

ANALIZA WOLNEGO POZAKOMÓRKOWEGO DNA O POCHODZENIU BAKTERYJNYM U PACJENTÓW Z ZAAWANSOWANYM CZERNIAKIEM PODDANYCH IMMUNOTERAPII ANTY-PD-1

Bernadeta Pietrzak^{1*}, Katarzyna Tomela², Łukasz Galus³, Jacek Mackiewicz³, Agnieszka Olejnik-Schmidt¹, Andrzej Mackiewicz^{2,4}, Mariusz Kaczmarek^{2,4}, Marcin Schmidt¹

¹Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

³Klinika Onkologii Klinicznej i Doświadczalnej, Instytut Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

⁴Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań

*email: bernadeta.pietrzak@up.poznan.pl

UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
W POZNANIU



Wprowadzenie

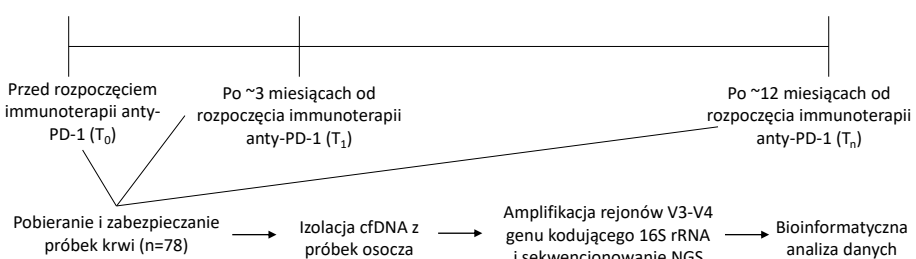
- Ostatnie badania wykazały obecność wolnego pozakomórkowego DNA o pochodzeniu mikrobiologicznym (cfmDNA), głównie bakteryjnym, w osoczu krwi osób zdrowych i chorych, w tym pacjentów onkologicznych.
- Poore i wsp. (2020) wykazali odmienne profile wolnego cfmDNA w osoczu krwi osób zdrowych oraz pacjentów z zaawansowanymi nowotworami płuc, prostaty lub skóry.
- Znaczenie wolnego cfmDNA u pacjentów z zaawansowanymi nowotworami poddawanych immunoterapii z wykorzystaniem inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych (np. przeciwciał anty-PD-1) nie zostało dotychczas dokładnie zbadane.
- Ouaknine Krief i wsp. (2019) wykazali związek pomiędzy wolnym cfmDNA a odpowiedzią i korzyścią kliniczną (*Peptostreptococcae*, *Paludibaculum*, *Lewinella*) oraz progresją choroby (*Gemmatimonadaceae*) u pacjentów z zaawansowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuc poddawanych immunoterapii anty-PD-1.

Cel pracy:

Analiza wolnego cfmDNA u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem przed i w trakcie immunoterapii anty-PD-1 jako potencjalnego biomarkera umożliwiającego predykcję odpowiedzi na leczenie i/lub monitoring stanu pacjenta.

Materiały i metody

Pacjenci z zaawansowanym czerniakiem



Wnioski

- Analiza składu i różnorodności wolnego cfmDNA pacjentów odpowiadających i nieodpowiadających na immunoterapię anty-PD-1 wykazała najwięcej istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami w punkcie czasowym T₁ (Ryc. 2, 3, Tab. 1).
- Otrzymane wyniki wskazują, że zmiany w wolnym cfmDNA u pacjentów nieodpowiadających na leczenie następują niedługo po jego rozpoczęciu (w przeciwieństwie do pacjentów odpowiadających), sugerując potencjał wolnego cfmDNA jako czynnika predykcyjnego oraz narzędzia do monitoringu stanu pacjentów w trakcie immunoterapii anty-PD-1.
- Badania na większych populacjach pacjentów onkologicznych poddawanych immunoterapii z wykorzystaniem inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych są niezbędne, aby lepiej scharakteryzować wolny cfmDNA oraz poznać jego wartość jako nowego biomarkera.

Literatura:

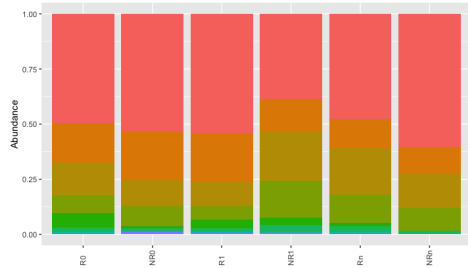
- Liu, X., Chen, Y., Zhang, S. et al. Gut microbiota-mediated immunomodulation in tumor. *J Exp Clin Cancer Res* 2021, 40, 221.
- Ouaknine Krief J. et al. Role of antibiotic use, plasma citrulline and blood microbiome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *J Immunother Cancer* 2019, 7, 176.
- Pietrzak B., Kawacka I. et al. Circulating Microbial Cell-Free DNA in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2023, 24, 3.
- Poore G. D. et al. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature* 2020, 579, 7800, 567–574.

Źródło finansowania:

Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki (nr grantu 2017/25/B/NZ5/01949).

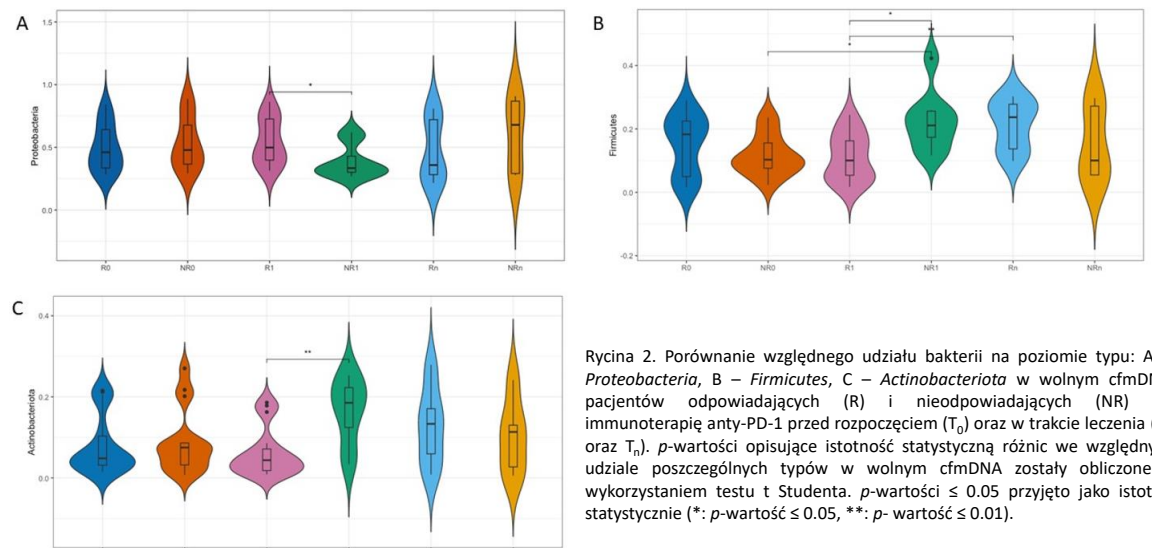
Wyniki

Wolny cfmDNA był zdominowany przez bakterie należące do typu *Proteobacteria* we wszystkich badanych grupach (Ryc. 1).



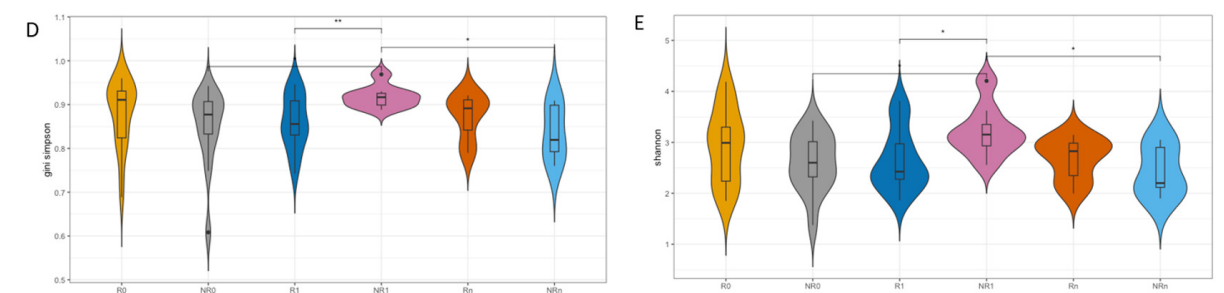
Rycina 1. Względny udział poszczególnych bakterii na poziomie typu w wolnym cfmDNA pacjentów odpowiadających (R) oraz nieodpowiadających (NR) na immunoterapię anty-PD-1 przed rozpoczęciem (T₀) oraz w trakcie leczenia (T₁ oraz T_n).

W punkcie czasowym T₁ obserwowano istotne statystycznie różnice we względnym udziale poszczególnych typów bakterii w wolnym cfmDNA pomiędzy pacjentami odpowiadającymi a nieodpowiadającymi na immunoterapię anty-PD-1. U pacjentów odpowiadających na leczenie, względny udział bakterii z typu *Proteobacteria* był wyższy, a bakterii z typów *Firmicutes* i *Actinobacteriota* niższy w porównaniu z nieodpowiadającymi (R1 vs. NR1, *p*-wartość ≤ 0.05, Ryc. 2). Ponadto, względny udział bakterii z typu *Firmicutes* w wolnym cfmDNA wzrósł w trakcie leczenia; u odpowiadających – po ~12 miesiącach, a u nieodpowiadających – po ~3 miesiącach od rozpoczęcia immunoterapii anty-PD-1 (NR0 vs. NR1, R1 vs. Rn, *p*-wartość ≤ 0.05, Ryc. 2B).



Rycina 2. Porównanie względnego udziału bakterii na poziomie typu: A – *Proteobacteria*, B – *Firmicutes*, C – *Actinobacteriota* w wolnym cfmDNA pacjentów odpowiadających (R) i nieodpowiadających (NR) na immunoterapię anty-PD-1 przed rozpoczęciem (T₀) oraz w trakcie leczenia (T₁ oraz T_n). *p*-wartości opisujące istotność statystyczną różnic we względnym udziale poszczególnych typów w wolnym cfmDNA zostały obliczone z wykorzystaniem testu t Studenta. *p*-wartości ≤ 0.05 przyjęto jako istotne statystycznie (*: *p*-wartość ≤ 0.05, **: *p*-wartość ≤ 0.01).

Różnorodność alfa wolnego cfmDNA pacjentów nieodpowiadających na immunoterapię anty-PD-1 w punkcie czasowym T₁ była statystycznie istotnie wyższa niż w pozostałych punktach czasowych oraz w porównaniu z pacjentami odpowiadającymi na leczenie w tym samym punkcie czasowym (NR0 vs. NR1, NR1 vs. NRn, R1 vs. NR1, *p*-wartość ≤ 0,05, Ryc. 3).



Rycina 3. Porównanie wartości wskaźników określających różnorodność alfa cfmDNA (Gini-Simpson oraz Shannon) pacjentów odpowiadających (R) i nieodpowiadających (NR) na immunoterapię anty-PD-1 przed rozpoczęciem (T₀) oraz w trakcie leczenia (T₁ oraz T_n). *p*-wartości opisujące istotność statystyczną różnic w różnorodności alfa wolnego cfmDNA zostały obliczone z wykorzystaniem testu t Studenta. *p*-wartości ≤ 0.05 przyjęto jako istotne statystycznie (*: *p*-wartość ≤ 0.05, **: *p*-wartość ≤ 0.01).

Analiza na poziomie taksonomicznym rodzaju również wykazała istotne statystycznie różnice we względnym udziale poszczególnych ASV w wolnym cfmDNA pacjentów odpowiadających i nieodpowiadających na leczenie przed rozpoczęciem i w trakcie immunoterapii anty-PD-1. W punkcie czasowym T₁ obserwowano statystycznie istotnie wyższy względny udział bakterii z rodzaju *Sphingomonas* oraz *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* u pacjentów odpowiadających na immunoterapię anty-PD-1, natomiast u pacjentów nieodpowiadających na leczenie wyższy udział bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Lactiplantibacillus*, *Bacillus* oraz *Bifidobacterium longum* (R1 vs. NR1, *p*-wartość ≤ 0.05, test sumy rang Wilcoxon).

Ponadto, profil wolnego cfmDNA zmieniał się w trakcie leczenia u pacjentów odpowiadających i nieodpowiadających na immunoterapię anty-PD-1. U pacjentów odpowiadających obserwowano istotny statystycznie wzrost względnego udziału bakterii z rodzaju *Escherichia-Shigella*, *Lactiplantibacillus*, *Faecalibacterium* oraz *B. longum*, natomiast obniżenie względnego udziału bakterii z rodzaju *Vibrionimonas* i *Acinetobacter lwoffii* w trakcie leczenia (R0 vs. R1, R0 vs. Rn, R1 vs. Rn, *p*-wartość ≤ 0.05, test sumy rang Wilcoxon).

U pacjentów nieodpowiadających obserwowano istotny statystycznie wzrost względnego udziału bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Bacillus*, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* oraz *Staphylococcus*, natomiast obniżenie względnego udziału bakterii z rodzaju *Sphingomonas* w trakcie leczenia (NR0 vs. NR1, NR0 vs. NRn, NR1 vs. NRn, *p*-wartość ≤ 0.05, test sumy rang Wilcoxon).