

## Streszczenie

### Wstęp

Szlak receptora i ligandu programowanej śmierci komórki (PD-1/PD-L1) jest szlakiem immunologicznego punktu kontrolnego, który odgrywa ważną rolę w utrzymaniu samotolerancji i kontroli nadmiernej odpowiedzi immunologicznej. Nieprawidłowe wiązanie PD-1/PD-L1 prowadzi do aktywacji kluczowej ścieżki autotolerancji zarówno w komórkach odpornościowych, jak i w komórkach nowotworowych. W niektórych typach nowotworów omawiany szlak może być wykorzystywany do tłumienia przeciwnowotworowych odpowiedzi immunologicznych poprzez deregulację ścieżek przeżycia i proliferacji. Sukcesem w dziedzinie onkologii było wprowadzenie do terapii zaawansowanego czerniaka tak zwanych inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych - anty-CTLA-4 (ipilimumabu) oraz niwolumabu, który stał się pierwszym inhibitorem PD-1, który uzyskał rejestrację regulacyjną w leczeniu czerniaka w Japonii. W ciągu następnych lat na całym świecie zarejestrowano kilka innych inhibitorów receptora PD-1 lub jego ligandów: PD-L1 i PD-L2 z pembrolizumabem, atezolizumabem, durwalumabem i awelumabem, wykazujących działanie w kilku typach raka. W nowotworach hematologicznych ta nowa strategia terapeutyczna jest znacznie mniej udokumentowana, chociaż u pacjentów z opornym na leczenie i nawrotowym chłoniakiem Hodgkina zaobserwowano obiecujące odpowiedzi kliniczne.

### Cel pracy

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowym i chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B, które to są najczęściej rozpoznawanymi chłoniakami nieziarniczymi z komórek B; analiza zależności pomiędzy badanym markerem i najważniejszymi prognostycznymi parametrami kliniczno-patologicznymi oraz wykazanie prawdopodobnego zastosowania ekspresji PD-L1 jako czynnika predykcyjnego w omawianych chorobach.

### Materiały i metody

Badanie miało charakter retrospektywny i polegało na ocenie ekspresji białka PD-L1 metodą immunohistochemiczną w materiale pooperacyjnym pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowych i chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B. Grupę badaną stanowiło 59 pacjentów, 26 z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowym (FL) i 33 z rozpoznaniem chłoniaka rozlanego z dużych limfocytów B (DLBCL). Reakcję immunohistochemiczną przeprowadzono za pomocą aparatu Autostainer Link 48 firmy Dako-Agilent przy użyciu przeciwciała anty PD-L1 (klon 22C3), izotyp: IgG1 firmy Dako-Agilent. U wszystkich pacjentów na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej analizowane były dane kliniczno-patologiczne.

## Wyniki

Wyniki analizy statystycznej danych wykazały, że w grupie pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B jest obecna ekspresja PD-L1 na poziomie niskim lub wysokim, natomiast u większości pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowym zaobserwowano brak ekspresji PD-L1.

U pacjentów z FL odnotowano obecność istotnych statystycznie związków pomiędzy stwierdzonym stopniem złośliwości choroby a poziomem ekspresji PD-L1. Obserwuje się, że brak ekspresji PD-L1 był zdecydowanie częstszy w grupach osób ze stwierdzonym niskim stopniem złośliwości – G1 oraz pośrednim stopniem złośliwości – G2. W grupie pacjentów ze stwierdzonym wysokim stopniem złośliwości choroby – G3 najczęściej obserwowano niski stopień ekspresji PD-L1, zaś brak oraz wysoki poziom ekspresji wystąpiły z taką samą częstością. Odnotowano również obecność istotnych statystycznie związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbour a poziomem ekspresji PD-L1. Obserwuje się, że osoby, których wynik na skali Ann Arbour wskazywał na ograniczone stadium choroby bez wyjątku charakteryzowały się brakiem ekspresji PD-L1. Wśród osób w zaawansowanym stadium choroby brak ekspresji zaobserwowano już tylko u 50% osób, niska ekspresja wystąpiła u 38,89% osób, a wysoka ekspresja u 11,11% osób.

U pacjentów z DLBCL w wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbour a poziomem ekspresji PD-L1 ( $p > 0,05$ ), jednak wyniki wskazują na występowanie tendencji na poziomie  $p = 0,052$  mówiącej, że odsetek osób charakteryzujących się brakiem ekspresji PD-L1

jest wyższy w grupie osób w ograniczonym stadium choroby (14,29%; 2 osoby) niż w grupie w zaawansowanym stadium choroby (0%). Niski poziom ekspresji dwukrotnie częściej występował u osób w zaawansowanym stadium choroby (68,42%; 13 osób) niż u osób w ograniczonym stadium (35,71%; 5 osób). Co ciekawe, wyższy odsetek wystąpień wysokiego poziomu ekspresji PD-L1 zaobserwowano w grupie w ograniczonym stadium choroby (50%; 7 osób) niż u osób w zaawansowanym stadium choroby.

### Wnioski

1. W DLBCL jest obecna ekspresja PD-L1 na poziomie niskim lub wysokim a w FL w większości przypadków nie występuje ekspresja PD-L1.
2. W grupie pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowym wysoki stopień złośliwości histologicznej predysponuje do obecności ekspresji PD-L1 na poziomie niskim lub wysokim.
3. W grupie pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowym ograniczone stadium choroby wg skali Ann Arbour charakteryzuje się brakiem ekspresji PD-L1.
4. W grupie pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B istnieje tendencja do braku ekspresji PD-L1 w stadium ograniczonym choroby wg skali Ann Arbour.
5. Nie stwierdzono związków istotnych statystycznie pomiędzy międzynarodowym wskaźnikiem rokowniczym FLIPI (dla FL) oraz IPI (dla DLBCL) a ekspresją PD-L1; dlatego prawdopodobnie ekspresja PD-L1 nie znajduje zastosowania jako czynnik predykcyjny w omawianych chorobach.

## Summary

### Introduction

The programmed cell death (PD-1/PD-L1) receptor and ligand pathway is an immune checkpoint pathway that plays an important role in maintaining self-tolerance and the control of excessive immune responses. Incorrect binding of PD-1/PD-L1 leads to the activation of a key autotolerance pathway in both immune and neoplastic cells. In some types of cancer, this pathway can be used to suppress anti-tumor immune responses by deregulating survival and proliferation pathways. A success in the field of oncology was the introduction of so-called immune checkpoint inhibitors - anti-CTLA-4 (ipilimumab) and nivolumab, which became the first PD-1 inhibitor to obtain regulatory approval in the treatment of advanced melanoma in Japan. In the years that followed, several other inhibitors of the PD-1 receptor or its ligands were registered worldwide: PD-L1 and PD-L2 with pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab and avelumab, showing activity in several types of cancer. In hematological malignancies this new therapeutic strategy is much less documented, although promising clinical responses have been observed in patients with refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma.

### Purpose

The aim of this dissertation was to evaluate PD-L1 expression in a group of patients diagnosed with follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma, which are the most frequently diagnosed B-cell non-Hodgkin's lymphomas; analysis of the relationship between the investigated marker and the most important prognostic clinical and pathological parameters and demonstration of the likely use of PD-L1 expression as a predictive factor in these diseases.

### Material and methods

The study was retrospective and consisted of the evaluation of PD-L1 protein expression by immunohistochemistry in the postoperative material of patients with diagnosed follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. The study group consisted of 59 patients, 26 with diagnosed follicular lymphoma (FL) and 33 with diagnosed diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). The immunohistochemical reaction was performed with Dako-Agilent's Autostainer

Link 48 using an anti-PD-L1 antibody (clone 22C3), isotype: IgG1 from Dako-Agilent. Clinical and pathological data were analyzed in all patients based on the available medical documentation.

## Results

The results of statistical analysis of the data showed that in the group of patients diagnosed with diffuse large B-cell lymphoma, PD-L1 expression was low or high, while the majority of patients with diagnosed follicular lymphoma lacked PD-L1 expression.

In patients with FL, statistically significant relationships were found between the degree of malignancy of the disease and the level of PD-L1 expression. It has been observed that the lack of PD-L1 expression was by far the most common in the groups of people with diagnosed low grade - G1 and intermediate grade - G2. In the group of patients with diagnosed high grade of disease - G3, low PD-L1 expression was most often observed, while the absence and high level of expression occurred with the same frequency. There were also statistically significant relationships between the Ann Arbor score and the level of PD-L1 expression. It is observed that people whose Ann Arbor score indicated a limited disease stage were all characterized by a lack of PD-L1 expression. Among people with advanced disease, lack of expression was observed in only 50% of people, low\_expression occurred in 38.89% of people, and high expression in 11.11% of people.

In DLBCL patients, the analysis did not confirm the presence of statistically significant relationships between the Ann Arbor score and the level of PD-L1 expression ( $p > 0.05$ ), but the results indicate a trend at the level of  $p = 0.052$ , saying that the percentage of people with a lack of PD-L1 expression is higher in the group of people qualified for the limited stage of the disease (14.29%; 2 people) than in the group of people qualified for the advanced stage of the disease (0%). Low expression levels were twice as likely to occur in people with advanced disease (68.42%; 13 people) than in those with limited stages (35.71%; 5 people). Interestingly, a higher percentage of high levels of PD-L1 expression was observed in the group with a limited stage of the disease (50%; 7 people) than in those with the advanced stage of the disease.

## Conclusions

1. PD-L1 expression is low or high in DLBCL and PD-L1 is not expressed in most cases in FL.
2. In the group of patients with diagnosed follicular lymphoma, a high degree of histological malignancy predisposes to the presence of PD-L1 expression at a low or high level.
3. In the group of patients diagnosed with follicular lymphoma, the limited disease stage according to the Ann Arbor scale is characterized by the lack of PD-L1 expression.
4. In the group of patients diagnosed with diffuse large B-cell lymphoma, there is a tendency to the lack of PD-L1 expression in the limited stage of the disease according to the Ann Arbor scale.
5. No statistically significant relationships were found between the international prognostic index FLIPI (for FL) and IPI (for DLBCL) and PD-L1 expression; therefore, probably PD-L1 expression is not applicable as a predictive factor in the discussed diseases.