آمیزی اختصاصی بافت، اسلایدها توسط دو پاتولوژیست بررسی و درصد و شدت بیان PD-1 در مرکز (CT) و حاشیه‌ی تهاجمی تومور (IM) تعیین گردید. بیماران بر اساس درصد و شدت بیان در هر ناحیه از بافت به دو گروه دارای بیان بالا و پایین تقسیم شدند (شکل ۱). آنالیزها نشان دادند، ۵۳ نمونه از ۱۳۶ بیمار در مرکز تومور (۳۹ درصد) و در ۷۲ نمونه از ۱۳۶ بیمار در حاشیه‌ی تهاجمی تومور (۵۳/۳ درصد) بیان بالایی از PD-1 دارند. اطلاعات مربوط به بیان بالا و پایین این نشانگر برحسب محل اولیه‌ی تومور در جدول ۲ به طور کامل ارائه شده است.

ارتباط بیان PD-1 و ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناسی بیماران برحسب محل اولیه‌ی تومور: بیماران بر اساس محل اولیه‌ی تومور آن‌ها (چپ و راست) طبقه‌بندی و ارتباط بیان PD-1 با ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناسی مختلف ارزیابی شد. بر این اساس در تومورهای سمت راست، بیان بالای PD-1 با اندازه‌ی بزرگتر تومور ($P \leq 0/027$)، مرحله‌ی M پایین‌تر (MO) ($P = 0/014$) و عدم متاستاز ($P = 0/047$) ارتباط معنی‌داری نشان داد. در



شکل ۱. رنگ‌آمیزی اختصاصی بافت سرطان روده بزرگ برای شاخص PD-1. (A) مقطعی از بافت با بیان پایین (B) مقطعی از بافت با بیان بالا

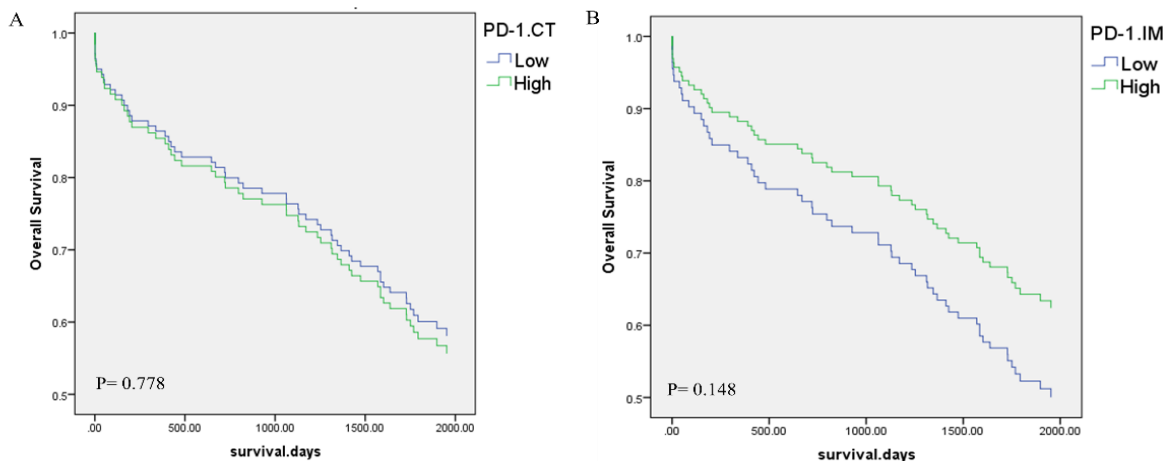
جدول ۲. ارتباط بیان PD-1 در مرکز (CT) و حاشیه‌ی تهاجمی تومور (IM) تومور با ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناسی برحسب محل تومور اولیه

ویژگی‌ها	سمت چپ				سمت راست				n
	PD-1-CT		PD-1-IM		PD-1-CT		PD-1-IM		
	بیان بالا	بیان پایین	بیان بالا	بیان پایین	بیان بالا	بیان پایین	بیان بالا	بیان پایین	
تعداد کلی	۳۶	۴۰	۳۵	۲۰	۳۱	۴۵	۲۰	۳۶	
جنس									
مرد	۲۴	۲۳	۲۲	۱۰	۲۱	۲۶	۱۰	۱۲	۰/۴۱۱
زن	۱۲	۱۷	۱۳	۱۰	۱۰	۱۹	۱۰	۸	
سن									
۶۳ <	۱۶	۲۲	۱۵	۱۱	۱۶	۲۲	۱۱	۱۱	۰/۳۵۸
۶۳ ≥	۲۰	۱۸	۲۰	۹	۱۵	۲۳	۹	۹	
اندازه‌ی تومور									
< ۵	۱۷	۱۸	۸	۱۰	۱۱	۲۴	۸	۶	۰/۸۴۶
≥ ۵	۱۹	۲۲	۲۷	۹	۲۰	۲۱	۲۰	۱۴	
نامشخص									
مرحله T									
T1/T2	۱۷	۹	۱۴	۶	۱۴	۱۲	۱۴	۸	۰/۰۲۳ ^o
T3/T4	۱۹	۳۱	۲۱	۱۴	۱۷	۳۳	۱۴	۱۲	
مرحله M									
M0	۲۳	۳۵	۳۵	۱۶	۲۸	۴۰	۳۵	۲۰	۰/۷۱۵
M1	۳	۵	۰	۴	۳	۵	۰	۰	
مرحله TNM									
I/II	۲۴	۲۱	۲۵	۱۰	۲۰	۲۵	۲۵	۱۱	۰/۲۱
III/IV	۱۲	۱۹	۱۰	۱۰	۱۱	۲۰	۱۰	۹	
متاستاز									
منفی	۲۶	۱۹	۲۸	۱۱	۲۱	۲۴	۲۸	۱۶	۰/۰۱ ^o
مثبت	۵	۱۶	۵	۸	۵	۱۶	۵	۴	
نامشخص	۵	۵	۲	۱	۵	۵	۲	۰	
بقا									
زنده	۲۰	۲۰	۲۵	۱۲	۱۶	۲۴	۲۵	۱۴	۰/۶۲۸
مرده	۱۶	۲۰	۱۰	۸	۱۵	۲۱	۱۰	۶	

^o: از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.

مبتلا به CRC با مرحله‌ی TNM III، یک عامل پیش‌آگهی مستقل برای OS و RFS کمتر می‌باشد (۲۲). درحالی‌که Li و همکاران نشان دادند که بیان بالای PD-1 در TILها، یک عامل پیش‌آگهی مستقل برای OS و DFS بهتر در بیماران مبتلا به CRC می‌باشد (۱۹).
Bertsson و همکاران نشان دادند که بیان بالای PD-1 در سلول‌های ایمنی نفوذ کرده به تومور با OS بهتر بیماران مبتلا به CRC مرتبط است و این ارتباط، به محل تومور بستگی دارد (۱۶). این مشاهدات ارزش پیش‌آگهی PD-1 در CRC را زیر سؤال می‌برد. نتایج ما نشان داد که بیان بالای PD-1 در حاشیه‌ی تهاجمی تومور با OS بهتر مرتبط می‌باشد؛ هرچند که این ارتباط معنی‌دار نبود.

بنابراین بیان PD-1 به ویژه در حاشیه‌ی تهاجمی، در مراحل پایین‌تر بیشتر است. با توجه به کم بودن بیان این گیرنده در مراحل پیشرفته‌ی CRC احتمالاً هدف قرار دادن آن در مراحل اولیه کارآمدی بیشتری داشته باشد. این یافته‌ها با نتایج Saleh و همکاران که نشان دادند، بیان ژن PD-1 در بافت تومور و در گردش خون بیماران در مراحل اولیه‌ی CRC بیشتر است؛ مطابقت داشت (۲۶).
تاکنون چندین مطالعه ارتباط بیان PD-1 با پیش‌آگهی بیماران مبتلا به CRC را بررسی کرده‌اند، اما نتایج این مطالعات متفاوت و متناقض هستند (۲۱-۲۳).
Zengin و همکاران نشان دادند که بیان بالای PD-1 در بیماران



شکل ۲. منحنی کاپلان مایر بقاء کلی (OS). A: ارتباط بیان مولکول PD-1 در مرکز (CT) تومور با بقاء کلی بیماران. B: ارتباط بیان مولکول PD-1 در حاشیه‌ی تهاجمی (IM) تومور با بقاء کلی بیماران

نتیجه‌گیری

تفاوت در مسیرهای مولکولی در قسمت‌های مختلف روده و در نتیجه تفاوت عملکردی تومورهای این نواحی، امری اثبات شده می‌باشد. لذا در بررسی ارتباط بیان نشانگرهای ایمنی مثل PD-1 با پیش‌آگهی و ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناسی در بیماران مبتلا به سرطان رودی بزرگ، باید به محل تومور اولیه توجه شود. این مسأله از نظر تشخیصی و بالینی حائز اهمیت است چرا که در مدیریت و برنامه‌ریزی‌های درمانی از جمله تجویز ایمونوتراپی، کمک‌کننده خواهد بود. بر اساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، بیان PD-1 در نواحی مختلف تومور دارای ارتباط متفاوتی با پیش‌آگهی بیماران می‌باشد که می‌تواند با ویژگی‌ها و تفاوت‌های TME در هر ناحیه توضیح داده شود. این یافته باید در مطالعات آتی بیشتر مورد ارزیابی قرار گیرد تا این تفاوت‌ها تأیید و دلیل آن‌ها مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد با شماره‌ی ۳۹۸۸۹۹، مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

ارتباط بیان بالای PD-1 با مراحل پایین‌تر CRC و OS بهتر این بیماران با تصور ما از PD-1 به عنوان یک گیرنده‌ی مهارتی و مشخصه‌ی فرسودگی سلول‌های T در تضاد می‌باشد. با توجه به پایین بودن بیان PD-L1 در تومورهای CRC می‌توان نتیجه گرفت که در غیاب اتصال PD-1 به لیگاند خود، افزایش بیان این نشانگر منعکس‌کننده‌ی عملکرد مناسب و افزایش یافته‌ی سلول‌های T می‌باشد (۲۷). همچنین مطالعات اخیر نشان داده‌اند که برخلاف سلول‌های T بکری که در اثر اتصال PD-1 به لیگاند خود مهار می‌شوند، سلول‌های T با فنوتیپ‌های خاطره‌ای مرکزی و عملکردی در اثر این اتصال تکثیر بیشتری را نشان می‌دهند. بنابراین اثر PD-1 در زیرگروه‌های مختلف سلول T متفاوت است (۲۸). علاوه بر این‌ها، در سرطان معده، سلول‌های TCD8⁺ با وجود بیان مثبت PD-1 همچنان به صورت سلول‌های عملکردی باقی می‌مانند (۲۹). مطالعه‌ی حاضر دارای محدودیت‌هایی است که مهم‌ترین آن‌ها شامل تعداد کم نمونه و جمع‌آوری نمونه‌ها از یک مرکز درمانی می‌باشد. همچنین مطالعات قبلی از آنتی‌بادی‌ها و cut-off‌های متفاوتی برای تعیین بیان کم و زیاد PD-1 استفاده کرده‌اند، که این مسأله مقایسه‌ی نتایج را دشوار می‌سازد.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394-424.
2. Merlano MC, Granetto C, Fea E, Ricci V, Garrone O. Heterogeneity of colon cancer: from bench to bedside. *ESMO Open*. 2017; 2(3): e000218.
3. Molinari C, Marisi G, Passardi A, Matteucci L, De Maio G, Ulivi P. Heterogeneity in colorectal cancer: a challenge for personalized medicine? *Int J Mol Sci* 2018; 19(12): 3733.
4. Bindea G, Mlecnik B, Fridman W-H, Pagès F, Galon J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(2): 215-22.
5. Angell HK, Bruni D, Barrett JC, Herbst R, Galon J.

- The immunoscore: colon cancer and beyond. *Clin Cancer Res* 2020; 26(2): 332-9.
6. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* 2018; 33(4): 547-62.
 7. Giraldo NA, Sanchez-Salas R, Peske JD, Vano Y, Becht E, Petitprez F, et al. The clinical role of the TME in solid cancer. *Br J Cancer* 2019; 120(1): 45-53.
 8. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(8): 486-99.
 9. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer* 2019; 18(1): 155.
 10. Taylor ES, McCall JL, Girardin A, Munro FM, Black MA, Kemp RA. Functional impairment of infiltrating T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2016; 5(11): e1234573.
 11. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 2020; 10(3): 727-42.
 12. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-48.
 13. Jiang Y, Chen M, Nie H, Yuan Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother* 2019; 15(5): 1111-22.
 14. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2443-54.
 15. Shen X, Zhao B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ* 2018; 362: k3529.
 16. Berntsson J, Eberhard J, Nodin B, Leandersson K, Larsson AH, Jirström K. Expression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and its ligand PD-L1 in colorectal cancer: Relationship with sidedness and prognosis. *Oncoimmunology* 2018; 7(8): e1465165.
 17. Pöttsch M, Berg E, Hummel M, Stein U, von Winterfeld M, Jöhrens K, et al. Better prognosis of gastric cancer patients with high levels of tumor infiltrating lymphocytes is counteracted by PD-1 expression. *Oncoimmunology* 2020; 9(1): 1824632.
 18. Wu Y, Cao D, Qu L, Cao X, Jia Z, Zhao T, et al. PD-1 and PD-L1 co-expression predicts favorable prognosis in gastric cancer. *Oncotarget* 2017; 8(38): 64066-82.
 19. Li Y, Liang L, Dai W, Cai G, Xu Y, Li X, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer* 2016; 15(1): 55.
 20. Lee LH, Cavalcanti MS, Segal NH, Hechtman JF, Weiser MR, Smith JJ, et al. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2016; 29(11): 1433-42.
 21. Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Nakao S, Matsutani S, et al. The Prognostic Significance of the Tumor-infiltrating Programmed Cell Death-1(+) to CD8(+) Lymphocyte Ratio in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2017; 37(8): 4165-72.
 22. Zengin M, Zergeroğlu S, Okcu O, Benek S. PD-1 and PD-L2 expression predict relapse risk and poor survival in patients with stage III colorectal cancer. *Cell Oncol (Dordr)* 2021; 44(2): 423-32.
 23. Ahtaiainen M, Wirta EV, Kuopio T, Seppälä T, Rantala J, Mecklin JP, et al. Combined prognostic value of CD274 (PD-L1)/PDCDI (PD-1) expression and immune cell infiltration in colorectal cancer as per mismatch repair status. *Mod Pathol* 2019; 32(6): 866-83.
 24. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. *AJCC cancer staging manual*. New York, NY: Springer; 2017.
 25. Gruber ES, Oberhuber G, Pils D, Stork T, Sinn K, Gruber S, et al. The determination of immunomodulation and its impact on survival of rectal cancer patients depends on the area comprising a tissue microarray. *Cancers (Basel)* 2020; 12(3): 563.
 26. Saleh R, Taha RZ, Toor SM, Sasidharan Nair V, Murshed K, Khawar M, et al. Expression of immune checkpoints and T cell exhaustion markers in early and advanced stages of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2020; 69(10): 1989-99.
 27. Lerrer S, Tocheva AS, Bukhari S, Adam K, Mor A. PD-1-stimulated T cell subsets are transcriptionally and functionally distinct. *iScience* 2021; 24(9): 103020.
 28. Shen Y, Teng Y, Lv Y, Zhao Y, Qiu Y, Chen W, et al. PD-1 does not mark tumor-infiltrating CD8 +T cell dysfunction in human gastric cancer. *J Immunother Cancer* 2020; 8(2): e000422.

The Relationship between Programmed Cell Death Receptor-1 Expression in Colon Tumoral Tissue and Clinical and Pathological Characteristics of Patients with Colon Cancer

Zahra Mokhtari¹, Marzieh Rezaei², Mohammad Hossein Sanei³, Zahra Faghih⁴

Original Article

Abstract

Background: Activatory or inhibitory immune checkpoints regulate the activity of the immune system. Programmed cell death receptor 1 (PD-1) is an inhibitory immune checkpoint that their overexpression reflects the exhaustion of the immune system. However, it is still unclear how it affects the prognosis of colorectal cancer (CRC). This study aimed to investigate the prognostic value of PD-1 in patients with CRC according to tumor location.

Methods: In a cross-sectional study during 2020-2021, a number of 136 patients with history of CRC who underwent surgery at Al-Zahra Hospital in Isfahan between 2013 and 2017 were selected and evaluated retrospectively. Immuno-histochemical staining of tissue samples was performed for PD-1 marker and the expression of this marker was determined in the center and invasive margins of the tumor. Data on survival and date of death of patients were completed through the patient file and confirmed through the civil registry.

Findings: High expression of PD-1 in invasive margin was significantly related to lower T stage (T1/2) in left tumors, low M stage (M0) in right tumors, absence of metastasis in right and left tumors, larger tumor size (≥ 5 cm) in right-sided tumors. The expression of this marker in any tumor areas was not significantly related to the survival of the patients.

Conclusion: The findings of this study showed that high expression of PD-1 is related to the lower stages of the CRC, but it is not a good indicator for the prognosis of patients with colon cancer.

Keywords: Colorectal cancer; Immune checkpoint proteins; Immunohistochemistry; prognosis; Programmed Cell Death 1 Receptor

Citation: Mokhtari Z, Rezaei M, Sanei MH, Faghih Z. The Relationship between Programmed Cell Death Receptor-1 Expression in Colon Tumoral Tissue and Clinical and Pathological Characteristics of Patients with Colon Cancer. J Isfahan Med Sch 2023; 41(706): 27-34.

1- Medical Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Institute for Cancer Research (ICR), School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Corresponding Author: Marzieh Rezaei, Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: ma.rezaei@med.mui.ac.ir