RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239573**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **413907**

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6827 (2018.01)

(22) Data zgłoszenia: **11.09.2015**

(54) **Sposób wykrywania genetycznie uwarunkowanej zwiększonej predyspozycji do raka jelita grubego**

(30) Pierwszeństwo:
12.09.2014, EP, 14184684.0

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
16.01.2017 BUP 02/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
13.12.2021 WUP 37/21

(73) Uprawniony z patentu:
POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE, Szczecin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
JAN LUBIŃSKI, Szczecin, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Rafał Witek

PL 239573 B1

Opis wynalazku

Zachorowalność na raka jelita grubego rośnie w krajach rozwiniętych lub rozwijających się z powodu zmiany diety na „zachodnią" [1–2]. Ponadto w związku ze zwiększeniem się odsetka osób w podeszłym wieku wzrośnie proporcjonalnie procent zachorowań, a co za tym idzie będzie coraz większy problem z opieką zdrowotną. Kilka ostatnich badań sugeruje, że istnieje co najmniej 20 markerów genetycznych niskiego ryzyka związanych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka jelita grubego, potwierdzając tym samym złożoną naturę genetyczną choroby [3]. Model kumulacji jest najbardziej konserwatywnym modelem wyjaśniającym, jak te markery genetyczne mogą przyczyniać się do rozwoju choroby [4]. Ostatnie dane z sekwencjonowania genomu potwierdzają pogląd, że nagromadzenie zmian molekularnych bezpośrednio poprzedza rozwój raka co implikuje skupienie uwagi na zmianach przedrakowych związanych z tym zaburzeniem [5]. Łącznie, dane te wskazują, że markery genetyczne związane z rakiem jelita grubego, mogą być związane z przedzłośliwymi stadiami tego schorzenia.

Przesiew populacyjny, szczególnie u osób, które osiągnęły szóstą dekadę życia może zmniejszyć zachorowalność i śmiertelność z powodu tej choroby [6]. Dwa badania są powszechnie stosowane: badanie na krew utajoną w kale (FOBT) lub kolonoskopia. Badanie FOBT jest tanie, ale niezbyt czułe i mało swoiste, braki te mogą być przezwyciężone poprzez wielokrotne powtórzenia tego badania [7]. Przybliżony współczynnik wykrywalności dla zaawansowanych gruczolaków i raków jelita grubego wynosi 2%, co oznacza, że na każde badane 100 osób tylko 2 wymagają prospektywnej obserwacji [8].

Kolonoskopia jest badaniem czasochłonnym i kosztownym, ale ma większą czułość i specyficzność w porównaniu do testów FOBT i nie musi być powtarzane w małych odstępach czasu. Wskaźnik wykrywalności zaawansowanego gruczolaka oraz raka jelita grubego wynosi około 5,5% co sugeruje, że to badanie jest około dwa razy bardziej czułe niż FOBT. Sugeruje to, że na każde 100 osób badanych przy użyciu tej metody, 95 nie wymaga żadnych kolejnych badań [9].

Obie metody naświetlają poważny problem w zakresie stosowania odpowiednich środków przesiewowych dla tych osób, które z nich korzystają. Wybranie pacjentów, którzy „skorzystają" z wczesnego wykrycia choroby może znacząco obniżyć koszty badań przesiewowych i potencjalnie wpłynąć na zwiększenie odsetka pacjentów w populacji zwiększonego ryzyka [10]. Obecnie, aby być zakwalifikowanym do tej populacji należy mieć dodatni wywiad rodzinny nowotworowy.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania genetycznie uwarunkowanej zwiększonej predyspozycji do raka jelita grubego charakteryzujący się tym, że w próbce materiału biologicznego pobranej od pacjenta pochodzenia słowiańskiego, zwłaszcza polskiego, identyfikuje się *in vitro* obecność w jego genotypie następujących polimorfizmów: rs2066847, rs6983267, rs4779584, rs3802842 oraz rs4939827, przy czym wykrycie jednoczesnej obecności genotypów ryzyka dla wspomnianych polimorfizmów świadczy o wysokiej predyspozycji do raka jelita grubego.

P r z y k ł a d 1

W niniejszym badaniu wybrano 8 markerów genetycznych niskiego ryzyka, które jak wykazano wcześniej wiążą się z niewielkim zwiększeniem ryzyka raka jelita grubego w polskiej populacji. Przy założeniu, że markery genetyczne niskiego ryzyka mogą mieć złożony efekt kumulacyjny u nosicieli, staraliśmy się ustalić optymalny zestaw markerów, które mogłyby stanowić, wyznacznik nowej podgrupy pacjentów z wyraźnie zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka jelita grubego (mimo negatywnej rodzinnej historii co do raka).

MATERIAŁY I METODY

Próbki

Osoby zostały zaproszone do wzięcia udziału w tym badaniu z trzech polskich miast (z Białegostoku 200, z Łodzi 557 i 2302 ze Szczecina; w sumie 3059), aby stworzyć reprezentatywną próbę dla polskiej populacji. Uczestnicy, którzy mieli w rodzinie zachorowania na raka jelita grubego, wcześniej chorowali na raka jelita grubego, mieli zdiagnozowanego poprzednio gruczolaka jelita, chorobę zapalną jelit lub inną z istotnych chorób współistniejących zostali wykluczeni z badania. Wiek uczestników wynosił od 54 i 65 lat (średnio 59,9 lat) i więcej kobiet wzięło udział w badaniach (1917; 63%) niż mężczyzn (1142; 37%). Wszyscy uczestnicy zostali przebadani za pomocą kolonoskopii, która wykazała, że u 7% z nich mieliśmy zaawansowane nowotwory jelita grubego. Jako „zaawansowane nowotwory jelita grubego" przyjęliśmy: gruczolakoraka, gruczolaka kosmkowego, dysplazję dużego stopnia lub gruczolaka cewkowatego o średnicy równej lub większej niż 10 mm. Wszyscy uczestnicy podpisali świadomą zgodę. Badania zostały zatwierdzone przez komisję bioetyczną Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego.

Genotypowanie

SNP-y wykorzystane w niniejszym badaniu, zostały uprzednio opisane w szeroko zakrojonych badaniach asocjacyjnych w genomie (tzw. GWAS, genome wide association studies) jako związane z rakiem jelita grubego: rs6983267 [11-23], rs3802842 [21-24], rs4779584 [22, 23, 25], rs4939827 [12, 20-23], rs4464148 [12] i rs10795668 [21, 23]. Dodatkowo włączono dwa warianty genetyczne, które dotychczas okazały się być związane z rakiem okrężnicy i odbytnicy dla polskiej populacji: rs2066847 – również kodowany jako 3020insC – w genie NOD2 [26, 27] i rs17879961 – również kodowany jako I157T – w genie CHEK2 [28-32].

Wszystkie SNP-y genotypowano za pomocą sond typu TaqMan (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) przy użyciu urządzenia Light Cycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics Inc., Rotkreuz, Szwajcaria) zgodnie z protokołami zalecanymi przez producentów, z wyjątkiem rs17879961, który był genotypowany przy użyciu protokołu RFLP.

Wyniki analiz i rozkład genotypów dla każdego z 8 markerów można odczytać z tabeli 1.

Analiza statystyczna

Grupa badana składała się wyłącznie z pacjentów z zaawansowanym nowotworem jelita grubego (213 osób). Grupę kontrolną stanowiły wszystkie pozostałe osoby (2846 osób).

Analiza asocjacyjna została przeprowadzona za pomocą pakietu oprogramowania SNPassoc for R [33] pomiędzy każdym pojedynczym SNP-em a ryzykiem rozwoju zaawansowanego nowotworu jelita grubego. Zostały uwzględnione trzy różne modele dziedziczenia: kodominujący, dominujący i recesywny. Wieloczynnikowy model jest szczególnym przypadkiem modelu kodominującego i dlatego został pominięty. Raczej rzadki „over" – dominujący model został także pominięty dla uproszczenia.

Dla każdego SNP-u, obliczono OR i jego 95% CI dla każdego modelu dziedziczenia (traktując najczęstszy homozygotyczny genotyp jako wartość odniesienia) wraz z „p" wyliczonym z testu ilorazu wiarygodności. Model dziedziczenia wykazujący najniższą wartość „p" był uważany za najbardziej prawdopodobny i wykorzystywany dalej do kolejnych etapów analizy. Uwaga: w tych przypadkach, gdy efekt rzadszych alleli był raczej ochronny niż zwiększający ryzyko zachorowania, genotyp odniesienia (częstszy) był – logicznie ujmując – traktowany jako genotyp ryzyka dla połączonej analizy (dotyczy rs4939827).

W końcu bezwarunkową regresję logistyczną wielu zmiennych skorygowaną o wiek podczas kolonoskopii oraz płeć zastosowano do analizy udziału każdego z badanych SNP-ów biorąc pod uwagę ich najbardziej prawdopodobny model dziedziczenia (należy zauważyć, że nie została tu zastosowana korekta dla wielokrotnego testowania).

Ten pierwszy krok generuje listę 8 markerów ustawionych przez rosnącą wartość „p". Zestawy lub pule o zwiększającej się liczbie rozważanych markerów (od 2 do 8), powstały na podstawie wspomnianej kolejności, a dla każdego pacjenta obliczono wszystkie pule skumulowanych wskaźników ryzyka. Związek pomiędzy ryzykiem zaawansowanego nowotworu jelita grubego a liczbą skumulowanych markerów ryzyka dla różnej wielkości zestawów SNP-ów został zilustrowany w postaci krzywych OR. OR obliczono stosując bezwarunkową regresję logistyczną dostosowaną do wieku podczas kolonoskopii i płci oraz biorąc liczbę skumulowanych markerów ryzyka jako niezależną zmienną ilościową (te wartości „p" korygowano za pomocą wielokrotnego testowania Bonferroni). Odniesieniem był brak markerów ryzyka.

Bezwarunkową regresję logistyczną dostosowaną do wieku podczas kolonoskopii oraz płci użyto także do oceny trendu całościowego liniowego modelu zastosowanego w celu zobrazowania zależności pomiędzy ryzykiem choroby a ilością skumulowanych wskaźników ryzyka (ponownie korygowane za pomocą wielokrotnego testowania Bonferroni). Wszystkie obliczenia i rysunki zostały wykonane w R (2.15.2).

WYNIKI

U 213 z 3059 uczestników badania wykryły zaawansowane zmiany w jelicie grubym. Oznacza to większy odsetek (7%), niż wynikałoby z częstości wykrywania zmian za pomocą samej kolonoskopii przesiewowej (~ 5%). Wykryto 12 pacjentów z gruczolakorakiem, 75 z gruczolakiem kosmkowym, 38 z dysplazją dużego stopnia i 88 z cewkowym gruczolakiem o średnicy równej lub większej niż 10 mm. Oprócz tego zdiagnozowano 392 uczestników z małymi gruczolakami, 436 z polipami hyperplastycznymi (rozrostowymi), 139 z polipami zapalnymi i 30 z innymi nienowotworowymi zmianami w jelicie. 9 chorych miało niejednoznaczny wynik kolonoskopii. U pozostałych uczestników badania (1840) nie wykryto zmian podczas kolonoskopii.

Częstości obserwowane dla każdego z 8 badanych markerów w tym badaniu są przedstawione w tabeli 1 zarówno dla grupy badanej jak i dla grupy kontrolnej (zaawansowane zmiany w jelicie grubym w porównaniu do wszystkich innych badanych osób).

W pierwszym etapie, 8 SNP-ów zostało posortowanych poprzez zwiększającą się wartość „p" dla testu współczynnika prawdopodobieństwa. Najbardziej prawdopodobnym modelem dziedziczenia został kodominujący dla: rs2066847 i rs17879961, recesywny dla: rs4779584, rs3802842, rs4939827 i rs10795668, dominujący dla: rs6983267 i rs4464148. Tylko rs6983267, rs4779584 i rs3802842 miały statystycznie istotną wartość „p" (Tabela 1, „model" słupkowy).

Przeanalizowano wpływ każdego markera – zgodnie z jego najbardziej prawdopodobnym modelem dziedziczenia – na ryzyko wystąpienia u nosiciela zaawansowanego nowotworu jelita grubego, mierzony poprzez iloraz szans (odds ratio) obliczany z wieloczynnikowej bezwarunkowej regresji logistycznej dostosowanej do płci i wieku podczas kolonoskopii (Tabela 2). Istnieją tylko dwa markery znacząco związane ze zwiększonym ryzykiem zaawansowanego raka jelita grubego: rs2066847 (OR 1,59, 95% CI: 1,02–2,41; p-value = 0,033) i rs6983267 (i OR 1,45; 95% CI: 1,02–2,12; p-value = 0,044). Taka korelacja była oczekiwana z danych literaturowych, jednak celem tego badania było ustalenie połączonych działań czynników genetycznych opisanych poniżej.

Krzywe przedstawiające zależność pomiędzy liczbą skumulowanych markerów ryzyka a ryzykiem wystąpienia zaawansowanego nowotworu jelita grubego były systematycznie tworzone dla coraz większej puli markerów – w odniesieniu do kolejności określonej w tabeli 2 – na podstawie tych danych obliczono efekt kumulacji markerów (Rysunek 1). Tak więc, pierwsza krzywa pokazuje równoczesne wystąpienie u pacjenta pierwszych dwóch markerów, inna krzywa dla pierwszych trzech markerów i tak dalej dla wszystkich pozostałych markerów.

Na rysunku nr 1 widzimy, że ryzyko choroby zwykle rośnie wraz ze wzrostem liczby markerów ryzyka. Mimo to, ostatnie wartości każdej krzywej są mniej wiarygodne, ponieważ jest to związane z ograniczeniem liczebności grupy badanej i kontrolnej (patrz np.: spadek ryzyka dla kumulacji 3 markerów z 3). Biorąc to pod uwagę, nie ma powodu, aby zakładać, że zależność nie jest liniowa. Nachylenie wszystkich krzywych ryzyka jest bardzo podobne.

Ponieważ grupą odniesienia jest zawsze grupa pacjentów o czystej kolonoskopii, jasne jest, że grupa ta zmniejsza się, gdy rośnie pula rozważanych markerów. Dla puli 2 markerów grupa odniesienie zawiera 24,7% z kontroli i zmniejsza się do 5,4% dla puli 8 markerów.

Jedna z krzywych z rysunku 1 jest wybrana jako przykładowa dla bardziej szczegółowej analizy (patrz Rysunek 2). Mimo tak wielu krzywych na rysunku nr 1 mają one podobne cechy, rozpatrywany przypadek puli 5 markerów ryzyka zawiera kilka zalet, który go wyróżnia w stosunku do innych. Grupa odniesienia wciąż zawiera 14,4% kontroli (przy większej puli markerów grupa referencyjna spada do mniej niż połowy tej wartości) i osiąga wysoki iloraz szans (odds ratio) przy stosunkowo wysokiej czułości, jak opisano poniżej.

Przebieg krzywej ryzyka na rysunku 2 pokazuje stały wzrost ryzyka: OR 1,84 (95% CI: 1,08–3,34; nominalna wartość „p" 0,034; wartość „p" skorygowana dla wielokrotnego testowania 0,238) dla 1 lub więcej występujących wspólnie markerów ryzyka; OR 2,57 dla 2 lub więcej markerów (95% CI: 1,50–4,71; nominalna wartość „p" 0,0011; wartość „p" skorygowana dla wielokrotnego testowania 0,0079); OR 3,57 dla 3 lub więcej markerów (95% CI: 1,91–6,96; nominalna wartość „p" 0,00011; „p" skorygowana dla wielokrotnego testowania 0,00074) lub 4,18 dla 4 lub więcej markerów ryzyka (95% CI: 1,13–12,50; nominalna „p" 0,017; wartość „p" skorygowana dla wielokrotnego testowania 0,118). W przeciwieństwie do tego czułość testu spada stale z 93,0% dla 1 lub więcej markerów, 51,2% dla 2 lub więcej, 16,0% dla 3 lub więcej markerów i 1,9% dla co najmniej 4 występujących wspólnie markerów ryzyka. Dla dokładnie 5 skumulowanych markerów ryzyka z puli 5, liczba obserwacji jest zbyt mała dla miarodajnej analizy.

W ostatnim etapie przeanalizowano tendencje liniowego modelu kumulacji dla wspomnianej już puli 5 markerów. Analiza regresji logistycznej, ponownie skorygowana co do płci i wieku podczas kolonoskopii, wykazała istotny związek pomiędzy liczbą wspólnie występujących markerów ryzyka z puli 5 (rs2066847, rs6983267, rs4779584, rs3802842 i rs4939827) i wzrostem ryzyka zaawansowanego nowotworu jelita grubego (nominalna wartość „p" = 0,0047, wartość „p" skorygowana dla wielokrotnego testowania = 0,033).

DYSKUSJA

Określenie populacji osób o wysokim ryzyku zachorowania na raka jelita grubego jest najczęściej ograniczone do osób z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku raka. Najwyraźniej nie jest

to wystarczające. Poza tym, znalezienie markerów genetycznych, które mogą być wykorzystane do identyfikacji osób ze zwiększonym ryzykiem raka jelita grubego pozostaje, jak dotąd, nieuchwytne – nie ma wyczerpującej listy markerów, które mogłyby być wykorzystane do tego celu. Niejednorodność populacji pod względem genetycznym stanowi dodatkowe wyzwanie w zakresie zapewnienia, żeby nie zgubić wybranych markerów genetycznych, które są specyficzne dla niektórych populacji przy rozważaniu jak rozwijać strategie badań przesiewowych uwzględniające niuanse poszczególnych populacji.

Niektóre z tych markerów genetycznych, które wydają się być związane z wystąpieniem raka jelita grubego w Polsce nie zostały powtórzone w innych badaniach poza populacjami słowiańskimi [27–29]. Alternatywnie, istnieje coraz więcej dowodów, że niektóre z markerów wymienionych w poprzednich badaniach asocjacyjnych nadal pozostają znaczące w polskiej populacji [17]. W tym badaniu rozpatrywano czy 2 częste warianty genetyczne (NOD2 rs2066847 i CHEK2 rs17879961) mogą zostać wykorzystane w połączeniu z szeregiem 6 markerów zidentyfikowanych w badaniach międzynarodowych w celu określenia, czy mogą być stosowane do przewidzenia, które genetycznie wyselekcjonowane podgrupy ludności są najbardziej narażone na rozwój zaawansowanego nowotworu jelita grubego.

Rozpatrywane indywidualnie markery genetyczne, rs2066847 (OR 1,59; 95% CI: 1,02–2,41, wartość „p" 0,033, korekta dla wielokrotnego testowania nie ma tu zastosowania) i rs6983267 (OR 1,45, 95% CI: 1,02–2,12; wartość „p" 0,044, brak zastosowania dla korekty wielokrotnego testowania) były znacząco związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zaawansowanego nowotworu jelita grubego (Tabela 2). Jednak, gdy więcej markerów ryzyka było dziedziczonych wspólnie, obserwowany jest stały wzrost ryzyka zachorowania na zaawansowany nowotwór jelita grubego (rycina 1).

Osoby będące nosicielem większej liczby markerów ryzyka były bardziej narażone na zdiagnozowanie u nich zaawansowanego nowotworu jelita grubego (np.: OR powyżej 3 dla wszystkich nosicieli 4 lub więcej markerów ryzyka) niż osoby z grupy kontrolnej. Połączenie 5 markerów (rs6983267, rs4779584 rs2066847, rs3802842 i rs4939827) wykazało optymalny kompromis minimalizujący liczbę markerów branych pod uwagę, przy jednoczesnym względnym zwiększeniu wielkości grupy badanej i ryzyka związanego z zachorowalnością, bez redukcji grupy kontrolnej poza rozsądne granice (14,4%). Na przykład dla 2 lub więcej wspólnie występujących markerów ryzyka OR wynosi: 2,57 (95% CI: 1,50–4,71; czułość 51,2%, wartość „p" skorygowana dla wielokrotnego testowania 0,0079) i OR 3,57 dla 3 lub więcej skumulowanych markerów ryzyka (95% CI: 1,91–6,96; czułość 16,0%; „p" skorygowane dla wielokrotnego testowania 0,00074).

Dla tej kombinacji 5 markerów trend liniowego modelu wspólnego ryzyka był statystycznie istotny (p = 0,033, skorygowany dla wielokrotnego testowania) po uwzględnieniu płci i wieku podczas kolonoskopii.

Wykazano, że wszystkie 8 markerów genetycznych ma niewielki wpływ, ale gdy występują wspólnie mogą mieć dodatkowe znaczenie, które znacznie zwiększa ryzyko zachorowania. W tym przypadku, badania genetyczne u pacjentów będących nosicielami polimorfizmów związanych ze zwiększonym ryzykiem zachorowania przynajmniej: rs2066847, rs6983267, rs4779584, rs3802842 i rs4939827 mogą być cenne, ponieważ umiejscawia pacjentów z negatywną historią rodzinną w stosunku do raka w kategorii osób o wysokim ryzyku, co jest wskazane przy badaniach przesiewowych dla jelita grubego.

Podsumowując, wyniki niniejszego badania sugerują, że dla poszczególnych populacji stratyfikacja ryzyka zachorowania u pacjentów może być możliwa przy użyciu markerów związanych z rakiem okrężnicy i odbytnicy, bez konieczności zdobywania dodatkowej wiedzy o interakcjach w jakie wchodzą te polimorfizmy. Korzyściami ze stratyfikacji pacjentów będą ukierunkowane badania przesiewowe, które powinny doprowadzić do bardziej skutecznych środków ochrony zdrowia, aby ograniczyć koszty badań przesiewowych w populacji, a jednocześnie pozwolą skupić się na tych pacjentach bez dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku raka, którzy będą mogli skorzystać z tych środków. Badania zakrojone na większą skalę za pomocą większej liczby nowych markerów genetycznych, zwiększających czułość i swoistość, będą w stanie niewątpliwie poprawić obecne podejście do tych zagadnień.

Podsumowanie:

Markery genetyczne związane z rakiem jelita grubego, mogą być stosowane w badaniach przesiewowych populacji dla wcześniejszej identyfikacji pacjentów z podwyższonym ryzykiem choroby. Przebadaliśmy 3059 osoby z ujemny wywiadem w kierunku zachorowań na raka w rodzinie na obecność 8 markerów, które we wcześniejszych badaniach wykazały związek z rakiem jelita grubego.

Po kolonoskopii profil genetyczny grupy badanej składającej się z osób z zaawansowanym nowotworem jelita grubego (213) został porównany do reszty przypadków (2846). rs2066847 i rs6983267 okazały się istotnie związane z podwyższonym ryzykiem wystąpienia zaawansowanego nowotworu jelita grubego, ale z ograniczonym wpływem jeśli występowały pojedynczo (OR 1,59; 95% CI: 1,02–2,41, wartość „p" = 0,033 i OR 1,45; 95% CI: 1,02–2,12; wartość „p" = 0,044, odpowiednio dla każdej ze zmian). W przeciwieństwie do tego, wspólne wystąpienie markerów było związane z wysokim ryzykiem: połączenie rs2066847, rs6983267, rs4779584, rs3802842 i rs4939827 będący kompromisem pomiędzy minimalną liczbą markerów i jednocześnie jak największej względnej wielkości grupy badanej oraz jak największym ryzyku związanym z nosicielstwem tych zmian: np.: przy co najmniej 2 skumulowanych markerach ryzyka OR 2,57 (95% CI: 1,50–4,71; skorygowana wartość „p" 0,0079) oraz dla 3 lub więcej OR 3,57 (95% CI: 1,91–6,96; skorygowana wartość „p" 0,00074). Identyfikacja modelu kumulacyjnego, markerów niskiego ryzyka może być pomocna w określeniu grup wysokiego ryzyka, w obrębie populacji niskiego ryzyka (bez nowotworu w historii rodzinnej).

LITERATURA

1 Bener A. Colon cancer in rapidly developing countries: review of the lifestyle, dietary, consanguinity and hereditary risk factors. Oncology Reviews 2011: **5**: 5–11.

2 Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Sur 2009: **22**:191–197.

3 Dunlop MG, Dobbins SE, Farrington SM, et al. Common variation near CDKN1A, POLD3 and SHROOM2 influences colorectal cancer risk. Nat Genet 2012: **44**: 770–776.

4 Niittymäki I, Kaasinen E, Tuupanen S, Karhu A, Järvinen H, Mecklin JP, et al. Low-penetrance susceptibility variants in familial colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010: **19**:1478–1483.

5 The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 2012: **487**:330–337.

6 Hol L, van Leerdam ME, van Ballegooijen M, et al. Screening for colorectal cancer: randomised trial comparing guaiac-based and immunochemical faecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy. Gut 2010: **59**: 62–68.

7 Walsh JM, Terdiman JP. Colorectal Cancer Screening Scientific Review. JAMA 2003: **289**:1288–96.

8 Steele RJ, McClements PL, Libby G, et al. Results from the first three rounds of the Scottish demonstration pilot of FOBT screening for colorectal cancer. Gut 2009: **58**: 530–535.

9 Segnan N, Senore C, Andreoni B, et al., SCORE2 Working Group-Italy. Randomized trial of different screening strategies for colorectal cancer: patient response and detection rates. J Natl Cancer Inst 2005: **97**: 347–357.

10 Nielsen HJ, Jakobsen KV, Christensen IJ, Brünner N, Danish Study Group on Early Detection of Colorectal Cancer. Screening for colorectal cancer: possible improvements by risk assessment evaluation? Scand J Gastroenterol 2011: **46**:1283–1294.

11 Haiman CA, Le Marchand L, Yamamato J, et al. A common genetic risk factor for colorectal and prostate cancer. Nat Genet 2007: **39**: 954–956.

12 Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, et al. A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. Nat Genet 2007: **39**: 1315–1317.

13 Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. Nat Genet 2007: **39**: 984–988.

14 Poynter JN, Figueiredo JC, Conti DV, et al. Variants on 9p24 and 8q24 are associated with risk of colorectal cancer: results from the colon cancer family registry. Cancer Res 2007: **67**: 11128–11132.

15 Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. Nat Genet 2007: **39**: 989–994.

16 Berndt SI, Potter JD, Hazra A, et al. Pooled analysis of genetic variation at chromosome 8q24 and colorectal neoplasia risk. Hum Mol Genet 2008: **17**: 2665–2672.

17 Wokolorczyk D, Gliniewicz B, Sikorski A, et al. A range of cancers is associated with the rs6983267 marker on chromosome 8. Cancer Res 2008: **68**: 9982–9986.

18 Li L, Plummer SJ, Thompson CL, et al. A common 8q24 variant and the risk of colon cancer: a population-based case-control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008: **17**: 339–342.

19 Cicek MS, Slager SL, Achenbach SJ, et al. Functional and clinical significance of variants localized to 8q24 in colon cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009: **18**: 2492–2500.

20 Curtin K, Lin WY, George R, et al. Meta association of colorectal cancer confirms risk alleles at 8q24 and 18q21. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009: **18**: 616–621.

21 Mateş IN, Csiki I, Mateş D, et al. Association of common genetic variants with colorectal cancer risk in a Romanian sample. Chirurgia (Bucur) 2010: **105**: 749–757.

22 He J, Wilkens LR, Stram DO, Kolonel LN, et al. Generalizability and epidemiologic characterization of eleven colorectal cancer GWAS hits in multiple populations. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2011: **20**: 70–81.

23 Giráldez MD, López-Dóriga A, Bujanda L, et al. Susceptibility genetic variants associated with early-onset colorectal cancer. Carcinogenesis 2012: **33**: 613–619.

24 Pittman AM, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. Refinement of the basis and impact of common 11q23.1 variation to the risk of developing colorectal cancer. Hum Mol Genet 2008: **17**: 3720–3727.

25 Jaeger E, Webb E, Howarth K, et al. Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. Nat Genet 2008: **40**: 26–8.

26 Kurzawski G, Suchy J, Kładny J, et al. The NOD2 3020insC Mutation and the Risk of Colorectal Cancer. Cancer Res 2004: **64**: 1604–1606.

27 Suchy J, Kłujszo-Grabowska E, Kładny J, et al. Inflammatory response gene polymorphisms and their relationship with colorectal cancer risk. BMC Cancer 2008: **8**: 112.

28 Cybulski C, Górski B, Huzarski T, et al. CHEK2 Is a Multiorgan Cancer Susceptibility Gene. Am J Hum Genet 2004: **75**: 1131–1135.

29 Lubiński J, Huzarski T, Kurzawski G, et al. The 3020insC Allele of NOD2 Predisposes to Cancer of Multiple Organs. Hered Cancer Clin Pract 2005: **3**: 59–63.

30 Cybulski C, Huzarski T, Huzarska J, et al. Population Screening of CHEK2 Mutations in Poland. Hered Cancer Clin Pract 2006: **4**: 57.

31 Kilpivaara O, Alhopuro P, Vahteristo P, Aaltonen LA, Nevanlinna H. CHEK2 I157T associates with familial and sporadic colorectal cancer. J Med Genet 2006: **43**: e34.

32 Cybulski C, Wokołorczyk D, Kładny J, et al. Germline CHEK2 mutations and colorectal cancer risk: different effects of a missense and truncating mutations? Eur J Hum Genet 2007: **15**: 237–241.

33 González JR, Armengol L, Solé X, et al. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. Bioinformatics 2007: **23**: 644–645.

NAZWA SNP-u	Allel nie-ryzyka (A)	Allel ryzyka (B)	GENOTYP W KONTROLACH			GENOTYP W PRZYPADKACH			MODEL DZIEDZICZENIA Wartość „p"/OR [95%CI]		
			AA	AB	BB	AA	AB	BB	kodominujący	dominujący	recesywny
rs2066847	0	1	2561 (91.2%)	246 (8.8%)	-	181 (87.0%)	27 (13.0%)	-	*p* 0.060 **1.53** (1.00-2.35)	-	-
rs6983267	T	G	706 (25.3%)	1443 (51.8%)	639 (22.9%)	39 (18.4%)	111 (52.4%)	62 (29.2%)	*p* 0.022 **1.39** (0.95-2.03) **1.78** (1.17-2.70)	*p* 0.020 **1.51** (1.05-2.16)	*p* 0.033 **1.41** (1.03-1.92)
rs4779584	C	T	1397 (49.2%)	1050 (37.0%)	393 (13.8%)	106 (49.8%)	66 (31.0%)	41 (19.2%)	*p* 0.046 **0.84** (0.61-1.15) **1.42** (0.97-2.07)	*p* 0.952 **0.99** (0.75-1.31)	*p* 0.027 **1.52** (1.06-2.18)
rs3802842	A	C	1332 (47.0%)	1128 (39.8%)	372 (13.1%)	86 (40.8%)	86 (40.8%)	39 (18.5%)	*p* 0.045 **1.17** (0.86-1.59) **1.68** (1.13-2.50)	*p* 0.077 **1.29** (0.97-1.72)	*p* 0.023 **1.56** (1.08-2.25)
rs4939827*	C*	T*	716 (25.2%)	1394 (49.1%)	730 (25.7%)	54 (25.5%)	93 (43.9%)	65 (30.7%)	*p* 0.523 **0.88** (0.62-1.28) **1.18** (0.80-1.75)	*p* 0.935 **1.01** (0.72-1.41)	*p* 0.123 **1.27** (0.93-1.75)
rs4464148	T	C	1214 (42.7%)	1228 (43.2%)	400 (14.1%)	84 (39.4%)	96 (45.1%)	33 (15.5%)	*p* 0.552 **1.14** (0.84-1.55) **1.23** (0.81-1.87)	*p* 0.230 **1.16** (0.87-1.55)	*p* 0.499 **1.15** (0.78-1.69)
rs17879961	0	1	2665 (94.5%)	155 (5,5%)	-	197 (92.9%)	15 (7.1%)	-	*p* 0.411 **1.27** (0.73-2.20)	-	-
rs10795668	G	A	1334 (47.0%)	1201 (42.3%)	303 (10.7%)	102 (48.1%)	86 (40.6%)	24 (11.3%)	*p* 0.751 **0.91** (0.68-1.23) **1.06** (0.67-1.69)	*p* 0.673 **0.94** (0.71-1.25)	*p* 0.649 **1.11** (0.71-1.73)

Tabela 1. Porównanie częstości genotypów dla każdego z 8 badanych markerów ryzyka w wykrytych przypadkach zaawansowanego nowotworu jelita grubego w stosunku do grupy kontrolnej (wszystkie inne osoby). Wartości „p" dla modeli odnoszą się do testu ilorazu prawdopodobieństwa. Są to wartości nominalne (nie skorygowane dla wielokrotnego testowania) i służą tylko do wyboru najbardziej prawdopodobnego modelu dziedziczenia (jasnoszare tło). * dla rs4939827 ryzyko i brak ryzyka zachorowania są celowo odwrócone, gdyż rzadszy z alleli ma raczej ochronny wpływ na nosiciela zmiany.

NAZWA SNP-u	MODEL DZIEDICZENIA	WARTOŚĆ „p"	OR
rs2066847	kodominujący	0.0328	**1.59** (1.02- 2.41)
rs6983267	dominujący	0.0438	**1.45** (1.02- 2.12)
rs4779584	recesywny	0.0570	**1.43** (0.98- 2.06)
rs3802842	recesywny	0.0976	**1.38** (0.93- 2.01)
rs4939827	recesywny	0.3354	**1.17** (0.84- 1.60)
rs4464148	dominujący	0.4016	**1.14** (0.85- 1.54)
rs17879961	kodominujący	0.4103	**1.27** (0.69- 2.17)
rs10795668	recesywny	0.6328	**1.12** (0.69- 1.72)

Tabela 2. Wieloczynnikowa analiza regresji logistycznej dla wszystkich 8 markerów (model dziedziczenia został wybrany z tabeli 1) dostosowana do płci i wieku podczas kolonoskopii (nie ma tu zastosowania dla korekcji wielokrotnego testowania).

Opis rysunków

Rycina 1. Ryzyko wystąpienia zaawansowanego nowotworu jelita grubego w porównaniu do kolonoskopii, w których nie wykryto żadnych zmian (poprzez iloraz szans obliczonych za pomocą regresji logistycznej dostosowanej do płci i wieku podczas kolonoskopii) w zależności od liczby markerów ryzyka, których nosicielem jest pacjent. Poszczególne linie przedstawiają różną wielkość puli markerów, dla których obliczono ryzyko dla kumulacji poszczególnej liczby markerów. Wielkość każdej puli jest wskazana na końcu poszczególnych linii. Każda następna pula obejmuje poprzednią.

Rycina 2. Ryzyko wystąpienia zaawansowanego nowotworu jelita grubego w porównaniu do wszystkich innych przypadków (poprzez iloraz szans obliczany za pomocą regresji logistycznej skorygowanej o płeć i wiek podczas kolonoskopii) w zależności od ilości markerów ryzyka, których nosicielem jest pacjent z puli 5 markerów potencjalnego ryzyka (rs2066847, rs6983267, rs4779584, rs3802842 i rs49393827). Iloraz szans jest przedstawiany jako prostokąty z 95% przedziałami ufności. Skala ilorazu szans (odds ratio) jest pokazana po prawej stronie, a iloraz szans równy 1 jest pokazany jako linia przerywana dla porównania. Każdy słupek ukazuje proporcje liczby nosicieli dla wzrastającej liczby współwystępujących markerów ryzyka, oddzielnie dla przypadków nowotworów jelita grubego (zaawansowane) w kolorze jasnoszarym i kontroli (wszystkie pozostałe przypadki) w kolorze ciemnoszarym. Nad każdym słupkiem został dodany odsetek i aktualna liczba osób reprezentowanych przez dany słupek.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób wykrywania genetycznie uwarunkowanej zwiększonej predyspozycji do raka jelita grubego, **znamienny tym**, że w próbce materiału biologicznego pobranej od pacjenta pochodzenia słowiańskiego, zwłaszcza polskiego, identyfikuje się *in vitro* obecność w jego genotypie następujących polimorfizmów: rs2066847, rs6983267, rs4779584, rs3802842 oraz rs4939827, przy czym wykrycie jednoczesnej obecności genotypów ryzyka dla wspomnianych polimorfizmów świadczy o wysokiej predyspozycji do raka jelita grubego.

Rysunki

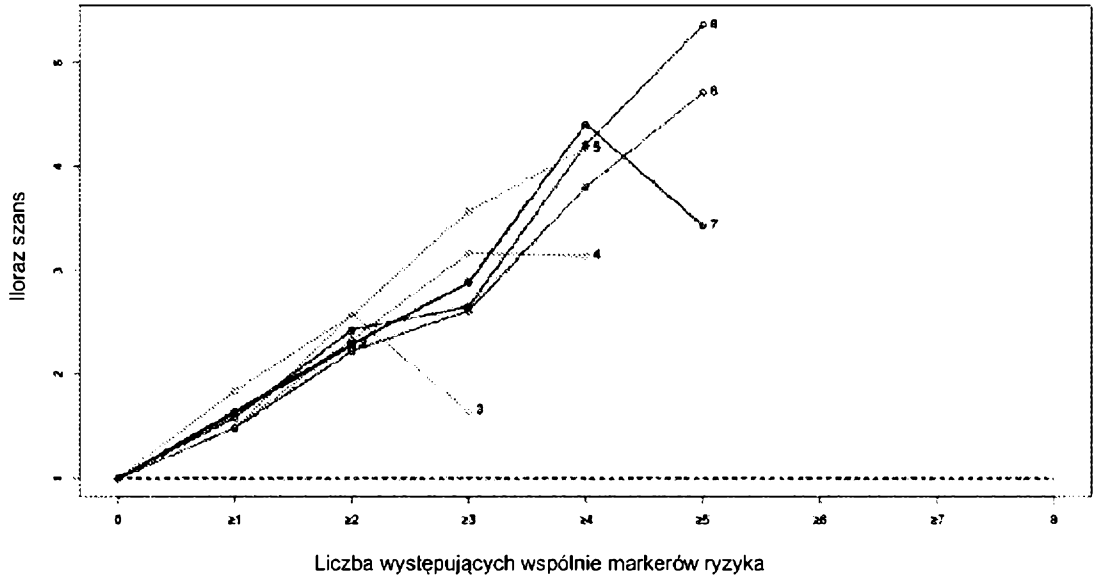

Fig. 1

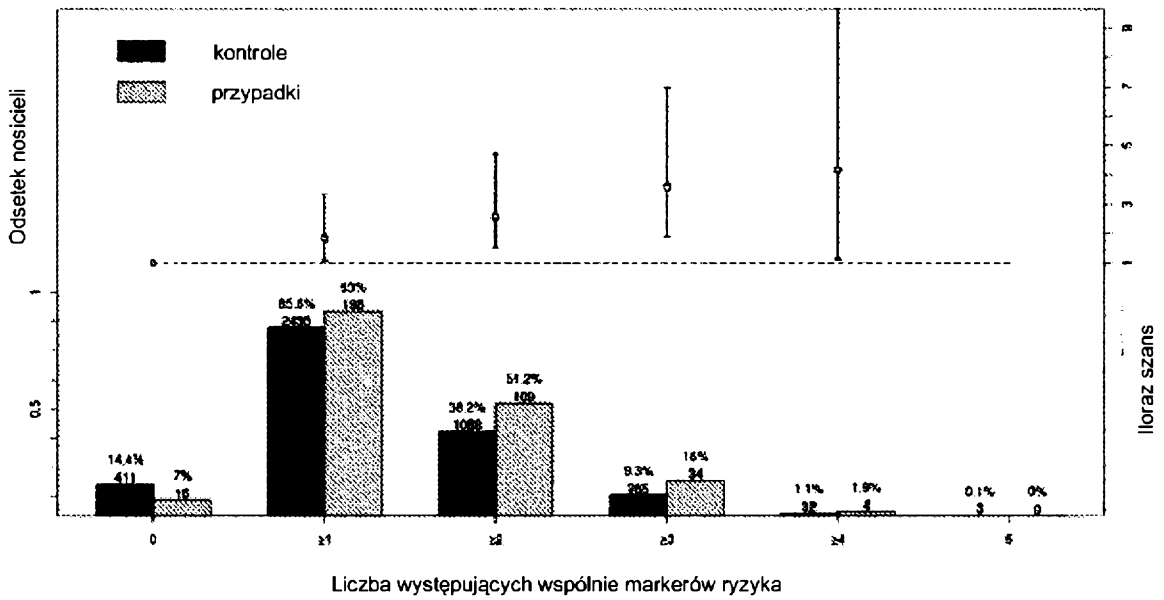

Fig. 2