

Streszczenie

Wstęp. Chłoniaki to nowotwory wywodzące się z komórek układu odpornościowego, charakteryzujące się monoklonalną ekspansją. Stanowią heterogenną grupę chorób o zróżnicowanym obrazie klinicznym, przebiegu, odpowiedzi na leczenie i rokowaniu. Chłoniaki nieziarnicze stanowią 3-5% zachorowań na nowotwory. W celu pełnego zdiagnozowania choroby i podjęcia decyzji terapeutycznych należy wykonać badania laboratoryjne, obrazowe oraz histopatologiczne i immunohistochemiczne. Są one wymagane dla oceny zasięgu choroby, stanu chorego oraz rokowania. Jednym z ważniejszych czynników decydujących o biologii i przebiegu klinicznym oraz skuteczności leczenia w chłoniakach jest indeks proliferacyjny, który można określić za pomocą ekspresji Ki67. Antygen Ki67 określany również MKI67 jest białkiem występującym w jądrze komórkowym, ściśle związanym z procesem proliferacji. Główną metodą leczenia chłoniaków pozostaje chemioterapia, a jej skuteczność jest zależna od procesów apoptozy, gdyż cytostatyki są lekami o działaniu proapoptotycznym. Kaspaza 3, występująca także pod nazwami CPP32, yama czy apopaina, jest proteazą cysteinowo-asparaginową odgrywającą kluczową rolę w fazie wykonawczej procesu apoptozy, więc jej ekspresja może korelować z odpowiedzią na chemioterapię. Pomimo efektywnych współczesnych metod indukcji remisji, znaczny odsetek chorych doświadcza wznowy choroby. Leczenie choroby nawrotowej, której przebieg bywa niekorzystny i zróżnicowany oraz dobór skutecznego postępowania terapeutycznego kolejnego rzutu pozostaje wyzwaniem terapeutycznym. Dlatego szczególnie istotna jest ocena czynników predykcyjnych i prognostycznych także dla choroby nawrotowej.

Cel pracy. Analiza czynników mogących wpływać na uzyskanie I i II remisji choroby u chorych na chłoniaki nieziarnicze, ze uwzględnieniem ekspresji antygeny Ki 67 i kaspazy 3, parametrów będących wykładnikami odpowiednio procesu proliferacji i apoptozy komórek chłoniakowych. Znalezienie parametrów posiadających wartość rokowniczą wobec czasu do progresji oraz ryzyka zgonu przy rozpoznaniu i przy nawrocie choroby.

Material i metody. Przeanalizowano 640 przypadków chorych na chłoniaki nieziarnicze leczonych w Klinice Hematologii i Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku oraz Oddziale Chemioterapii Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu. Do grupy

badanej włączono 131 pacjentów z chorobą nawrotową. Dostępne dane zebrano z dokumentacji medycznej. Zgromadzono pulę bloczków parafinowych w celu immunohistochemicznego oznaczenia jakościowego i ilościowego ekspresji Ki67 oraz kaspazy 3. Dokonano analiz statystycznych dla całej badanej grupy oraz z podziałem na podgrupy czynników i rodzajów chłoniaka, a także ocenę parametrów w I i II remisji choroby metodami regresyjnymi oraz taksonomii.

Wyniki. Mediana ekspresji Ki67 wyniosła 16% (1%-100%). Wartości te były niższe dla chłoniaków indolentnych (mediana 8%) niż dla chłoniaków agresywnych (mediana 31%). W podgrupie chłoniaków indolentnych o większym Ki67 uwidoczono niekorzystny wpływ na odpowiedź na leczenie (ORR; $p=0,0023$), czas do progresji (PFS; $p<0,0001$; mediana 7 vs 23 miesiące) oraz przeżycie całkowite (OS; $p<0,0001$; mediana 15 vs 67 miesięcy). Także w nawrocie choroby parametr ten znacząco wpływał na szansę na odpowiedź na leczenie ($p=0,0009$). Ekspresję CPP32 podzielono na słabą (punktowa lub ogniskowa) oraz silną (rozlaną). W podgrupie chłoniaków indolentnych silna ekspresja była domeną 61% chorych, w grupie chłoniaków agresywnych 38% pacjentów. Niska ekspresja kaspazy 3 powodowała istotnie większe ryzyko zgonu, mediany OS wynosiły odpowiednio 20 i 54 miesięcy ($p=0,0221$). Chorzy z większą ekspresją CPP32 wykazywali tendencję do lepszego ORR w chorobie nawrotowej ($p=0,0663$). Wykazano korelację wysokich wartości Ki67 z niską ekspresją kaspazy 3 ($p<0,0001$). Większa ekspresja kaspazy w obrębie badanego zestawu cech klinicznych łączyła się z większą liczbą eozynofili w krwi obwodowej zarówno wyjściowo jak i w nawrocie choroby. Klasyfikacja AnnArbor wykazała w badanej grupie statystycznie istotny wpływ na odpowiedź na leczenie, czas do nawrotu i przeżycie całkowite jednak wartość jej istotności była o rząd wielkości mniejsza dla oceny w nawrocie choroby, dla OS odpowiednio $p=0,0058$ i $p=0,0438$. Skala IPI natomiast zwiększała swoją wartość przewidywania losów chorych w nawrocie, dla OS $p=0,0056$ i $p<0,0001$. W analizie podgrup BMI wykazało wpływ na OS u pacjentów jedynie z chłoniakami agresywnymi ($p=0,044$). Ocena stężenia hemoglobiny (HGB) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) we krwi wykazała wpływ na OS w nawrocie choroby, odpowiednio z wartościami $p<0,0001$ i $p=0,0196$. Wpływ na ryzyko zgonu miało osiągnięcie ORR w pierwszej i drugiej indukcji remisji, odpowiednio $p=0,0147$ i $p=0,0001$. Dla uzyskania ORR w II linii znaleziono czynniki ryzyka, zarówno negatywne (LDH, wydolność w skali WHO na każdym etapie leczenia, obecność objawów ogólnych, Ann Arbor, IPI) jak i pozytywne (HGB, ilość kursów chemioterapii, stosowanie radioterapii, czas do nawrotu). Utrzymanie pełnej gęstości dawek chemioterapii w drugiej

linii, nawet jeżeli nie miało to miejsca w pierwszej linii, ma istotne znaczenie dla zmniejszenia ryzyka zgonu ($p=0,0033$).

Wnioski. W grupie chłoniaków indolentnych, wysoka ekspresja Ki67 wiąże się z niekorzystnymi wynikami leczenia indukującego remisję, krótszą medianą czasu do nawrotu choroby, jest czynnikiem zwiększającym ryzyko zgonu. W badanej grupie mniejsza ekspresja kaspazy 3 jest powiązana z większym ryzykiem zgonu. Pacjenci z większą ekspresją CPP32 wykazują lepszą odpowiedź na indukcję remisji w chorobie nawrotowej. Liczba eozynofili w badanej grupie korelowała z ekspresją kaspazy 3 i ryzykiem zgonu, możnaby ją rozpatrywać jako ekwiwalent aktywności kaspazy 3 i czynnik predykcyjny. Skale Ann Arbor i IPI dobrze stratyfikują ryzyko progresji i zgonu u chorych na początku oraz w nawrocie choroby. We wznowie, w porównaniu do oceny przy zachorowaniu, wartość prognostyczna skali funkcjonalnej IPI była większa, a skala Ann Arbor traciła na istotności. Wpływ na długość życia chorych na chłoniaki złośliwe ma osiągnięcie remisji w pierwszej i w drugiej indukcji remisji. Korzystne rokowniczo w uzyskaniu odpowiedzi terapeutycznej u chorych w nawrocie były: większe stężenie hemoglobiny, większa liczba kursów chemioterapii, stosowanie radioterapii, dłuższy czas do nawrotu. Niekorzystne rokowniczo są: wysoka aktywność LDH, gorszy stan ogólny w skali WHO i obecność objawów ogólnych. W terapii nawrotu chłoniaka, istotne znaczenie dla zmniejszenia ryzyka zgonu ma utrzymanie pełnej gęstości dawek cytostatyków, niezależnie od zachowania zaplanowanego rytmu leczenia w pierwszej indukcji.

Summary

Introduction. Lymphoma is a malignant neoplasm originating from immune system cells, characterized by monoclonal expansion. Lymphomas create heterogenic group of diseases with varied clinical course, response to treatment and prognosis. Non-Hodgkin lymphomas are 3-5% of all cancer diagnoses. For full evaluation and making therapeutic decisions laboratory tests, imaging, histopathology and immunochemistry must be performed. These are essential for staging, assessing patient's general condition and probable outcomes. One of the factors determining biology, clinical course and potential treatment efficacy is proliferation index, which can be evaluated by Ki67 expression. Antigen Ki67, also named MKI67 is a protein occurring in the cell nucleus, strictly connected with proliferation process. Effectiveness of chemotherapy, remaining mainstream method of therapy against lymphoma, depends on apoptosis as cytostatics are proapoptotic drugs. Caspase 3, also known as CPP32, yama or apopain is cysteine-aspartic acid protease of crucial importance in the execution phase of apoptosis, therefore its expression may correlate with response to treatment. Despite effective modern therapies inducing remission, many patients experience recurrence. Recurrent lymphomas have worse outcomes and choice of proper treatment is a therapeutic challenge. Because of that it is essential to deliver predictive and prognostic factors for relapsed disease.

Objectives. Analysis of prognostic factors influencing 1st and 2nd remission in patients treated for non-Hodgkin lymphoma, including expression of Ki67 antigen and caspase 3 as parameters for proliferation and apoptosis in cancer cells. Finding other prognostic factors for progression free survival and overall survival at the moment of diagnosis and recurrence.

Material and methods. Cases of 640 patients treated for lymphoma in Department of Haematology, Blood Neoplasms and Bone Marrow Transplantation in Wroclaw Medical University and in Department of Medical Oncology / Chemotherapy in Lower Silesian Oncology Centre were retrospectively analysed. For further investigations 131 cases with recurrent disease were selected. Data from medical documentation was collected. Samples of paraffin-embedded tissue were acquired for quality and quantity immunochemistry staining for Ki67 and caspase 3. Statistical analysis for both whole study group and subgroups divided

by potential risk factors and types of lymphoma at moment of diagnosis and relapse were performed with regressive and taxonomy methods.

Results. Median expression of Ki67 was 16% (1%-100%). It was lower for indolent types of lymphoma (8%) than for aggressive ones (31%). In indolent lymphoma higher Ki67 value was connected to worse treatment response (ORR; $p=0,0023$), progression free survival (PFS; $p<0,0001$; median 7 vs 23 months) and overall survival (OS; median 15 vs 67 months). For recurrent disease Ki67 expression was also found predictive for therapy effectiveness ($p=0,0009$). CPP32 expression was differentiated as low (single points or focal) or high (diffused). High expression was found in 61% of indolent lymphoma subgroup and in 38% of aggressive lymphoma subgroup. Low expression of caspase 3 caused higher survival hazard ratio comparing to high expression, median OS was 20 vs 54 months ($p=0,0221$). Patients with high expression tended to have better ORR for treatment of relapsed disease ($p=0,0663$). Correlation of high Ki67 values with low caspase 3 expression was found ($p<0,0001$). High caspase expression in taxonomy sets of factors was connected to higher peripheral blood eosinophil count in both freshly diagnosed and relapsed disease. Ann Arbor classification stratified patient effectively for ORR, PFS and OS at both first diagnosis and recurrence, but its specificity was significantly lower in relapse, for OS $p=0,0058$ and $p=0,0438$ respectively. On the contrary, IPP scale increased its prognostic importance for recurrent disease, for OS $p=0,0056$ and $p<0,0001$ respectively. Subgroup analysis has shown that BMI is prognostic for OS only in aggressive lymphoma ($p=0,044$). Concentration of haemoglobin (HGB) and serum lactate dehydrogenase (LDH) influenced OS in relapsed disease, $p<0,0001$ and $p=0,0196$ respectively. Survival hazard ratio was depending on response to treatment in both 1st and 2nd remission induction. Predictive factors for ORR in 2nd line of treatment were found, both negative (LDH, WHO performance scale, general symptoms, Ann Arbor, IPI) and positive (HGB, number of chemotherapy cycles, radiotherapy usage, time to first relapse). Maintaining full planned relative dose intensity of treatment in relapsed disease therapy, irrespective of having it in acquiring first remission, lowers death hazard ratio ($p=0,0033$).

Conclusions. In indolent lymphoma high expression of Ki67 is negative prognostic factor for objective response ratio, progression free survival and overall survival. Low expression of caspase 3 is connected with higher death hazard ratio. Patients with high expression of CPP32 have better response to treatment in relapsed disease. Peripheral blood

eosinophil count correlates with level of caspase 3 expression and OS, therefore it can be considered as equivalent for caspase 3 activity and a prognostic factor. Ann Arbor and IPI classifications stratify hazard ratio for PFS and OS for both primary and recurrent disease. In relapse functional IPI scale becomes more specific, contrary to Ann Arbor scale, declining in specificity compared to assessment in newly diagnosed disease. Good response to treatment is a prognostic factor for survival in both 1st and 2nd remission induction. Positive prognostic factors for ORR in recurrent disease were: higher haemoglobin concentration, having more cycles of chemotherapy, applying radiation therapy, longer time to relapse. Negative prognostic factors were: high serum lactate dehydrogenase activity, worse performance in WHO scale, presence of general symptoms. In treatment of relapsed lymphoma, maintaining full dose density of cytostatics, regardless of whether the planned treatment rhythm in first induction was retained, is essential to reduce the risk of death.