



UNIwersYTET MEDYczNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Patologii Klinicznej i Doświadczalnej

Joanna Spętana

**Ekspresja PD-L1 w wybranych chłoniakach
nieziarniczych B-komórkowych**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:
prof. dr hab. n. med. Michał Jeleń

Wrocław 2021

Recenzenci:

prof. dr hab. Janusz B. Dzięcioł

Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka
Prorektor ds. Klinicznych i Szkolenia Zawodowego
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

dr hab. Andrzej Wojnar, profesor nadzwyczajny WSF

Zakład Patomorfologii
Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu

Podziękowania

Serdeczne podziękowania składam Panu Profesorowi Michałowi Jeleniowi za ogromną pomoc w realizacji projektu.

Panu dr n. med. Arturowi Lipińskiemu za cenne rady i wskazówki dotyczące pisania tej pracy doktorskiej, Pani mgr Teresie Szkudlarek za pomoc w przygotowaniu preparatów immunohistochemicznych oraz mojej rodzinie za cierpliwość i wsparcie.

Spis treści

Spis tabel.....	6
Spis rycin.....	8
Wykaz skrótów.....	10
1. Wstęp.....	13
2. Szlak PD-1/PD-L1.....	16
3. Immunoterapia nowotworów.....	19
4. Chłoniak grudkowy - Follicular lymphoma (FL).....	22
4.1. Etiologia.....	22
4.2. Morfologia komórki.....	23
4.3. Rozpoznanie.....	24
4.4. Objawy kliniczne.....	25
4.5. Leczenie i rokowanie.....	26
4.6. Rola mikrośrodowiska nowotworu.....	27
5. Chłoniak rozlany z dużych komórek B - Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).....	28
5.1. Etiologia.....	28
5.2. Podział.....	29
5.3. Morfologia komórki.....	30
5.4. Rozpoznanie.....	31
5.5. Objawy kliniczne.....	32
5.6. Leczenie i rokowanie.....	32
5.7. Nowe strategie leczenia.....	35
6. Założenia i cel pracy.....	37
7. Materiał i metodyka.....	39
7.1. Charakterystyka grupy badanej.....	39
7.2. Metoda oceny ekspresji PD-L1.....	41
7.3. Analiza statystyczna.....	43
8. Wyniki.....	44
8.1. Ekspresja PD-L1 w preparatach tkankowych grupy badanej.....	44
8.2. Analiza porównawcza poziomu ekspresji PD-L1 pomiędzy grupą pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym a grupą pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B.....	47
8.3. Analiza związków pomiędzy poziomem ekspresji PD-L1 a wskazaniami najważniejszych prognostycznych parametrów kliniczno-patologicznych w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym.....	48

8.4. Analiza związków pomiędzy poziomem ekspresji PD-L1 a wskazaniami najważniejszych prognostycznych parametrów kliniczno-patologicznych w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B.....	58
9. Omówienie wyników.....	67
10. Dyskusja.....	69
11. Ograniczenia pracy.....	74
12. Wnioski.....	75
13. Streszczenie.....	76
14. Summary.....	79
15. Piśmiennictwo.....	82

Spis tabel

- Tabela 1. Stopnie złośliwości chłoniaka grudkowego
- Tabela 2. Międzynarodowy wskaźnik rokowniczy (FLIPI) dla powolnych chłoniaków nie-Hodgkina
- Tabela 3. Klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaków pierwotnie węzłowych według klasyfikacji z Lugano (2014) zmodyfikowana klasyfikacja z Ann Arbour
- Tabela 4. Międzynarodowy wskaźnik rokowniczy (IPI) dla agresywnych chłoniaków nie-Hodgkina
- Tabela 5. Skala sprawności wg Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)
- Tabela 6. Analiza grupy badanej pod kątem rozkładu płci
- Tabela 7. Analiza podstawowych statystyk opisujących poziom wieku badanej grupy
- Tabela 8. Analiza grupy badanej pod kątem rozkładu wieku
- Tabela 9. Tumor Proportion Score, TPS
- Tabela 10. Wyniki analizy związków pomiędzy zdiagnozowanym typem chłoniaka a poziomem ekspresji PD-L1
- Tabela 11. Wyniki analizy związków pomiędzy wiekiem badanych a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym
- Tabela 12. Wyniki analizy związków pomiędzy stwierdzonym stopniem złośliwości choroby a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym
- Tabela 13. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Hb a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym
- Tabela 14. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbour a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym
- Tabela 15. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym
- Tabela 16. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali FLIPI a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym
- Tabela 17. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym
- Tabela 18. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym
- Tabela 19. Wyniki analizy związków pomiędzy wiekiem badanych a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych

limfocytów B

- Tabela 20. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Hb a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B
- Tabela 21. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbour a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B
- Tabela 22. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B
- Tabela 23. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali IPI a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B
- Tabela 24. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B
- Tabela 25. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

Spis rycin

- Rycina 1. Mechanizm przekazywania sygnału hamującego przez PD-1 w limfocytach T
- Rycina 2. Zahamowanie aktywności limfocytów T poprzez punkty kontrolne oraz ich reaktywacja po związaniu przeciwciał monoklonalnych z receptorem PD-1
- Rycina 3. Struktura PD-1
- Rycina 4. Wykres prezentujący wyniki analizy grupy badanej pod kątem rozkładu płci
- Rycina 5. Wykres prezentujący wyniki analizy grupy badanej pod kątem rozkładu wieku
- Rycina 6. Ekspresja PD-L1 $<1\%$ u pacjenta z FL (powiększenie 400 \times)
- Rycina 7. Ekspresja PD-L1 1 - 49% u pacjenta z FL (powiększenie 400 \times)
- Rycina 8. Ekspresja PD-L1 $\geq 50\%$ u pacjenta z FL (powiększenie 400 \times)
- Rycina 9. Ekspresja PD-L1 $<1\%$ u pacjenta z DLBCL (powiększenie 400 \times)
- Rycina 10. Ekspresja PD-L1 1 - 49% u pacjenta z DLBCL (powiększenie 400 \times)
- Rycina 11. Ekspresja PD-L1 $\geq 50\%$ u pacjenta z DLBCL (powiększenie 400 \times)
- Rycina 12. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy zdiagnozowanym typem chłoniaka a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 13. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wiekiem a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 14. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy stwierdzonym stopniem złośliwości choroby a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 15. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wartością Hb a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 16. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbour a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 17. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 18. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali FLIPI a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 19. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem ekspresji Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 20. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 21. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wiekiem a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 22. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Hb a poziomem

ekspresji PD-L1

- Rycina 23. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbour a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 24. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 25. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali IPI a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 26. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1
- Rycina 27. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1

Wykaz skrótów:

- ABC – (*ang. activated B-cell*) – aktywowane obwodowe limfocyty B
- ACD – (*ang. anemia of chronic disorders*) – niedokrwistości chorób przewlekłych
- AIDS – (*ang. acquired immune deficiency syndrome*) – zespół nabytego niedoboru odporności
- APCs – (*ang. antigen presenting cells*) – komórka prezentująca antygen
- ASCT – (*ang. autologous hematopoietic stem cell transplant*) – autologiczny przeszczep komórek krwiotwórczych
- BCL2 – (*ang. B-cell lymphoma 2 protein*)
- BCL6 – (*ang. B-cell lymphoma 6 protein*)
- BCLU – (*ang. B-cell lymphoma, unclassifiable*) – niezklasyfikowany chłoniak z komórek B
- BCR – (*ang. B-cell receptor*) – receptor limfocytów B
- BL – (*ang. Burkitt lymphoma*) – chłoniak Burkitta
- CAR-T – (*ang. chimeric antigen receptor*) – chimeryczny receptor antygenowy komórek T
- CD: 4, 5, 10, 11c, 19, 21, 23, 28, 43, 79a, 80, 86, 206, 209, 279 – (*ang. cluster of differentiation*)
- cDNA – (*ang. complementary DNA*) – komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy
- CNS – (*ang. central nervous system*) – ośrodkowy układ nerwowy
- CTLA-4 – (*ang. cytotoxic T cell antigen 4*) – białko związane z cytotoksycznymi limfocytami T
- DLBCL – (*ang. Diffuse large B-cell lymphoma*) – chłoniak rozlany z dużych komórek B
- DNA – (*ang. deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy
- DPW – duże pole widzenia
- EBV – (*ang. Epstein-Barr virus*) – wirus Ebsteina-Barr
- ECOG – (*ang. Eastern Cooperative Study Group*)
- FDA – (*ang. Food and Drug Administration*) – Agencji ds. Żywności i Leków
- FL – (*ang. follicular lymphoma*) – chłoniak grudkowy
- FLIPI – (*ang. Follicular Lymphoma International Prognostic Index*) – międzynarodowy wskaźnik prognostyczny dla chłoniaka grudkowego
- Foxp3 – (*ang. forkhead box p3*) – czynnik transkrypcyjny
- GC – (*ang. germinal center*) – centrum namnażania
- GCB – (*ang. germinal centre B-cell*) – komórki ośrodków namnażania
- Hb – (*ang. hemoglobin*) – hemoglobina
- HL – (*ang. Hodgkin lymphoma*) – chłoniak Hodgkina
- ICOS – (*ang. inducible co-stimulator*)
- IEGS – (*ang. Immune Escape Gene Set*) – szlaki unikania odpowiedzi przeciwnowotworowej
- IFN γ – (*ang. interferon gamma*) – interferon gamma

IF-RT – (*ang. involved field radiotherapy*)

IgG – (*ang. immunoglobulin G*) – immunoglobulina G

IgM – (*ang. immunoglobulin M*) – immunoglobulina M

IHC – (*ang. immunohistochemistry*) – immunohistochemia

IL 12 – (*ang. interleukin 12*) – interleukina 12

IL 2 – (*ang. interleukin 2*) – interleukina 2

IPI – (*ang. International Prognostic Index*) – Międzynarodowy Indeks Prognostyczny

IRF4 – (*ang. Interferon Regulatory Factor 4 protein*)

ITIM – (*ang. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) – domena wewnątrzkomórkowa hamująca immunoreceptor tyrozyny

ITSM – (*ang. immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) – przełącznik immunoreceptorowy oparty na tyrozynie

Ki67 – indeks proliferacyjny

LAG 3 – (*ang. lymphocyte-activation gene 3*) – gen aktywujący limfocyty

LDH – (*ang. lactate dehydrogenase*) – dehydrogenaza mleczanowa

MHC – (*ang. major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej

mRNA – (*ang. messenger RNA*) – matrycowy kwas rybonukleinowy

MUM1 – (*ang. multiple myeloma oncogene 1*)

MYC – czynnik transkrypcyjny, proto-onkogen

NFκ – (*ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer*)

NGS – (*ang. next-generation sequencing*) – sekwencjonowanie nowej generacji

NHL – (*ang. non Hodgkin lymphoma*) – chłoniak nieziarniczny

NOS – (*ang. not otherwise specified*) – niesklasyfikowane inaczej

ORR – (*ang. overall response rate*) – całkowity odsetek odpowiedzi

OS – (*ang. overall survival*) – czas przeżycia całkowitego

p53 – (*ang. protein 53*) – białko 53

PCDLBCL – (*ang. primary cutaneous DLBCL, leg type*) – pierwotny skórny DLBCL typu kończynowego

PD-1 – (*ang. programmed death receptor-1*) – receptor programowanej śmierci 1

PD-L1 – (*ang. programmed death-ligand 1*) – ligand dla receptora PD-1

PD-L2 – (*ang. programmed death-ligand 2*) – ligand dla receptora PD-1

PFS – (*ang. progression free survival*) – przeżycie wolne od progresji

PKCθ – (*ang. protein kinase*) – kinaza białkowa Cθ

R-CHOP – skrót od nazw następujących leków: Rytuksymab – przeciwciało monoklonalne anty CD-20, Cyklofosfamid, Doksorubicyna (nazwa chemiczna Hydroxydaunomycyna), winkrystyna

(początkowa nazwa - Oncovin), Prednizolon (glikokortykosteroid)
RR – (*ang. relapsed/refractory*) – nawracający, oporny na leczenie
SHP-2 – (*ang. Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*) – kinaza Src-podobna
SHP-1 – (*ang. Src homology phosphatase-1*) – kinaza Src-podobna,
TCR – (*ang. T-cell receptor*) – receptor limfocytów T
THRLCBL – (*ang. T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma*) – chłoniak z dużych komórek B z licznymi komórkami T i/lub histiocytami
TILs – (*ang. tumor infiltrating lymphocytes*) – limfocyty naciekające guz
TIM3 – (*ang. T-cell immunoglobulin, mucin-domain containing-3*)
TNFR – (*ang. tumor necrosis factor receptor*) – receptor czynnika martwicy nowotworów
TNF α – (*ang. tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy nowotworu alfa
TPS – (*ang. Tumor Proportion Score*) – stopień wybarwienia guza
WHO – (*ang. World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia
ZAP-70 – (*ang. Zeta-chain-associated protein kinase 70*)

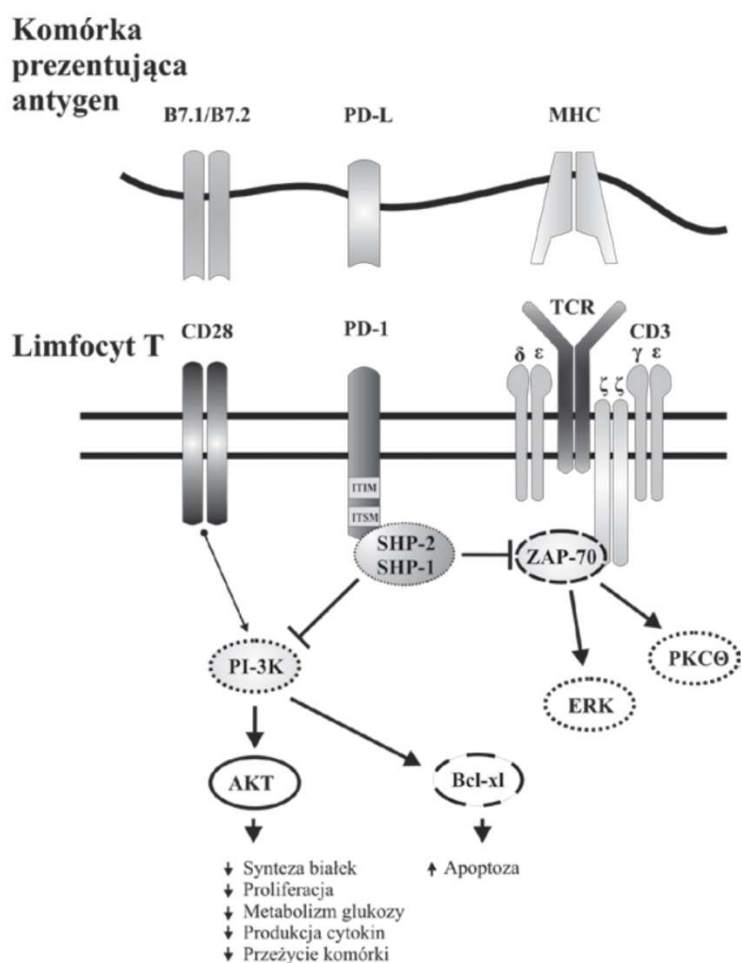
1. Wstęp

Chłoniaki nieziarnicze B-komórkowe (ang. non-Hodgkin lymphoma, NHL) to grupa chorób nowotworowych charakteryzująca się klonalnym rozrostem komórek limfoidalnych odpowiadających różnym stopniom zróżnicowania prawidłowych limfocytów B. Stanowią grupę chorób zróżnicowanych pod względem patogenezы, obrazu morfologicznego i klinicznego. Najczęściej występującymi chłoniakami nieziarniczymi B-komórkowymi są chłoniak rozlany z dużych limfocytów B i chłoniak grudkowy. Zrozumienie zagadnienia ekspresji PD-L1 w komórkach nowotworowych chłoniaków nieziarnicznych wymaga znajomości podstaw działania ludzkiego układu odpornościowego. Odpowiedź immunologiczną organizmu możemy podzielić na:

1. Odporność wrodzoną, która jest dziedziczna i obejmuje bariery mechaniczne w postaci skóry, błon śluzowych; siły mechaniczne np. ruch rzęsek nabłonka oskrzelowego w drogach oddechowych; substancje wydzielnicze np. lizozym zawarty w ślinie.
2. Odporność nabytą, która jest związana ze swoistymi reakcjami immunologicznymi wywołanymi przez antygeny. Jest to złożony system reakcji komórkowych i humoralnych, którego indukcja następuje w wyniku powtarzających się ekspozycji na dany antygen (szczepienie, zakażenie) [1].

W przebiegu nabytej odpowiedzi immunologicznej reakcja antygen – przeciwciało jest wielokrotniana poprzez wiele zdarzeń, w które zaangażowane są komórki układu odpornościowego takie jak makrofagi, granulocyty oraz produkowane przez nie cytokiny. Rozpoznawanie niepożądanych antygenów jest wysoce selektywne. Wymaga złożonej i wielostopniowej regulacji w celu uniknięcia reakcji przeciwko zdrowym komórkom organizmu. Istnieją mechanizmy centralnej i obwodowej tolerancji wobec własnych antygenów. Poziom selekcji odpowiedzialny za centralną tolerancję niszczy większość autoreaktywnych komórek układu odpornościowego, jednak nie jest to mechanizm całkowicie szczelny i możliwe jest przedostawanie się takich komórek do narządów obwodowych. Do rozpoznawania i eliminacji autoreaktywnych komórek służą mechanizmy tolerancji obwodowej. Zaburzenie działania tych mechanizmów prowadzi do rozwoju chorób autoimmunologicznych [2]. Do takich mechanizmów należą negatywne cząsteczki kostymulujące oraz regulatorowe limfocyty T (T regulatory cells). Odgrywają one rolę w regulacji aktywacji, funkcji i proliferacji komórek autoreaktywnych. Ważną rolę w aktywowaniu dziewiczych limfocytów T odgrywają sygnały płynące od receptora limfocytów T (TCR; T-cell receptor) rozpoznającego antygen oraz od receptorów kostymulujących. Funkcją tych cząsteczek jest zapewnienie równowagi pomiędzy efektywną odpowiedzią immunologiczną, a tolerancją na autoantygeny. Molekułą odgrywającą regulatorową rolę w odpowiedzi immunologicznej jest receptor programowanej śmierci 1 (programmed death receptor-1; PD-1; CD279). Do aktywacji limfocytów T wymagane jest

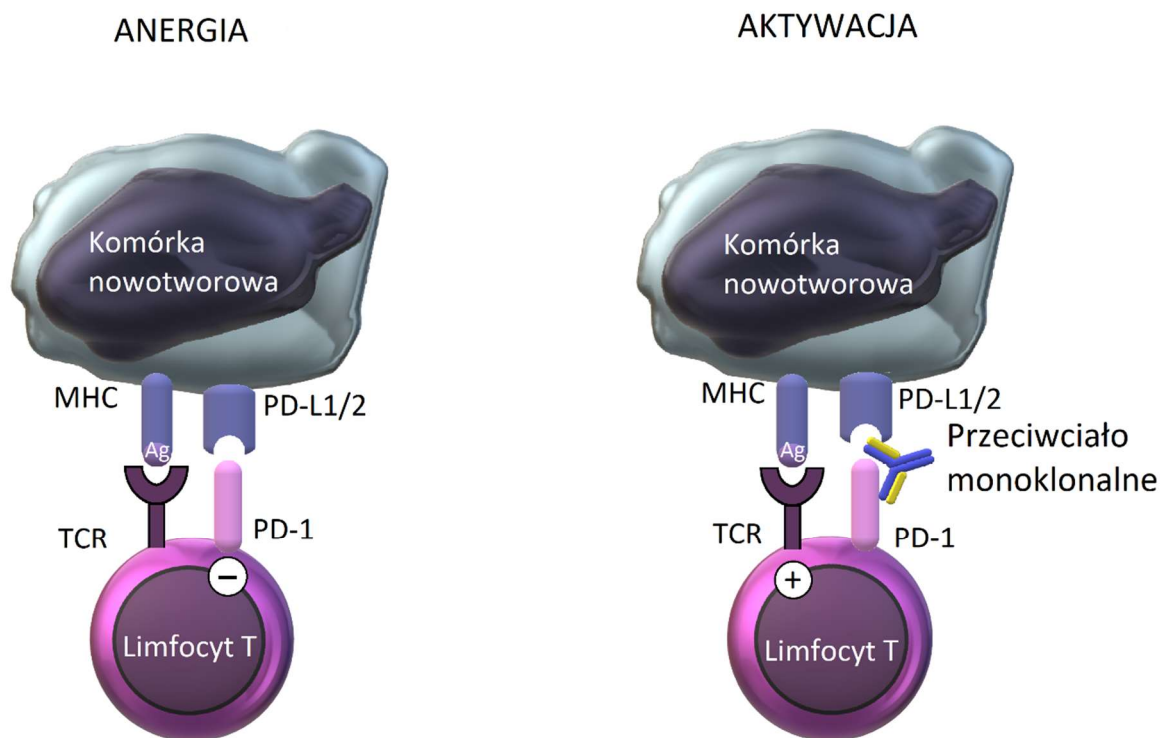
otrzymanie przynajmniej dwóch sygnałów. Pierwszy z nich to rozpoznanie przez główny receptor limfocytów T (TCR) antygenowego peptydu zaprezentowanego przez główny układ zgodności tkankowej (MHC; major histocompatibility complex). Samo rozpoznanie antygeny jest niewystarczające do aktywacji. Ostateczna siła i jakość odpowiedzi immunologicznej jest regulowana przez równowagę między sygnałami stymulującymi i hamującymi, są to tak zwane punkty kontrolne odporności [3]. Drugi sygnał płynie od receptorów zlokalizowanych na powierzchni limfocytów łączących się z odpowiednimi molekułami na powierzchni komórek prezentujących antygen (APCs; antygen presenting cells). Do takich immunoreceptorów należą cząsteczki z rodziny CD28 (np.: CTLA-4, ICOS, PD-1) czy rodziny CD40 - członek nadrodziny receptora czynnika martwicy nowotworów (TNFR) [4,5]. Rycina 1. przedstawia schemat aktywacji limfocytów T.



Rycina 1. Mechanizm przekazywania sygnału hamującego przez PD-1 w limfocytach T. Hamujący wpływ sygnału z receptora PD-1 na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe w limfocytach T oddziałujących z komórką prezentującą antygen. PD-1 – receptor programowanej śmierci 1 (ang. programmed death 1); ITSM – immunoreceptor tyrosine-based switch motif; ITIM – immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; TCR/CD3 – kompleks receptora limfocytów T z CD3; α, β, γ, δ, ζ – podjednostki CD3; PKCθ – kinaza białkowa Cθ; ERk – extracellular-signal regulated kinase; Bcl-xL – białko B-cell lymphoma extra large; AKT – kinaza białkowa B (Pkb); MHC – główny układ zgodności tkankowej; PD-L – ligand Pd-1; B7.1 i B7.2 – ligandy Cd28, SHP-2 - (ang. Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2), kinaza Src-podobna, SHP-1 - (ang. Src homology phosphatase-1), kinaza Src-podobna, ZAP-70 – ang. Zeta-chain-associated protein kinase 70, PI-3K - Kinaza PI-3K. Na podstawie [6].

Aktywowane swoiście do odpowiedzi przeciwnowotworowej limfocyty wytwarzają szereg immunostymulujących cytokin (np. interleukina 2 i 12 – IL-2, IL-12). Są również zdolne do niszczenia komórek nowotworowych, wywołując ich programowaną śmierć - apoptozę poprzez wytwarzanie enzymów proteolitycznych. Punkty kontrolne odnoszą się do wielu szlaków hamujących połączonych z układem odpornościowym [7]. Ważne jest także otrzymanie drugiego sygnału, ponieważ limfocyt, który otrzyma jedynie sygnał płynący od receptora TCR wejdzie w stan odwracalnej anergii charakteryzujący się brakiem aktywacji oraz niewrażliwością na kolejne pobudzenia antygenem. Wyczerpanie limfocytów T jest szczególnym stanem dysfunkcji limfocytów T u pacjentów z przewlekłym zakażeniem lub nowotworami złośliwymi. Podczas przewlekłego zakażenia patogeny i układ odpornościowy gospodarza walczą ze sobą przez długi czas, co ostatecznie prowadzi do funkcjonalnego wyczerpania komórek odpornościowych. Cechy charakterystyczne wyczerpania komórek T w przewlekłym zakażeniu obejmują dysfunkcję komórek T, o czym świadczy zwiększona ekspresja receptorów hamujących (np. PD-1, CTLA-4 lub TIM-3) i obniżona produkcja cytokin (np. TNF α , IFN γ lub IL-2). Analogicznie do wyczerpania limfocytów T u pacjentów z przewlekłą infekcją, limfocyty T w bliskim środowisku nowotworów mogą również ulec wyczerpaniu z powodu ciągłej stymulacji antygenami nowotworowymi [8,9]. Obecnie na podstawie badań naukowych wiadomo, że ekspresja białek kontrolnych układu odpornościowego może być rozregulowana przez nowotwory i stanowić ważny mechanizm ich oporności na działanie układu immunologicznego. W piśmiennictwie można spotkać zagadnienie "ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego". Jednym z ważnych mechanizmów unikania odpowiedzi immunologicznej przez komórki nowotworowe jest indukowanie immunosupresyjnego środowiska w guzie. Odbywa się to na kilka sposobów, a jednym z głównych mechanizmów jest aktywacja receptorów hamujących, tzw. punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej, na limfocytach T. Aktywność limfocytów T jest ściśle regulowana, m.in. poprzez aktywację hamujących punktów kontrolnych obecnych na ich powierzchni, takich jak receptor PD-1 czy CTLA-4. Aktywacja tych receptorów odbywa się po połączeniu z odpowiednimi ligandami białkowymi, zlokalizowanymi na komórkach nowotworowych, na przykład ligandu PD-L1 dla receptora PD-1 lub innych komórkach obecnych w mikrośrodowisku guza. Ponieważ wiele immunologicznych punktów kontrolnych jest inicjowanych przez interakcje ligand-receptor, można je łatwo blokować przeciwciałami lub modulować przez rekombinowane formy ligandów lub receptorów. Przeciwciała skierowane przeciwko białku związanemu z cytotoksycznymi limfocytami T (anty-CTLA4) były pierwszymi z tej klasy leków immunoterapeutycznych, które uzyskały aprobatę amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA). Wstępne odkrycia kliniczne dotyczące blokerów dodatkowych białek kontrolnych układu odpornościowego, takich jak białko programowanej śmierci komórkowej (PD-L1), wskazują na szerokie i różnorodne możliwości

zwiększenia odporności przeciwnowotworowej oraz uzyskania trwałych odpowiedzi klinicznych [7]. Trwają badania kliniczne testujące skuteczność tych i innych przeciwciał monoklonalnych rozpoznających punkty kontrolne w leczeniu nowotworów litych i hematologicznych. Blokowanie aktywności limfocytów T poprzez aktywację punktów kontrolnych oraz hamowanie tego procesu za pomocą przeciwciał monoklonalnych przedstawiono na rycinie 2.

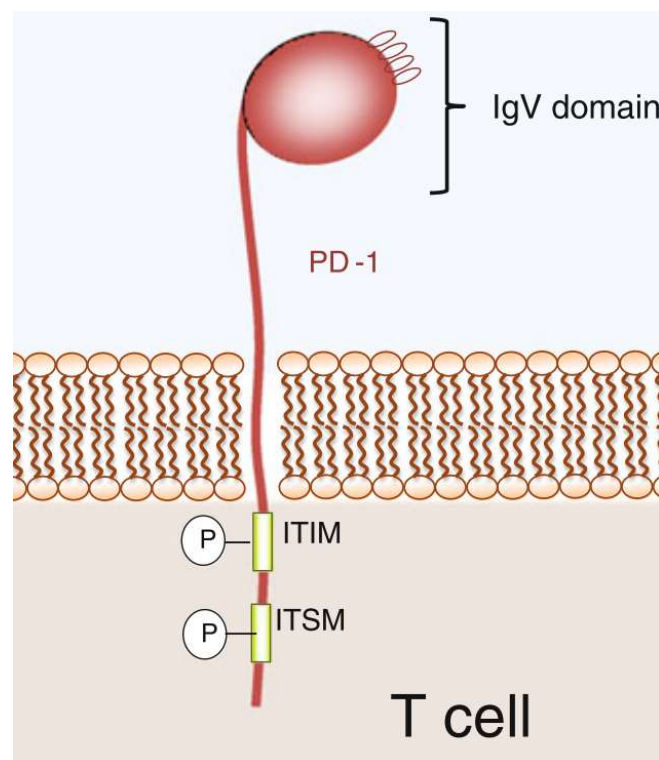


Rycina 2. Zahamowanie aktywności limfocytów T (anergia) poprzez punkty kontrolne oraz ich reaktywacja po związaniu przeciwciała monoklonalnego z receptorem PD-1. MHC – główny antygen zgodności tkankowej, TCR – receptor limfocytów T, PD-L1/2 – ligandy receptora PD-1. (Rycina własna)

2. Szlak PD-1/PD-L1

PD-1 jest białkiem kodowanym przez gen *pdcd-1* znajdującym się na ludzkim chromosomie 2, w którym znajduje się 5 eksonów. Jest białkiem transbłonowym typu I zbudowanym z 288 aminokwasów składającym się z domeny immunoglobuliny (Ig), krótkiego trzonu aminokwasu, domeny transbłonowej i domeny wewnątrzkomórkowej hamującej immunoreceptor tyrozyny (ITIM) [4]. Plan budowy glikoproteinowej cząsteczki PD-1 (50–55 kDa) jest podobny do pozostałych członków rodziny CD28. Schemat budowy PD-1 został przedstawiony na rycinie 3. PD-1 zostało zakwalifikowane do rodziny CD28 ze względu na podobieństwo w strukturze oraz funkcji modulującej wobec limfocytów. W rodzinie CD28 można wyróżnić receptory stymulujące

oraz hamujące aktywację limfocytów. PD-1 jest białkiem powierzchniowym wykrytym w cytoplazmie limfocytów T o funkcjach regulatorowych, w limfocytach regulatorowych Foxp3+ i w dziewiczych limfocytach CD4+ [10]. Zakres ekspresji PD-1 jest cechą wyróżniającą ten receptor w rodzinie CD28, ponieważ ekspresja na przykład CTLA-4 i ICOS ogranicza się do limfocytów T. W sposób indukowany PD-1 ulega ekspresji w aktywowanych limfocytach T i B, monocytach i części komórek dendrytycznych. Ligandami dla receptora PD-1 są transbłonowe glikoproteiny typu I należące do rodziny B7: PD-L1 (B7-H1, CD274) oraz PD-L2 (B7-DC, CD273). Ekspresja ligandów dla receptora PD-1 jest zróżnicowana. PD-L1 znajduje się na powierzchni limfocytów T i B, monocytów, komórek dendrytycznych, a jego ilość zwiększa się wraz z aktywacją tych komórek [11,12]. Część ta znajduje się także na wielu rodzajach komórek niehematopoetycznych, między innymi na komórkach śródbłonna naczyniowego, wysepkach trzustkowych, neuronach, astrocytach i komórkach trofoblastu łożyska. W 2001 roku opisano PD-L2 jako drugi ligand dla PD-1, również wywierający hamujący efekt na limfocyty T [13]. Zakres ekspresji dla PD-L2 jest dużo mniejszy i ogranicza się do komórek dendrytycznych i monocytów [14].



Rycina 3. Struktura PD-1. ITIM - domena wewnątrzkomórkowa hamująca immunoreceptor tyrozyny, ITSM – przełącznik immunoreceptorowy oparty na tyrozynie. Na podstawie [15].

PD-1 został zidentyfikowany w 1992 roku przez Honjo i współpracowników z Uniwersytetu w Kioto jako cząsteczka biorąca udział w programowanej śmierci komórek podczas selekcji grasicy z limfocytami T. Grupa badała dwie linie komórkowe: hematopoetyczną linię komórek progenitorowych (LyD9), która indukuje zaprogramowaną śmierć komórki po usunięciu

interleukiny 3 oraz mysią hybrydomę komórek T (2B4.11), która ulega zaprogramowanej śmierci komórkowej po stymulacji za pomocą octanu tetradekanoiloforbolu i jonomycyny [16]. Obie linie komórkowe indukowały syntezę RNA i białek w trakcie apoptozy. Następnie grupa przeprowadziła hybrydyzację subtraktywną, w celu zidentyfikowania genu odpowiedzialnego za indukcję. Stworzyli dwie komplementarne biblioteki DNA (cDNA), odejmując zbiorcze mRNA komórek spoczynkowych od zbiorczego mRNA umierających komórek w badanych liniach komórkowych. Kolejno przeszukali powstałe biblioteki pod kątem wspólnych genów [17]. Podejrzewano, że PD-1 jest transbłonowym białkiem typu I, jednak nadekspresja cDNA PD-1 w tych liniach komórkowych nie wywołała apoptozy [18]. Funkcja PD-1 pozostawała niejasna, dopóki ta sama grupa w 1999 roku nie odkryła, że PD-1 negatywnie reguluje odpowiedź immunologiczną, ponieważ myszy z niedoborem PD-1 spontanicznie rozwinęły toczniowe zapalenie stawów i kłębuszkowe zapalenie nerek [19]. Dowiodło to roli receptora PD-1 w hamowaniu reakcji autoimmunizacyjnych poprzez negatywną regulację proliferacji i produkcji cytokin przez limfocyty T [20]. Identyfikacja ligandów dla tego receptora stała się ważnym etapem poznania mechanizmu jego działania. Opisanie PD-L1 i PD-L2 pozwoliło stwierdzić, że PD-1 reguluje odpowiedź immunologiczną poprzez hamowanie aktywacji limfocytów [21].

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 przez deregulację ścieżek przeżycia i proliferacji [22]. Komórki nowotworowe w celu przetrwania wykształcają mechanizmy zapobiegające rozpoznaniu ich przez elementy układu odpornościowego. Wykazują również zdolność do modulowania własnego mikrośrodowiska oraz własnego fenotypu poprzez ekspresję elementów rozpuszczalnych i powierzchniowych, w celu hamowania funkcji komórek efektorowych. Ligandy dla receptora PD-1, czyli PD-L1 lub PD-L2 są wyrażane na różnych komórkach odpornościowych (makrofagach, komórkach dendrytycznych i limfocytach w mikrośrodowisku guza) oraz na samych komórkach nowotworowych. Receptor PD-1 po związaniu z ligandami przekazuje sygnały hamujące w celu osłabienia proliferacji i funkcji komórek T, co prowadzi do wyczerpania komórek T i tym samym braku działania cytotoksycznego i braku niszczenia komórek nowotworowych [23].

Mechanizm, w jaki komórki nowotworowe modułują własną ekspresję PD-L1 bądź ekspresję PD-1 na limfocytach efektorowych nie jest całkowicie wyjaśniony. Jest to całe spektrum mechanizmów molekularnych, z których niektóre nie są ściśle genetyczne (mechanizmy pośrednie),

a inne głównie genetyczne i epigenetyczne (mechanizmy bezpośrednie) [22]. W warunkach *in vitro* ekspresja

PD-L1 ulega indukcji pod wpływem interferonu typu I (α , β) i II (γ), oraz w mniejszym stopniu TNF- α . Ekspresja PD-L1 na komórkach nowotworowych świeżo pobranych *ex vivo* jest większa niż na komórkach hodowanych *in vitro*. Ze względu na wpływ cytokin może to sugerować, że mikrośrodowisko nowotworu ma wpływ na kształtowanie ekspresji elementów szlaku PD-1/PD-L1 [24].

Intensywne badania określające ekspresję ligandów PD-1 w komórkach nowotworowych trwają od kilku lat. Zaobserwowano ekspresję PD-L1 w wielu ludzkich nowotworach, takich jak: rak płuca, prostaty, okrężnicy, żołądka, nerki, piersi, pęcherza, w nowotworach głowy i szyi oraz komórkach glioblastomy i czerniaka. Jednocześnie nie wykazano takiej ekspresji na zdrowych komórkach pochodzących z tych narządów [24]. Doświadczenia na modelach zwierzęcych pozwoliły zaobserwować osłabienie kontroli układu immunologicznego nad rozrostem nowotworów w przypadku nadekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych oraz indukcję apoptozy limfocytów specyficznych do komórek nowotworowych [25].

3. Immunoterapia nowotworów

Dziedziny immunologii i onkologii są ze sobą ściśle powiązane od końca XIX wieku, kiedy to chirurg William Coley dowiódł, że wstrzyknięcie zabitych bakterii w miejsce mięsaka może prowadzić do zmniejszenia się rozmiarów guza. Eksperyment medyczny Coleya wykonany na początku maja 1891 r. polegał na indukcji róży - ostrego stanu zapalnego skóry i tkanki podskórnej. Charakteryzuje się ona wysoką temperaturą ciała, nagłym początkiem i szybkim przebiegiem i indukowana może być poprzez miejscowe wstrzyknięcie kultur bulionowych paciorkowców (*Streptococcus pyogenes*) pacjentowi z dużym, dwukrotnie nawracającym nieoperacyjnym mięsakiem szyi, który dziś prawdopodobnie zostałby sklasyfikowany jako chłoniak [26]. Ogólny stan pacjenta opisywano jako „wycieńczony i wyniszczony” i nie spodziewano się długiego przeżycia chorego. Guz miał „wielkości kurzego jaja i prawie całkowicie blokował gardło”, przez co pacjent nie mógł przyjmować stałego pokarmu, a płyny często cofały się przez nos. Coley podawał zastrzyki w odstępach 3 - 4 dni przez cały maj i część czerwca, osiągając jedynie niewielkie reakcje miejscowe trwające 24 - 48 godzin. Jednak w tym czasie guz szyi zmniejszył się, a ogólny stan pacjenta się poprawił. W sierpniu i wrześniu leczenie przerwano, a guz od razu zaczął się rozrastać, osiągając dawne rozmiary do października. Stan pacjenta na tym etapie był prawie taki sam, jak na początku leczenia. Wstrzyknięcie nowej porcji bakterii spowodowało ostry atak róży, z powodu którego pacjent prawie umarł. Natomiast guz szyi w drugim dniu od iniekcji zaczął się rozpadać. Po około dwóch

tygodniach guz zniknął, pozostawiając tylko to, co uważano za tkankę bliznowatą po poprzednich operacjach. Guz zmniejszył się do tego stopnia, że pacjent był w stanie przełykać pokarm. Stan względnego zdrowia utrzymywał się u pacjenta przez 8 lat, aż do wystąpienia nawrotu choroby i śmierci. Z leczenia tego pacjenta Coley wyciągnął cztery ważne wnioski. Po pierwsze, róża nie była łatwa do wywołania, ponieważ pomimo wielokrotnych wstrzyknięć bakterii, tylko raz rzeczywiście doszło ostrego stanu zapalnego skóry. Po drugie, róża nie była łatwa do opanowania i zagrażała życiu pacjenta, ze względu na wysoką temperaturę ciała dochodzącą do 40°C [27]. Po trzecie, Coley zaobserwował pewne spowolnienie wzrostu guza, które było czasowo związane ze wstrzyknięciami, nawet gdy róża się nie rozwinęła. Po czwarte, podczas ciężkiego ataku róży, zaobserwowano silną regresję choroby, niestety złośliwy charakter zmiany ostatecznie doprowadził do nawrotu choroby i śmierci pacjenta 8 lat później. Dalsze próby leczenia doprowadziły Coleya do zastosowania iniekcji z zabitych ciepłnie *Streptococcus pyogenes*. Stosowanie tych produktów dało jedynie niewielkie efekty terapeutyczne dlatego Coley zdecydował się włączyć *Bacillus prodigiosus* (obecnie znanego jako *Serratia marcescens*) do swojej szczepionki, pomysł wywodzący się z opublikowanych obserwacji innego badacza, który wykazał na królikach, że zjadliwość kultur paciorkowców można zwiększyć przez wstrzyknięcie dodatkowo zabitej ciepłem *Serratia* [26]. Ostatecznie włączenie *Serratia* okazało się kluczowym krokiem w kierunku osiągnięcia powtarzalnych efektów terapeutycznych. Kombinacja Gram-dodatnich, zabitych ciepłem paciorkowców i Gram-ujemnych, zabitych ciepłem *Serratia marcescens*, którą powszechnie nazywamy „toksynami Coleya” zapewniła mu wiele sukcesów terapeutycznych oraz dała początek współczesnej immunoterapii nowotworów [28]. Mechanizm działania toksyn nigdy nie został w pełni wyjaśniony. Ponieważ aktywność toksyn była związana z gorączką, sądzono, że jest to efekt działania lipopolisacharydu, który zwiększa aktywność limfocytów oraz podnosi stężenie czynnika martwicy nowotworu (TNF). Jednak Tsung i Norton poinformowali, że substancją czynną wywołującą silną odpowiedź układu immunologicznego jest interleukina-12, a nie TNF [29]. Od tego czasu postęp w zrozumieniu powiązań między działaniem układu immunologicznego a wzrostem i rozwojem nowotworów doprowadził do rozwoju nowych schematów leczenia opartych na immunoterapii, które są obecnie badane prawie we wszystkich typach nowotworów.

Kamieniem milowym w dziedzinie immunoterapii nowotworów było odkrycie i kliniczne zastosowanie inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego: białka związanego z cytotoksycznymi limfocytami T (CTLA-4), które modulują układ odpornościowy pacjenta w celu zwalczania komórek nowotworowych. W 1996 roku opracowano i przetestowano na zwierzętach pierwsze przeciwciało blokujące CTLA-4 [30]. W 2011 roku FDA zatwierdziło ipilimumab (anty-CTLA-4) do leczenia zaawansowanego czerniaka. Dziś lek ten jest zatwierdzony dla kilku typów nowotworów, a najbardziej obiecującym wynikiem jest to, że ponad 20% pacjentów włączonych do

pierwszych badań klinicznych nad ipilimumabem (przed dopuszczeniem do obrotu w 2011 r.) wciąż żyje i nie wykazuje objawów choroby. Następnie w 2014 roku pojawił się inny inhibitor punktu kontrolnego, nivolumab i był pierwszym inhibitorem cząsteczki PD-1 zatwierdzonym przez FDA. W 2014 roku nivolumab stał się pierwszym inhibitorem PD-1, który uzyskał rejestrację regulacyjną w leczeniu czerniaka w Japonii. W ciągu następnych 4 lat na całym świecie zarejestrowano kilka innych inhibitorów receptora PD-1 lub jego ligandów: PD-L1 i PD-L2 takich jak: pembrolizumab, atezolizumab, durwalumab i awelumab, wykazując działanie w kilku typach nowotworów. Atezolizumab, to kolejny inhibitor punktu kontrolnego białka PD-L1, zatwierdzony od 2016 roku do leczenia czerniaka, raka płuca, raka pęcherza, a także od marca 2019 roku potrójnie ujemnego raka piersi [31,32]. Wszystkie powyższe cząsteczki immunologicznego punktu kontrolnego, w tym CTLA-4 lub PD-1 i jego ligandy (PD-L1 i PD-L2) wykazują ekspresję na limfocytach naciekających guz (TIL), a także na samych komórkach nowotworowych. Ekspresja powyższych cząsteczek umożliwia komórkom nowotworowym uniknięcie odpowiedzi immunologicznej, więc blokada immunologicznego punktu kontrolnego była kluczowym przełomem w leczeniu nowotworów. Spodziewano się, że przy wcześniejszych konwencjonalnych terapiach tylko około 4% pacjentów włączonych do badań klinicznych powyższych leków przeżyje. Dzięki otrzymanym przeciwciałom odsetek ten jest znacznie wyższy i wynosi od 16 do 30% [31, 33].

Ogrom pracy jaki włożono w badania naukowe nad rozwojem immunoterapii nowotworów został nagrodzony przez Komitet Noblowski. W 2018 roku prof. James P. Allison z USA oraz prof. Tasuku Honjo z Japonii otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii [34, 84]. Profesor Allison wraz ze współpracownikami wykazali, że cząsteczka CTLA-4 działa jako receptor hamujący w celu kontrolowania odpowiedzi limfocytów T. Następnie zaprojektowali i przeprowadzili eksperymenty na modelach mysich, aby potwierdzić, że blokowanie CTLA-4 przez przeciwciała prowadzi do eradykacji guza. Ich praca dowiodła, że anty-CTLA-4 działa pobudzająco na komórki T i umożliwia zwiększenie ich ilości. Duża ilość cytotoksycznych limfocytów prowadzi do zmniejszenia się masy guza. Na bazie ich odkryć, przeprowadzono badania kliniczne z wykorzystaniem ipilimumabu. W 1992 roku Honjo, pracując niezależnie od Allisona, odkrył cząsteczkę PD-1 – białko znajdujące się na komórkach odpornościowych. Po dokładnym zbadaniu jego funkcji ostatecznie ujawnił, że działa ono jako hamulec układu odpornościowego. Terapie oparte na jego odkryciu okazały się uderzająco skuteczne w walce z niektórymi nowotworami, szczególnie z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, rakiem nerki, czerniakiem i chłoniakiem Hodgkina [35]. Obecne badania nad przeciwciałami modulującymi układ odpornościowy do walki z chorobami nowotworowymi skupiają się na zmniejszeniu toksyczności leczenia oraz testowaniu produktów leczniczych w różnych typach nowotworów.

Prawidłowo działający układ immunologiczny jest zdolny do rozpoznawania komórek nowotworowych jako obcych i ich niszczenia. Jednak co wtedy, gdy sam układ immunologiczny "choruje na nowotwór"?

4. Follicular lymphoma - Chłoniak grudkowy

Chłoniak grudkowy (FL, wcześniej nazywany chłoniakiem ze środka pęcherzykowego i chłoniakiem guzkowym) jest heterogenną jednostką kliniczno-patologiczną, która obejmuje guzy wywodzące się z komórek B ośrodków rozmnażania grudek chłonnych, zarówno centrocytów jak i centroblastów. FL jest jedną z najczęstszych postaci chłoniaka nieziarniczego (NHL) w USA i w Europie [1]. W Stanach Zjednoczonych FL stanowi około 35 procent NHL. Szacuje się, że częstość występowania wynosi 3,18 przypadków na 100 000 osób [36]. Szacunkowa zapadalność w Europie wynosi 2,18 przypadków na 100 000 osób rocznie [37]. Zapadalność różni się w zależności od pochodzenia etnicznego, przy czym u rasy białej jest ponad dwukrotnie większa niż w populacjach afrykańskich i azjatyckich. Wydaje się, że FL występuje rzadziej w Ameryce Środkowej i Południowej, gdzie stanowi około 20% NHL [38]. Częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem. FL najczęściej występuje u osób w średnim i starszym wieku, z medianą wieku w chwili rozpoznania 65 lat [37]. FL jest rzadko diagnozowany u osób < 20 roku życia [39].

4.1. Etiologia

Patogeneza FL nie jest w pełni poznana. Około 85 procent pacjentów z rozpoznaniem chłoniaka grudkowego posiada translokację t(14;18), co powoduje nadekspresję onkogenu BCL2, który blokuje zaprogramowaną śmierć komórki (apoptozę) prowadząc do wydłużenia przeżycia komórek oraz sprzyja akumulacji wtórnych zmian genetycznych podczas ewolucji klonalnej [40]. Ponadto w większości przypadków dochodzi do rearanżacji genów łańcucha ciężkiego i lekkiego immunoglobulin.

FL pochodzi z komórek B centrum namnażania (GC). Jego rozwój jest ściśle związany z prawidłową reakcją GC, w którym naiwne komórki B ze szpiku kostnego ulegają somatycznej hipermutacji i zmianie klasy receptora (BCR) w procesie, który generuje różnorodność immunoglobulin i wybiera komórki B wytwarzające przeciwciała o wysokim powinowactwie.

Do rozwoju FL wymagane są liczne zdarzenia genetyczne, ponieważ translokację (14; 18) można zidentyfikować w niewielkiej podgrupie komórek B w reaktywnych tkankach limfoidalnych i krwi obwodowej u znacznej części zdrowych osób, u których nie rozwinie się FL. Wiele z tych dodatkowych, komplementarnych nabytych mutacji obejmuje geny kodujące enzymy modyfikujące

chromatynę [41].

4.2. Morfologia komórki

Jedną z najbardziej charakterystycznych cech morfologicznych FL jest guzkowy wzorec wzrostu. Guz składa się z mieszaniny centrocytów i centroblastów w różnych proporcjach. Centrocyty (rozszczipione komórki środka pęcherzyka) są to małe lub średnie komórki z wydłużonymi lub przeciętymi jądrami, niepozornymi jąderkami i niewielką bładą cytoplazmą. Centroblasty (nierozszczipione komórki środka pęcherzyka) są to duże komórki z okrągłymi lub owalnymi jądrami, chromatyną pęcherzykową, często wieloma jąderkami obwodowymi i wąskim obrzeżem kwasochłonnej cytoplazmy.

Centrocyty zazwyczaj dominują w obrazie mikroskopowym chłoniaka grudkowego a centroblasty są zwykle w mniejszości. Od odsetka centroblastów zależy histologiczny stopień złośliwości tego chłoniaka. Dodatkowo kliniczna agresywność guza wzrasta wraz ze wzrostem liczby centroblastów. W klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia przyjęto następującą metodę liczenia komórek: zlicza się komórki nowotworowe typu centroblastów w jednym dużym polu widzenia (powiększenie 400×) w 10 różnych guzkach nowotworowych i sumę dzieli się przez 10 [1,42]. Stopnie złośliwości chłoniaka grudkowego przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Stopnie złośliwości chłoniaka grudkowego.

Stopień	Opis
1	0-5 centroblastów / DPW
2	6-15 centroblastów / DPW
3	>15 centroblastów / DPW
3a	obecne rozproszone centrocyty
3b	obecne lite pola centroblastów

Skróty: DPW – duże pole widzenia

Immunofenotyp FL jest zwykle potwierdzany przez badanie immunohistochemiczne, ale można go również oznaczyć za pomocą cytometrii przepływowej. FL to nowotwór złośliwy wywodzący się z komórek B. Kluczowe cechy to obecność markerów limfocytów B i brak markerów limfocytów T. Komórki nowotworowe zwykle wykazują ekspresję immunoglobulin powierzchniowych, około 50 do 60 procent wyraża ekspresję IgM, 40 procent wyraża IgG, a rzadkie

przypadki wyrażają IgA. Powinien być obecny albo łańcuch lekki kappa, albo lambda, ale nie oba. Praktycznie wszystkie przypadki są dodatnie dla pewnych antygenów komórek B (CD19, CD20, CD79a), CD21 i CD10 (60 procent) i ujemne dla CD5, CD43 (większość przypadków) i CD11c. Ekspresja CD23 jest zmienna. Reakcja cytoplazmatyczna z białkiem BCL-2 jest silnie dodatnia w prawie wszystkich guzach stopnia 1 i 2, w przeciwieństwie do hiperplastycznych normalnych komórek B w centrum rozmnażania, które są ujemne pod względem BCL-2. Jednak duża część przypadków FL skórnych, dziecięcych i ogólnoustrojowych FL stopnia trzeciego (G3) jest BCL-2 ujemna. Czynniki transkrypcyjne BCL-6 jest wyrażany przez nieliczne komórki nowotworowe we wszystkich typach chłoniaka grudkowego [1]. Liczne analizy retrospektywne sugerują, że FL3b jest biologicznie odrębną jednostką, z częstym brakiem translokacji t(14; 18) i ekspresji CD10 oraz zwiększoną ekspresją p53 i MUM1. Stopień FL3a jest podobny do FL1-2 i charakteryzuje się powolnym przebiegiem klinicznym. Natomiast stopień FL3b ma przebieg kliniczny bardziej podobny do rozlanego chłoniaka z dużych komórek B (DLBCL), bez nawrotów powyżej 5 lat [43].

4.3. Rozpoznanie

Rozpoznanie HL i NHL należy dokonywać wyłącznie na podstawie badania histopatologicznego, do którego należy pobrać cały węzeł chłonny lub fragment zajętego narządu. Ocenę morfologiczną należy rozszerzyć o badania immunofenotypowe z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych, wykonywanych metodą immunohistochemiczną bądź metodą cytometrii przepływowej komórek uzyskanych podczas biopsji węzła chłonnego. Wykorzystuje się również badania molekularne, jeśli są konieczne do określenia podtypu chłoniaka. Wykonanie jedynie aspiracyjnej biopsji cienkoigłowej (fine-needle aspirate biopsy) nie wystarcza, by postawić diagnozę HL i NHL. Biopsję gruboigłową (core-needle biopsy) można wykorzystać, jeśli w momencie rozpoznania nie jest możliwe pobranie ani fragmentu, ani całego węzła lub tkanki. Biopsję gruboigłową można również stosować do udokumentowania nawrotu choroby [44]. Badanie szpiku kostnego jest ważnym elementem oceny zaawansowania choroby, ale nie jest wiarygodnym sposobem na postawienie podstawowej diagnozy. W klasycznych przypadkach obraz histologiczny FL w węzłach jest tak charakterystyczny, że jest to jedna z nielicznych postaci chłoniaka nieziarniczego, którą patolodzy mogą diagnozować na podstawie samej tylko morfologii komórek. Zazwyczaj guz ma wyraźny guzkowy wzór wzrostu i składa się z mieszaniny centrocytów i centroblastów. Rzadko spotyka się mitozy i komórki apoptotyczne, które są powszechne w reaktywnych węzłach chłonnych [45]. Ocenę rokowania dokonuje się przy pomocy międzynarodowego wskaźnika prognostycznego dla chłoniaka grudkowego (FLIPI - przedstawiony w tabeli 2). Został on opracowany na podstawie międzynarodowego badania przeżycia

długoterminowego u ponad 4000 pacjentów z FL rozpoznanym w latach 1985–1992 i leczonych bez rytuksymabu [46]. W latach 2004-2007 zwalidowano FLIPI u pacjentów leczonych terapią zawierającą rytuksymab w prospektywnym badaniu obserwacyjnym obejmującym ponad 2000 pacjentów, u których zdiagnozowano FL [47]. Zidentyfikowano pięć niekorzystnych czynników prognostycznych oraz wykorzystano je do określenia grup ryzyka o znacząco różnym czasie przeżycia całkowitego (OS).

Tabela 2. Międzynarodowy wskaźnik rokowniczy (FLIPI) dla powolnych chłoniaków nie-Hodgkina

Czynnik rokowniczy	Parametr różnicujący
wiek chorego	> 60 lat
liczba węzłowych lokalizacji chłoniaka	> 4
zaawansowanie kliniczne chłoniaka (tabela 3)	III/IV
stężenie hemoglobiny	<12 g/dl
aktywność LDH w surowicy	>normy
Grupy ryzyka	Liczba obciążających czynników
małego	0-1
pośredniego	2-3
dużego	4-5

Skróty: LDH – dehydrogenaza mleczanowa

4.4. Objawy kliniczne

Przebieg kliniczny chłoniaka grudkowego u większości chorych charakteryzuje się występowaniem bezbolesnej limfadenopatii obwodowej w okolicy szyjnej, pachowej, pachwinowej i/lub udowej. Limfadenopatia zwykle narasta i zanika samoistnie, ale nie zanika całkowicie. Często zajęte są węzły wnek płucnych oraz śródpiersia, natomiast duże guzy w śródpiersiu występują rzadko. Niektórzy pacjenci zgłaszają się z objawami niedrożności przewodu pokarmowego i/lub dróg moczowych spowodowanymi dużymi masami w obrębie jamy brzusznej. Rzadko dochodzi do zajęcia innych narządów niż narządy limfatyczne lub szpik kostny [1].

Pomimo obecności rozległej choroby w momencie rozpoznania, większość pacjentów nie ma żadnych objawów, z wyjątkiem powiększenia węzłów chłonnych. Tylko u około 20% występują objawy B (tj. gorączka, nocne poty lub niezamierzona utrata masy ciała). Nie ma charakterystycznych nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych związanych z FL. Pomimo dużej masy guza

podwyższona aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy lub cytopenia we krwi obwodowej występuje u mniej niż 25% pacjentów [48].

4.5. Leczenie i rokowanie

Przebieg chłoniaka grudkowego jest zmienny, a rokowanie zależy od stopnia zaawansowania klinicznego (zgodnie z klasyfikacją z Lugano, którą przedstawiono w tabeli 3) i stopnia złośliwości histologicznej (tabela 1). Chłoniaki stopnia I i II wg Lugano uznaje się za stadium ograniczone choroby z powolnym przebiegiem [44]. W tych przypadkach radioterapia daje szansę na całkowite wyleczenie o ile wszystkie zaangażowane miejsca mogą znajdować się w polu promieniowania o minimalnej toksyczności. Stopnie III i IV to stadium zaawansowane choroby, nie wymagają intensywnej chemioterapii, ale zazwyczaj nie ma możliwości ich wyleczenia [1]. Leczenie koncentruje się na łagodzeniu objawów, cofaniu cytopenii i poprawie jakości życia. Nowoczesna terapia zawierająca przeciwciała anti-CD20 (rytuksymab), choć nie jest lecznicza, przedłuża przeżycie pacjentów. Preferowane jest leczenie oparte na immunoterapii z zastosowaniem przeciwciała anti-CD20 łącznie z chemioterapią lub samego przeciwciała anti-CD20. Daje to lepsze wskaźniki odpowiedzi na leczenie, to jest: przeżycie wolne od progresji (PFS) i przeżycie całkowite (OS). Rytuksymab w postaci monoterapii można rozważyć u pacjentów ze współistniejącymi schorzeniami, które czynią ich słabymi kandydatami do chemioterapii. Rytuksymab w postaci pojedynczego środka jest również rozsądną alternatywą dla osób z niewielką masą guza i/lub chorobą, która rozwija się powoli przez lata. W 25–30% przypadków dochodzi do transformacji FL w agresywnego chłoniaka, zwykle rozlanego chłoniaka z dużych komórek B (DLBCL) [40]. Możliwe są dwie strategie leczenia FL: chemioterapia o różnym nasileniu oraz strategia „obserwuj i czekaj”, polegająca na włączeniu chemioterapii w momencie progresji. Kilka badań z randomizacją porównujących te schematy, przemawia za zastosowaniem początkowego okresu obserwacji u bezobjawowych pacjentów z chorobą o małej objętości. Takie podejście nie zagraża przeżyciu, a przedłużony okres bez leczenia może zmniejszyć potencjalną oporność na leki poprzez unikanie ekspozycji guza na chemioterapię [49,50].

Tabela 3. Klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaków pierwotnie węzłowych według klasyfikacji z Lugano (2014) zmodyfikowana klasyfikacja z Ann Arbor

Stopień	Zmiany węzłowe	Zmiany pozawęzłowe
I	Jeden węzeł chłonny lub grupa węzłów przyległych	Pojedyncza zmiana pozawęzłowa bez zajęcia węzłów chłonnych
II	Dwie lub więcej grup węzłowych po tej samej stronie przepony	Stopień I lub II dla zmian węzłowych z ograniczonym umiejscowieniem pozawęzłowym przez ciągłość
II masywny (bulky)	Stopień II ze zmianą masywną	Nie dotyczy
III	Węzły po obu stronach przepony; węzły powyżej przepony i zajęcie śledziony	Nie dotyczy
IV	Dodatkowe zajęcie narządu pozalimfatycznego niesąsiadującego z zajętymi węzłami chłonnymi	Nie dotyczy
Brak lub obecność objawów ogólnych choroby, tj. gorączki (> 38°C) trwającej bez uchwytnej przyczyny dłużej niż 2 tygodnie i/lub potów nocnych i/lub chudnięcia, tj. utraty co najmniej 10% wagi ciała w czasie nie dłuższym niż 6 miesięcy oznacza się odpowiednio literą A lub B.		

4.6. Rola mikrośrodowiska nowotworu

Badania ostatnich lat wskazują na możliwość zmienności odpowiedzi immunologicznej gospodarza na komórki nowotworowe w lokalnym mikrośrodowisku guza. Wpływa to na rokowanie w przypadku wielu nowotworów, w tym FL. Opisano istnienie dwóch specyficznych wzorców w reaktywnym mikrośrodowisku FL bezpośrednio związanych z cechami kliniczno-biologicznymi pacjentów: wzorca nadzoru immunologicznego (limfocyty T i makrofagi) oraz wzorca ucieczki immunologicznej (limfocyty T CD 57+) [51]. Swego rodzaju komunikacja pomiędzy nowotworowymi komórkami B a łagodnymi komórkami odpornościowymi w mikrośrodowisku mają silny wpływ na patobiologię FL. Ponad 80% FL nabywa mutacje somatyczne w rearanżowanych, eksprymowanych allelach łańcucha ciężkiego IgM. Tworzą one miejsca N-glikozylacji, które mają promować interakcje między IgM na komórkach FL a CD206 i/lub CD209 eksprymowanym na

powierzchni makrofagów naciekających guz, które stymulują sygnalizację receptora limfocytów B w komórkach FL [50]. Konieczne będą dalsze badania eksperymentalne w celu potwierdzenia biologicznych podstaw tych odkryć, zwłaszcza u pacjentów z FL leczonych rytuksymabem. Dane te są interesujące, biorąc pod uwagę coraz większe znaczenie odpowiedzi immunologicznej i jej składników komórkowych w biologii FL [51].

5. Diffuse large B-cell lymphoma - chłoniak rozlany z dużych komórek B

Chłoniak ten stanowi dużą heterogenną grupę nowotworów różniących się cechami biologicznymi, molekularnymi, klinicznymi oraz morfologicznymi. Cechą charakterystyczną DLBCL, NOS jest rozlany rozrost dużych komórek limfoidalnych, ponad dwukrotnie większych od limfocytów [1]. DLBCL jest jednym z częściej występujących chłoniaków spośród wszystkich nowotworów układu chłonnego i stanowi około 25 procent wszystkich NHL w krajach rozwiniętych [36,53]. W Stanach Zjednoczonych i Anglii zapadalność na DLBCL wynosi około 7 przypadków na 100 000 osób rocznie [36]. W całej Europie zapadalność wynosi około 4,92 przypadków na 100 000 osób rocznie [37,54]. Zapadalność różni się w zależności od pochodzenia etnicznego [55]. Podobnie jak większość innych NHL, około 55 procent przypadków występuje u mężczyzn. Częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem. Mediana wieku w chwili rozpoznania wynosi 64 lata dla wszystkich pacjentów. [36,56].

5.1. Etiologia

Etiologia większości DLBCL nie jest w pełni wyjaśniona. Istnieje wiele czynników o udowodnionym związku przyczynowym z zachorowaniem. Są to czynniki środowiskowe, infekcyjne, immunologiczne i jatrogenne. Nie można wykluczyć działania kilku mechanizmów patogenetycznych jednocześnie. U biorców przeszczepów immunosupresja sprzyja proliferacji poliklonalnych limfocytów B zakażonych wirusem Ebsteina-Barr (EBV, Epstein-Barr virus) i transformacji w DLBCL, zwłaszcza o lokalizacji pozawęzłowej. Ryzyko zachorowania u osoby po transplantacji serca, nerek lub szpiku jest kilkadziesiąt razy większe niż w pozostałej populacji. U chorych z zespołem nabytego niedoboru odporności (AIDS, acquired immune deficiency syndrome) ryzyko to jest prawie 100 razy większe niż w populacji ogólnej. Ponadto w przebiegu EBV+ DLBCL u osób w podeszłym wieku (EBV+ DLBCL of the elderly) niewydolność starzejącego się układu immunologicznego wraz z transformującym oddziaływaniem EBV mogą się przyczynić do powstania tej szczególnej histoklinicznej postaci choroby. Złożony mechanizm patogenetyczny może także zachodzić w przypadku DLBCL u osób z przewlekłym procesem infekcyjnym

obejmującym jamy ciała (DLBCL-associated with chronic inflammation) [57,58]. Niezależnie od czynnika etiologicznego mechanizmy patogenetyczne prowadzące do transformacji nowotworowej prawidłowych limfocytów w DLBCL są podobne. Polegają na wystąpieniu niestabilności genetycznej, z następowym zaburzeniem regulacji stopnia ekspresji onkogenów i/lub utratą funkcji nowotworowych genów supresorowych. Aberracje te zwykle nie są przypadkowe i dotyczą obszarów cechujących się aktywną rearanżacją materiału genetycznego zachodzącą w warunkach fizjologicznych. Aberracje cytogenetyczne towarzyszące DLBCL to najczęściej translokacje onkogenów należące do różnych klas czynników transkrypcyjnych (BCL2, BCL6, MYC) w okolicie genowych loci dla łańcuchów lekkich i ciężkich immunoglobulin. W 30–40% przypadków DLBCL dochodzi do nieprawidłowości w obrębie genu BCL6 (3q27), który może ulec rearanżacji w okolicie genowych loci dla immunoglobulin w obszarze 14q32, 2p12 lub 22q11. U 15–30% chorych stwierdza się t(14;18) prowadzącą do nadmiernej ekspresji BCL2, która może być także surogatem wcześniejszej transformacji histopatologicznej chłoniaka grudkowego (FL, follicular lymphoma) w DLBCL. Do zwiększonej ekspresji może również dochodzić w wyniku amplifikacji genu BCL2 lub tonicznej aktywacji receptora B-komórkowego (BCR, B-cell receptor) i/lub czynnika transkrypcyjnego NFκ (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) w komórkach chłoniaka. Trzecią pod względem częstości (5–10%) aberracją chromosomalną jest t(8;14), która przebiega ze zwiększoną ekspresją MYC i koreluje z pozawęzłową lokalizacją DLBCL. W kilkunastu procentach przypadków DLBCL dochodzi do wystąpienia powyższych nieprawidłowości jednocześnie, jak to się dzieje w przypadkach przebiegających z podwójną translokacją genów BCL2 i MYC ("double hit"), niekiedy także z obecnością rearanżacji BCL6 ("triple hit"). Chłoniaki takie cechuje szczególnie agresywny przebieg kliniczny i zwykle spełniają one kryteria morfologiczne chłoniaka z komórek B, nieklasyfikowalnego, z cechami pośrednimi między DLBCL a chłoniakiem Burkitta (BCLU, DLBCL/BL, B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma) [58,59].

5.2. Podział

Obecnie obowiązującą klasyfikacją DLBCL jest podział zaproponowany przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, World Health Organization) w 2016 roku, w którym za podstawę diagnostyczną przyjęto kryteria histopatologiczne, immunohistochemiczne, metody cytogenetyczne, molekularne i obraz kliniczny choroby.

Do jednostek histoklinicznych DLBCL zalicza się:

- DLBCL bliżej nieokreślony (DLBCL, NOS; DLBCL not otherwise specified),
 - typ z komórek B ośrodków rozmnażania
 - typ z aktywowanych komórek B
- Chłoniak z dużych komórek B z licznymi komórkami T i/lub histiocytami (THRLCBL, T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma),
- Pierwotny DLBCL ośrodkowego układu nerwowego (primary DLBCL, CNS; primary DLBCL central nervous system),
- Pierwotny skórny DLBCL typu kończynowego (PCDLBCL, leg type; primary cutaneous DLBCL, leg type),
- DLBCL bliżej nieokreślony EBV-pozytywny (Epstein-Barr virus (EBV) - positive DLBCL, not otherwise specified),
- Wrzód śluzowo-skinny EBV dodatni (EBV - positive mucocutaneous ulcer)
- DLBCL związany z przewlekłym zapaleniem (DLBCL associated with chronic inflammation)
- Lymphomatoid granulomatosis [60]

5.3. Morfologia komórki

W DLBCL, NOS wyróżnia się trzy główne morfologiczne warianty: centroblastyczny, immunoblastyczny, anaplastyczny oraz inne rzadkie typy. Komórki chłoniaka są duże i różnią się morfologicznie w zależności od typu. W wariacie centroblastycznym, który występuje najczęściej, komórki przypominają centroblasty (duże komórki z umiarkowaną ilością cytoplazmy, jądrem pęcherzykowym od okrągłego do owalnego, chromatyną pęcherzykową i 2–3 małymi jąderkami, często położonymi obwodowo w sąsiedztwie błony jądrowej). W wariacie immunoblastycznym występują duże komórki limfoidalne, z których każda ma umiarkowaną do obfitej bazofilną cytoplazmę i wydatne, centralnie położone jąderko w kształcie trapezu, często z cienkimi pasmami chromatyny przyczepionymi do błony jądrowej („nogi pająka”). Wariant anaplastyczny charakteryzuje się dużymi lub bardzo dużymi komórkami chłoniaka z wielopostaciowymi lub dziwacznymi jądrami. Komórki chłoniaka mogą naśladować komórki Hodgkina i Reed-Sternberga lub komórki anaplastycznego chłoniaka wielkokomórkowego. Komórki chłoniaka mogą mieć jądra

wielopłatowe lub w kształcie koniczyny. Są to zwykle przypadki pozawęzłowe (np. pierwotny chłoniak śródpiersia z komórek B). W innych przypadkach komórki chłoniaka są mniejsze niż typowe duże komórki limfoidalne (tak zwane małe centroblastyczne). W rzadkich przypadkach (<1%) komórki chłoniaka mają wygląd sygnetu (naśladując komórki raka żołądka) lub są wrzecionowate (naśladując mięsaka). W innych przypadkach mogą występować ziarnistości cytoplazmatyczne, wypustki mikrokosmkowe („guz ukwiałów”) lub połączenia międzykomórkowe obserwowane pod mikroskopem elektronowym [61].

Rozrost o charakterze rozlanym zajmuje zazwyczaj cały węzeł i nacieka tkankę okołowęzłową. Niekiedy naciek jest ograniczony do części węzła lub zajmuje tylko zatoki. We wszystkich wariantach może występować domieszka komórek T i/lub histiocytoów [1].

5.4. Rozpoznanie

Podstawą rozpoznania DLBCL jest wyłącznie badanie histopatologiczne, do którego należy pobrać cały węzeł chłonny lub fragment zajętego narządu. Ocenę histopatologiczną należy rozszerzyć o badania immunofenotypowe z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych. Nakłada się je na skrawki materiału histopatologicznego metodą immunohistochemiczną bądź do zawiesiny komórek uzyskanych z materiału bioptycznego w cytometrii przepływowej. Immunofenotyp DLBCL jest typowy dla komórek B: CD20+, CD22+, CD79+ oraz CD10+, BCL6+ (w większości przypadków), IRF4/MUM1+ (w części przypadków), cyklina D-. Niektóre przypadki wykazują ekspresję CD5+, która związana jest z ryzykiem rozsiewu pozawęzłowego chłoniaka. Indeks proliferacyjny jest wysoki, wynosi powyżej 40% a niekiedy nawet powyżej 90% [61].

Na podstawie badań profilu ekspresji genów w DLBCL wyróżniono dwa molekularne typy DLBCL: typ z profilem charakterystycznym dla komórek ośrodków rozmnażania (Germinal centre B-cell type – GCB type) oraz typ odpowiadający aktywowanym obwodowym limfocytom B (Activated B-cell type – ABC type). Poszczególne typy powstają na różnych onkogennych ścieżkach molekularnych, różnią się między sobą typem zaburzeń chromosomowych i rokowaniem (lepsze rokowanie w typie GCB). Istnieje możliwość wyodrębnienia tych dwóch typów immunohistochemicznie. Przypadki CD10+ (powyżej 30% komórek) lub CD10-, BCL6+, MUM1- odpowiadają typowi GCB. Pozostałe uważa się za typy nie – GCB. Podział immunofenotypowy niedostatecznie koreluje z podziałem opartym na ocenie profilu ekspresji genów, ale jest akceptowany i powszechnie stosowany w pracowniach histopatologicznych ze względu na lepszą dostępność [1].

5.5. Objawy kliniczne

Większość chorych na DLBCL zgłasza się do lekarza z powodu powiększenia węzłów chłonnych (60%) i/lub obecności guza w obszarze pozawęzłowym (40%), a także z powodu obecności objawów ogólnych choroby. Powiększone węzły chłonne są zwykle niebolesne, skóra nad nimi pozostaje niezmieniona, rozmiarami przekraczają średnicę 2 cm i wykazują tendencję do zrastania się w pakiety. Ogólnoustrojowe objawy „B” (tj. gorączka, utrata masy ciała, poty nocne) obserwuje się u około 30% pacjentów, a poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i beta-2-mikroglobuliny w surowicy jest podwyższony u ponad połowy. Około 60 procent pacjentów będzie prezentować DLBCL w zaawansowanym stadium (zwykle choroba III lub IV stopnia wg Lugano), podczas gdy 40 procent ma chorobę stadium ograniczonym, zwykle definiowaną jako tę, która może być zawarta w jednym polu napromieniania (tabela 3) [61]. Szpik kostny jest zajęty w około 10 - 25 procentach przypadków [62]. W nawet 40% przypadków choroba pojawia się w tkankach pozawęzłowych pozaszpikowych [63]. Najczęstszym miejscem pierwotnej choroby pozawęzłowej jest żołądek lub przewód pokarmowy, ale choroba może dotyczyć praktycznie każdej tkanki, w tym jądra, kości, tarczycy, ślinianek, migdałków, skóry, wątroby, piersi, nadnerczy, nerki, jamy nosowej, przydatków ocznych, zatok przynosowych, szyjki macicy, pochwy i ośrodkowego układu nerwowego [64,65].

Pozostałe objawy kliniczne u chorych na DLBCL zależą od zajęcia procesem chorobowym innych niż obwodowe węzły chłonne narządów limfatycznych i pozalimfatycznych. Znaczne i szybkie powiększanie się śledziony lub wątroby może wywołać bóle brzucha. Nacieczenie wątroby może spowodować żółtaczkę. Zajęcie szpiku kostnego, oprócz zwiększonej leukocytozy, może się objawiać niedokrwistością i małopłytkowością. Rzadziej w takich przypadkach obserwuje się leukopenię. Należy przy tym podkreślić, że niedokrwistość nie zawsze świadczy o zajęciu procesem chorobowym szpiku. Może być także spowodowana zespołem wielu czynników prowadzących do niedokrwistości chorób przewlekłych (ACD, anemia of chronic disorders), niedokrwistością o podłożu sekwestracyjnym w przebiegu znacznego powiększenia śledziony (hipersplenizm), a także wskutek ostrej lub przewlekłej utraty krwi w przypadku lokalizacji chłoniaka w obrębie przewodu pokarmowego i/lub towarzyszącej skazy krwotocznej małopłytkowej [58].

5.6. Leczenie i rokowanie

DLBCL jest chłoniakiem agresywnym, ale możliwym do wyleczenia. Przeżycie chorych bez leczenia wynosi od kilku do kilkunastu miesięcy. Gdy stan ogólny chorego pozwala na przeprowadzenie immunochemioterapii w pełnej intensywności dawki, jej realizację powinno się

przeprowadzić jak najszybciej bez względu na wiek chorego, uzależniając wybór strategii leczenia od stopnia zaawansowania choroby i obecności określonych czynników rokowniczych. Leczeniem z wyboru DLBCL o ograniczonym stopniu zaawansowania klinicznego (I–II wg Lugano, bez bulky tumor) jest zastosowanie 2–4 cykli immunochemioterapii według schematu R-CHOP (rytuksymab, cyklofosamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon) co 21 dni oraz uzupełniająca radioterapia na pola pierwotnej lokalizacji chłoniaka (35–40 Gy IF-RT [involved field radiotherapy]). Alternatywą jest przedłużenie immunochemioterapii do 6 cykli immunochemioterapii R-CHOP bez uzupełniającej radioterapii. W przypadku DLBCL o większym stopniu zaawansowania (II z bulky tumor oraz III–IV wg Lugano) postępowaniem z wyboru jest zastosowanie 6–8 cykli immunochemioterapii R-CHOP co 21 dni. Uzupełniająca radioterapia na zajęte pola to postępowanie opcjonalne i to tylko wtedy, gdy choroba wyjściowa spełniała kryteria bulky (> 10 cm). U chorych na DLBCL, którzy nie uzyskali odpowiedzi całkowitej po immunochemioterapii pierwszej linii, należy rozważyć zastosowanie alternatywnej chemioterapii. Po zastosowaniu 2–4 cykli takiego leczenia chorego należy kwalifikować do autologicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych (ang. autologous hematopoietic stem cell transplant, auto-HSCT). Podobną strategię terapeutyczną zaleca się także u każdego chorego na DLBCL w przypadku nawrotu choroby [58,66].

Rokowanie ocenia się w oparciu o Międzynarodowy Indeks Prognostyczny (International Prognostic Index – IPI; przedstawiony w tabeli 4). Niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi są wiek powyżej 60 lat, słaby ogólny stan zdrowia pacjenta oceniany w oparciu o kryteria zaproponowane przez ECOG - Eastern Cooperative Study Group (tabela 5), III lub IV stopień zaawansowania klinicznego wg skali z Lugano, podwyższone stężenie LDH w surowicy, zajęcie dwóch lub więcej narządów pozawęzłowych. Odsetek uzyskiwanych odpowiedzi całkowitych u chorych w stopniu zaawansowania I–II wynosi prawie 100%, a przeżyć 5-letnich - ponad 85%. W przypadku zaawansowania choroby III–IV odsetek przeżyć całkowitych wynosi około 75%, a przeżyć 5-letnich - 50-60%. Większość nawrotów choroby pojawia się w pierwszych 3 latach jej trwania, a tylko 10% z nich występuje później niż 5 lat po zakończeniu leczenia [58]. Po zakończeniu leczenia chorzy na DLBCL w remisji całkowitej są okresowo obserwowani w celu monitorowania powikłań leczenia i oceny możliwego nawrotu. Częstotliwość i zakres tych wizyt zależy od komfortu zarówno pacjenta, jak i lekarza. Nie przeprowadzono prospektywnych, randomizowanych badań porównujących różne harmonogramy obserwacji. Ogólne podejście opiera się na następujących założeniach:

1. Większość nawrotów występuje w ciągu pierwszych dwóch lat po zakończeniu leczenia [67,68].
2. Nawroty są zwykle objawowe i rzadko są identyfikowane wyłącznie na podstawie rutynowych badań obrazowych [69].

3. Jeśli nawrót zostanie zauważony kilka tygodni wcześniej z powodu bardziej intensywnego monitorowania, jest mało prawdopodobne, aby poprawić wyniki leczenia.
4. Planując strategię nadzoru po leczeniu, należy zadbać o ograniczenie liczby tomografii komputerowej, szczególnie u osób młodszych, ze względu na obawy związane z ekspozycją na promieniowanie i ryzykiem wystąpienia drugiego nowotworu [70].

Nawroty DLBCL najprawdopodobniej wynikają z utrzymywania się minimalnej choroby resztkowej poniżej możliwości wykrycia w badaniach obrazowych. Apoptoza i martwica komórek złośliwych prowadzi do uwolnienia DNA guza do krwiobiegu. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) może wykryć i określić ilościowo krążące DNA guza (ctDNA). Są to geny dla immunoglobulin V, D, J zawierające unikalne sekwencje, które są markerami klonalności. Monitorowanie ctDNA identyfikuje pacjentów zagrożonych nawrotem przed wystąpieniem klinicznych objawów choroby i skutkuje mniejszym obciążeniem chorobą w momencie nawrotu [71,72]. Wolne ctDNA jest obiecującym biomarkerem do identyfikacji pacjentów z wysokim ryzykiem niepowodzenia leczenia bez konieczności narażenia pacjentów na promieniowanie rentgenowskie.

Tabela 4. Międzynarodowy wskaźnik rokowniczy (IPI) dla agresywnych chłoniaków nie-Hodgkina

Czynnik rokowniczy	Parametr różnicujący
wiek chorego	≤ 60 lat vs > 60 lat
stan sprawności chorego wg kryteriów ECOG (tab. 5)	< 2 vs ≥ 2
zaawansowanie kliniczne chłoniaka (tab. 3)	I/II vs III/IV
liczba pozawęzłowych lokalizacji chłoniaka	≤ 1 vs > 1
Aktywność LDH w surowicy	\leq normy vs $>$ normy
Grupy ryzyka	Liczba obciążających czynników
małego	≤ 1
Pośrednio małego	2
Pośrednio dużego	3
dużego	≥ 4

Skróty: LDH – dehydrogenaza mleczanowa, ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group

Tabela 5. Skala sprawności wg Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

Stopień sprawności	Definicja
0	prawidłowa sprawność, zdolność wykonywania normalnych czynności bez ograniczeń
1	obecność objawów choroby, możliwość chodzenia i zdolność wykonywania lekkiej pracy
2	zdolność wykonywania czynności osobistych, niezdolność do pracy, konieczność spędzenia w łóżku mniej niż połowy dnia
3	ograniczona zdolność wykonywania czynności osobistych, konieczność spędzania w łóżku więcej niż połowy dnia
4	konieczność spędzania w łóżku całego dnia, konieczność stałej opieki z powodu choroby
5	zgon

5.7. Nowe strategie leczenia

Badania nad inhibitorami punktów kontrolnych w opornych na leczenie DLBCL (RR DLBCL) były jak dotąd rozczarowujące, z niskimi wskaźnikami odpowiedzi i krótkimi remisjami. W badaniu klinicznym I fazy z użyciem nivolumabu (humanizowane przeciwciało monoklonalne swoiście wiążące się z receptorem PD-1 i blokujące jego funkcję) w RR DLBCL całkowity odsetek odpowiedzi (ORR) wyniósł 36% z medianą przeżycia wolnego od progresji (PFS) wynoszącą tylko 7 tygodni. Połączenie nivolumabu z ipilimumabem (starszej generacji inhibitor punktu kontrolnego anty-CTLA-4) dało ORR 20% w RR DLBCL, z medianą PFS wynoszącą tylko 1,5 miesiąca. W niedawno opublikowanym wielośrodkowym badaniu II fazy z udziałem 121 pacjentów z RR DLBCL, którzy nie kwalifikowali się do ASCT (Autologous Stem Cell Transplant), bądź ASCT się nie powiódł ORR wynosiły odpowiednio 10% i 3% w 9 i 6 miesiącu obserwacji. Jednak niektóre podtypy pozawęzłowych DLBCL, w tym chłoniak kończyn dolnych DLBCL, pierwotny chłoniak śródpiersia i pierwotny chłoniak ośrodkowego układu nerwowego mogą mieć wyższą ekspresję PD1 / PD-L1 i lepiej reagować na inhibitory punktów kontrolnych niż inne. Badania nad leczeniem RR DLBCL koncentrują się na łączeniu inhibitorów punktów kontrolnych z przeciwciałami anty-CD20, innymi przeciwciałami lub w połączeniu z terapią CAR-T [73].

W przypadku pacjentów z chorobą RR terapia komórkowa z użyciem chimerycznych receptorów antygenowych komórek T (CAR-T) odgrywa coraz ważniejszą i ewoluującą rolę w leczeniu. Chimeryczny receptor antygenowy CAR (ang. chimeric antigen receptor) to genetycznie modyfikowane białko receptorowe, składające się z fragmentu zewnątrzkomórkowego wiążącego docelowy antygen komórkowy za pomocą pojedynczego łańcucha lekkiego, domeny rozdzielającej, domeny przezbłonowej oraz wewnątrzkomórkowej domeny sygnałowej. Rozpoznanie docelowego antygeny przez limfocyty T zawierające CAR (CAR-T) prowadzi do ich aktywacji niezależnie od kontekstu białek wchodzących w skład zespołu zgodności tkankowej. Dzięki temu, limfocyty CAR-T mogą rozpoznawać antygeny i niszczyć komórki nowotworowe bez konieczności wcześniejszego rozpoznawania antygenów prezentowanych przez cząsteczki MHC. Praktyczny mechanizm działania terapii CAR-T jest niezwykle ciekawy. W pierwszej fazie – w specjalistycznym procesie filtrowania krwi następuje izolowanie leukocytów, w tym limfocytów T. Kolejny krok stanowi ich zamrożenie oraz przekazanie do laboratorium, gdzie następuje modyfikacja genetyczna na drodze transdukcji. Przy pomocy nieaktywnego wektora wirusowego limfocyty T zostają genetycznie zaprogramowane, aby rozpoznawały komórki nowotworowe. Do wnętrza limfocytów wprowadza się fragment DNA z genem kodującym receptor przeciw określonemu antygenowi. Na ostatnim etapie przygotowań – nowo utworzone komórki CAR-T ulegają namnażaniu i trafiają z powrotem do krwi pacjenta. Tak zaprogramowane komórki CAR-T są w stanie rozpoznać komórki nowotworowe, przyłączyć się do nich, a następnie je zniszczyć [74,75]. Przed podaniem choremu immunoterapii CAR-T stosuje się tradycyjną chemioterapię – w celu zmniejszenia liczby limfocytów występujących w organizmie pacjenta. Badania wczesnej fazy różnych konstruktyw CART-19 drugiej generacji ukierunkowanych na CD19 zastosowanych w przypadkach DLBCL opornych na leczenie doprowadziły do zatwierdzenia przez FDA preparatów Kymriah i Yescarta stosowanych w kolejnych liniach leczenia. Obecnie trwają wczesne testy CAR trzeciej i czwartej generacji, w tym takich z więcej niż jednym celem i wieloma domenami kostymulującymi. CAR-T stanowi realną i bardzo obiecującą terapię RR DLBCL, w tym chorobę zmienioną przez MYC, i jest obszarem aktywnych badań [76].

6. Założenia i cel pracy

Aktualne doniesienia naukowe potwierdzają, że 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. 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. Komórki nowotworowe w celu przetrwania wykształcają mechanizmy zapobiegające rozpoznaniu ich przez elementy układu odpornościowego. Wykazują również zdolność do modulowania własnego mikrośrodowiska oraz własnego fenotypu poprzez ekspresję elementów rozpuszczalnych i powierzchniowych, w celu hamowania funkcji komórek efektorowych. Ligandy dla receptora PD-1, czyli PD-L1 lub PD-L2 są wyrażane na różnych komórkach odpornościowych (makrofagach, komórkach dendrytycznych i limfocytach w mikrośrodowisku guza) oraz na samych komórkach nowotworowych. Receptor PD-1 po związaniu z ligandami przekazuje sygnały hamujące w celu osłabienia proliferacji i funkcji komórek T, co prowadzi do wyczerpania komórek T, braku działania cytotoksycznego i braku niszczenia komórek nowotworowych.

Terapie oparte na blokowaniu receptora PD-1 bądź ligandu PD-L1 z wykorzystaniem swoistych przeciwciał monoklonalnych okazały się uderzająco skuteczne w walce z niektórymi nowotworami, szczególnie z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, rakiem nerki, czerniakiem i chłoniakiem Hodgkina. Ograniczone są doniesienia naukowe dotyczące ekspresji ligandu PD-L1 na komórkach nowotworowych chłoniaków nieziarniczych oraz zastosowania wyżej wymienionych przeciwciał w tych jednostkach chorobowych. Założeniem niniejszej pracy doktorskiej jest ocena ekspresji PD-L1 u pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowym (FL) oraz rozlanym chłoniakiem z dużych limfocytów B (DLBCL). Ważnym założeniem jest również korelacja ekspresji PD-L1 z wybranymi danymi kliniczno - patologicznymi w celu określenia znaczenia ekspresji PD-L1 jako czynnika predykcyjnego w omawianych chorobach. Analiza tych zależności poszerzy wiedzę o chłoniaku grudkowym oraz rozlanym chłoniaku z dużych limfocytów B oraz wskaże na możliwość zastosowania oznaczenia ligandu PD-L1 jako czynnika predykcyjnego w tych chorobach.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje wyznaczono następujące cele:

1. Ocenę ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowym i chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B.
2. Analizę zależności pomiędzy badanym markerem i parametrami kliniczno-patologicznymi: stężeniem hemoglobiny we krwi, stężeniem LDH w surowicy krwi, stopniem w skali Ann Arbour, ryzykiem FLIPI lub IPI, stopniem w skali sprawności ECOG, indeksem proliferacyjnym nowotworu z zastosowaniem oznaczenia Ki67.
3. Wykazanie prawdopodobnego zastosowania ekspresji PD-L1 jako czynnika predykcyjnego w omawianych chorobach.

7. Materiał i metodyka

7.1. Charakterystyka grupy badanej

Badanie ma charakter retrospektywny i polega na ocenie ekspresji białka PD-L1 metodą immunohistochemiczną w materiale pooperacyjnym pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowych i chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B. Do badań wykorzystano materiał zgromadzony w archiwum Zakładu Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w postaci utrwalonych wycinków tkankowych zatopionych w bloczki parafinowe. Materiał tkankowy stanowiły w większości węzły chłonne (53 przypadki) oraz w mniejszości inne guzy, w tym: 3 migdałki podniebienne, guz skóry podudzia lewego, guz uda prawego, 1 guz śledziony.

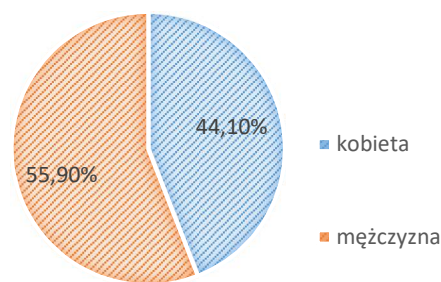
Grupa badana składała się z 59 pacjentów. Były to osoby, u których zdiagnozowano jeden z dwóch typów nowotworu – chłoniaka grudkowego lub chłoniaka rozlanego z dużych limfocytów B. Większość grupy stanowili mężczyźni (55,9%; 33 osoby), zaś kobiet było 26, czyli 44,1% grupy. Średni poziom wieku w grupie wyniósł $M=63,49$ lat, przy odchyleniu standardowym $SD=15,15$. Najmłodsza osoba w grupie miała 25 lat, zaś najstarsza – 88 lat. Najliczniejszą grupę wiekową stanowiły osoby w przedziale wiekowym 60-70 lat (40,70%; 24 osoby), a osoby powyżej 60 roku życia stanowiły łącznie prawie 70% całej próby badanej.

W celu dokładnej analizy ekspresji PD-L1 pacjentów podzielono na dwie grupy według rozpoznania histopatologicznego: pacjentów z chłoniakiem grudkowym (średnia wieku 52,5; 7 kobiet i 19 mężczyzn) i pacjentów z chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B (średnia wieku 54,5; 19 kobiet i 14 mężczyzn).

Tabela 6. Analiza grupy badanej pod kątem rozkładu płci

Płeć	N	%
kobieta	26	44,1
mężczyzna	33	55,9
Ogółem	59	100,0

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy



Rycina 4. Wykres prezentujący wyniki analizy grupy badanej pod kątem rozkładu płci

Tabela 7. Analiza podstawowych statystyk opisujących poziom wieku badanej grupy

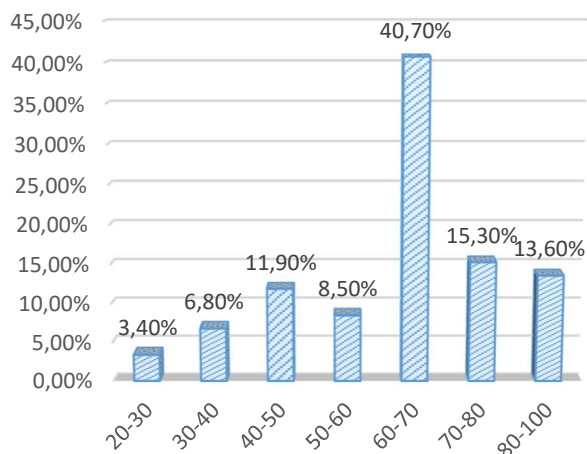
	N	M	SD	MIN	MAX
wiek	59	63,49	15,15	25,00	88,00

N - liczebność grupy, *M* - średnia, *SD* - odchylenie standardowe, *MIN* - wartość najmniejsza, *MAX* - wartość największa

Tabela 8. Analiza grupy badanej pod kątem rozkładu wieku

Wiek	N	%
20-30	2	3,4
30-40	4	6,8
40-50	7	11,9
50-60	5	8,5
60-70	24	40,7
70-80	9	15,3
80-100	8	13,6
Ogółem	59	100,0

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy



Rycina 5. Wykres prezentujący wyniki analizy grupy badanej pod kątem rozkładu wieku

U wszystkich pacjentów na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej analizowane były wyniki badań laboratoryjnych wykonywanych w momencie rozpoznania, takie jak stężenie hemoglobiny we krwi, stężenie LDH w surowicy krwi oraz dane kliniczne określające zaawansowanie procesu nowotworowego, takie jak stopień w skali Ann Arbour, ryzyko FLIPI lub IPI, stopień w skali sprawności ECOG, indeks proliferacyjny nowotworu z zastosowaniem oznaczenia Ki67. Dodatkowo dla grupy pacjentów z FL analizowano stopień złośliwości nowotworu określany podczas badania histopatologicznego na podstawie liczby centroblastów (tab. 1). Wszystkie dane kliniczne oraz laboratoryjne zostały zebrane w utworzoną bazę danych i poddane analizie statystycznej, a jej efekty przedstawiono w rozdziale Wyniki.

Na przeprowadzenie badań została udzielona zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu Nr 99/2019.

7.2. Metoda oceny ekspresji PD-L1

Reakcję immunohistochemiczną przeprowadzono w Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Klinicznej za pomocą aparatu Autostainer Link 48 firmy Dako-Agilent przy użyciu przeciwciała anty PD-L1 (klon 22C3), nr kat. M3653, izotyp: IgG1 firmy Dako-Agilent. Przeciwciała Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3, są przeznaczone do stosowania w immunohistochemii do znakowania białka PD-L1 w prawidłowych i zmienionych nowotworowo tkankach utrwalonych uprzednio w formalinie i zatopionych w parafinie. Preparaty tkankowe zostały skrojone na skrawki o grubości 4,5µm. Zastosowane rozcieńczenie przeciwciała to 1:50.

Procedura barwienia objęła następujące etapy:

- 1) Odmaskowanie epitopu polegające na zanurzeniu skrawków tkankowych umieszczonych na szkiełkach podstawowych w rozcieńczonym odczynniku EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) nr kat K8005 i ogrzewaniu — w aparacie PT Link (97°C) przez 30 minut,
- 2) Pozostawienie skrawków w aparacie PT Link, do spadku ich temperatury do 65° C,
- 3) Wyjęcie szkiełek ze zbiornika aparatu PT Link i zanurzenie szkiełek w naczyniu z rozcieńczonym buforem Dako Wash Buffer (10×), nr kat. S3006, o temperaturze pokojowej,
- 4) Pozostawienie zanurzonych szkiełek w rozcieńczonym buforze Dako Wash Buffer (10×), przez 1–5 minut,
- 5) Umieszczenie szkiełek w aparacie Dako Autostainer, pokrycie skrawków buforem Dako Wash Buffer (10×)
- 6) Inkubowanie skrawków tkankowych z rozcieńczonym przeciwciałem anty PD-L1 przez 30 minut w temperaturze pokojowej,
- 7) Wizualizacja reakcji immunohistochemicznej z zastosowaniem systemu EnVision™
 - a) Inkubacja z EnVision™ FLEX HRP - 30 minut w temperaturze pokojowej.
 - b) Inkubacja z EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (nr kat. K8021/K8022) - 30 minut w temperaturze pokojowej.
 - c) Inkubacja z DAB Enhancer (S196131-2) - 5 minut w temperaturze pokojowej.
 - d) Barwienie kontrastowe z użyciem EnVision™ FLEX Hematoxylin (nr kat. K8008/K8018).
- 8) Odwodnienie preparatów w szeregu alkoholowym, oczyszczenie w ksylenie, trwałe zamknięcie preparatów za pomocą taśmy syntetycznej (SCA Coverslipping Film 70, nr kat. 4770).

Równoległe z reakcjami IHC na materiale badanym przeprowadzono reakcje kontrolne przy zachowaniu tego samego protokołu. Materiał do kontroli dodatkowo stanowiły migdałki, odczyn błonowy zaobserwowano w przypadku komórek układu immunologicznego oraz komórek

pochodzenia nabłonkowego. Wynik reakcji był zgodny z danymi literaturowymi dotyczącymi ekspresji PD-L1 w tkankach prawidłowych.

Ekspresja PD-L1 w badanym materiale została oceniona przy pomocy mikroskopu optycznego Olympus cx41 (obiektywy o powiększeniu 10–40×). W ocenie uwzględniono widoczny odczyn błonowy komórek guza. Ekspresja białka PD-L1 została określana przy użyciu skali stopnia wybarwienia guza (ang. Tumor Proportion Score, TPS), która określa odsetek żywotnych komórek nowotworowych wykazujących częściowy lub całkowity odczyn błonowy o dowolnym nasileniu. Skalę zaprezentowano w tabeli 9. Komórki tkanki nekrotycznej oraz komórki układu immunologicznego związane z guzem wykazujące dodatnią reakcję z PD-L1 nie były zliczane. Poziom ekspresji PD-L1 został wyliczony z użyciem poniższego wzoru.

$$\text{TPS} = \frac{\text{Liczba komórek z dodatnią ekspresją PD – L1(komórki nowotworowe)}}{\text{Całkowita liczba żywotnych komórek nowotworowych}} \times 100\%$$

Tabela 9. Tumor Proportion Score, TPS

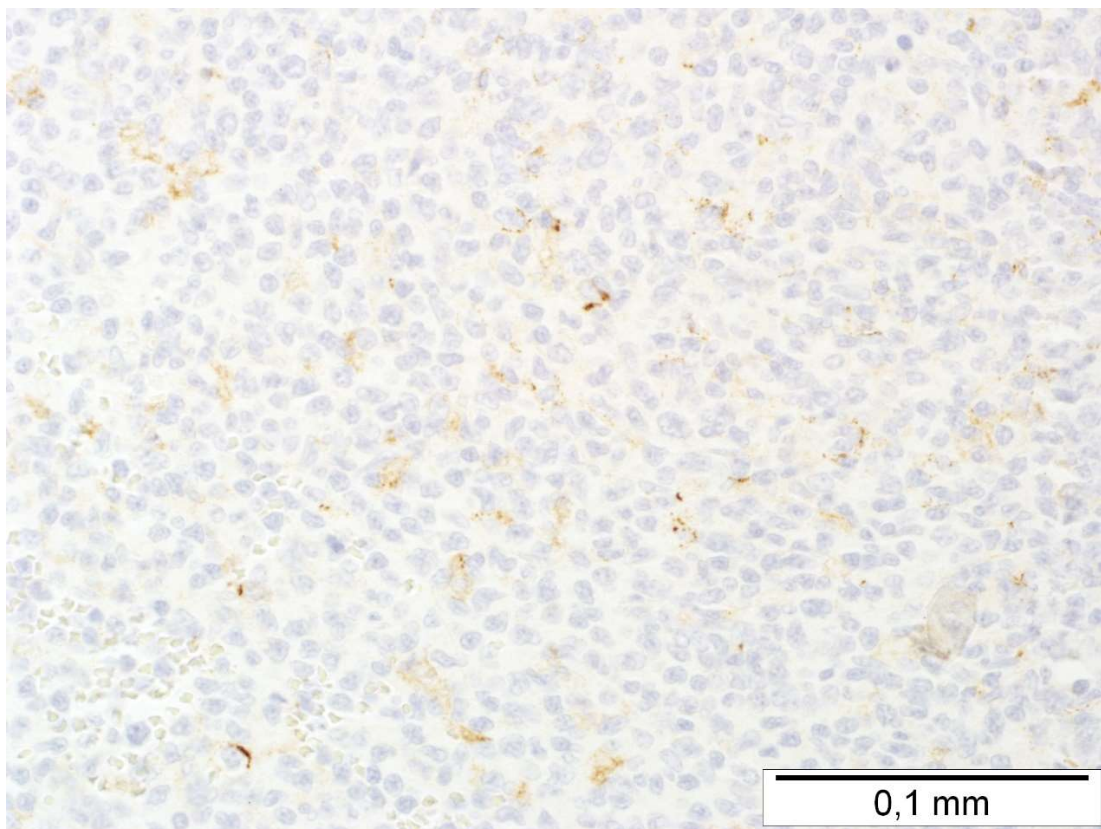
Skala stopnia wybarwienia guza (TPS)			
Poziom ekspresji PD-L1	TPS < 1%	TPS 1% – 49%	TPS ≥ 50%
Stan ekspresji PD-L1	Brak ekspresji PD-L1	Niski poziom ekspresji PD-L1	Wysoki poziom ekspresji PD-L1

7.3. Analiza statystyczna

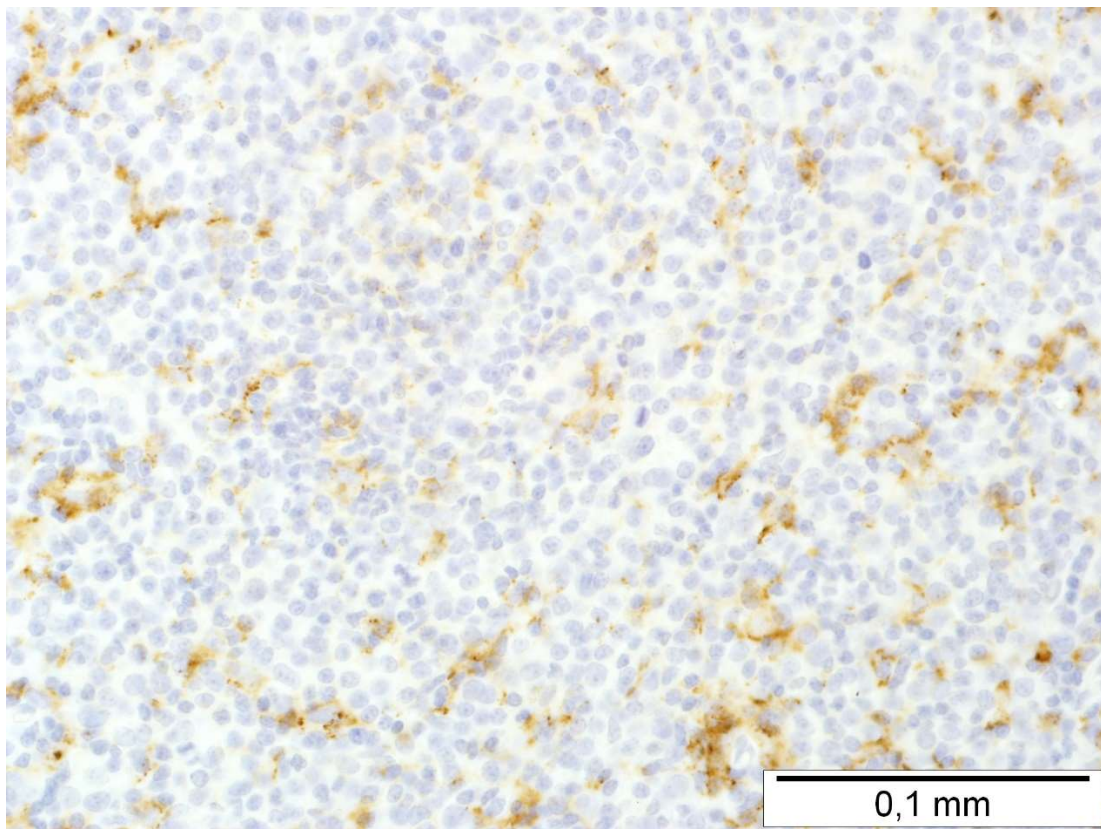
Opracowanie wyników opierało się na analizie statystycznej cech mierzalnych (ilościowych) i niemierzalnych (jakościowych). Dla wszystkich parametrów mierzalnych (ilościowych) wyznaczono podstawowe statystyki opisowe: średnią, medianę, odchylenie standardowe, wartość największą i najmniejszą, dla parametrów jakościowych: częstość i procent. Weryfikację występowania związków pomiędzy zmiennymi jakościowymi przeprowadzono za pomocą tabel krzyżowych z wykorzystaniem testu Chi-Kwadrat Pearsona oraz Ilorazu Wiarygodności Chi-kwadrat. Siłę związków mierzono za pomocą współczynnika V Cramera. Przyjęto poziom istotności $p=5\%$ wskazujący na występowanie istotnych statystycznie związków bądź różnic. Analizę statystyczną przeprowadzono przy wykorzystaniu oprogramowania SPSS v 26 oraz pakietu MS Office.

8. Wyniki

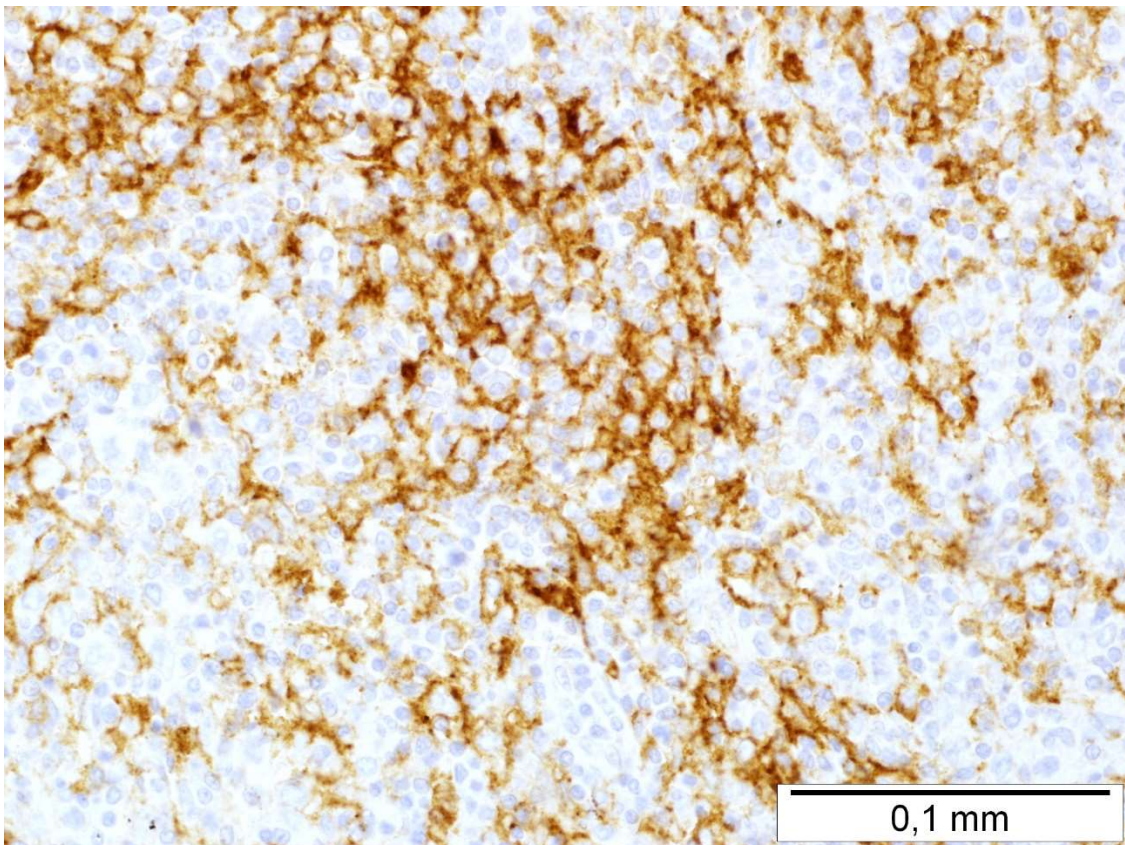
8.1. Ekspresja PD-L1 w preparatach tkankowych grupy badanej



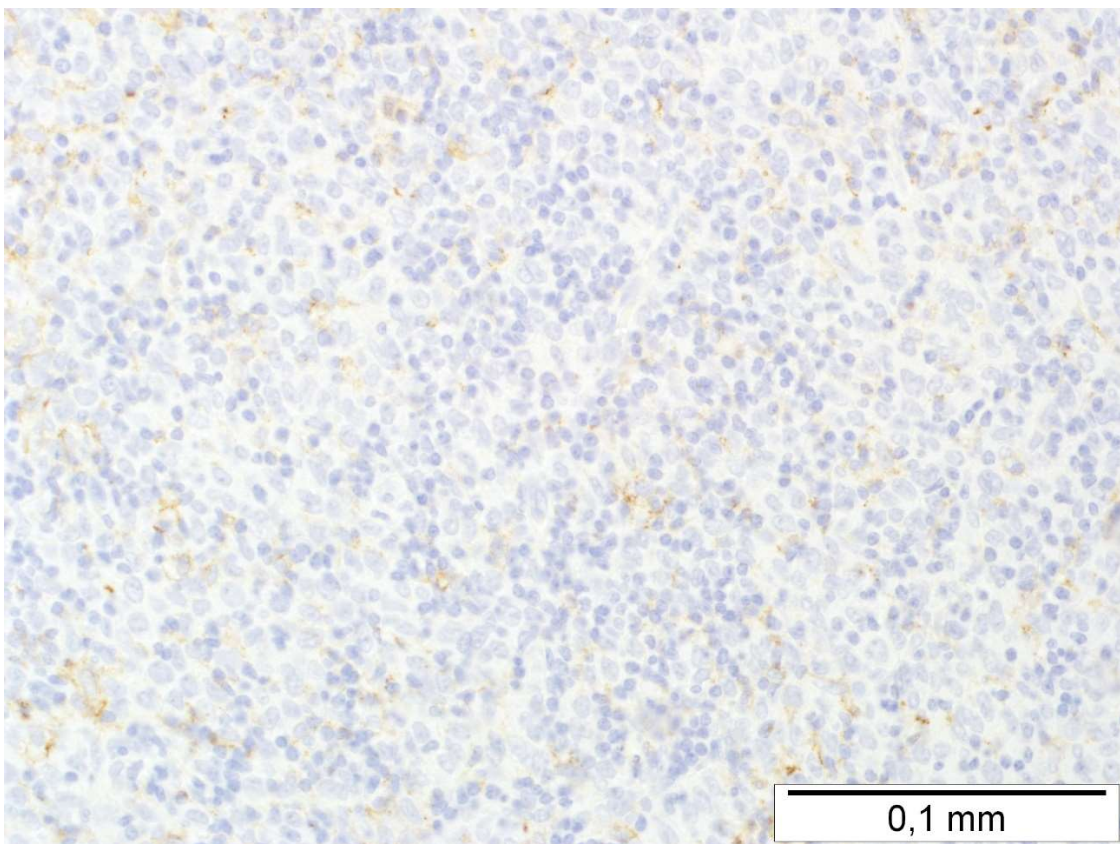
Rycina 6. Ekspresja PD-L1 <1% u pacjenta z FL (powiększenie 400×)



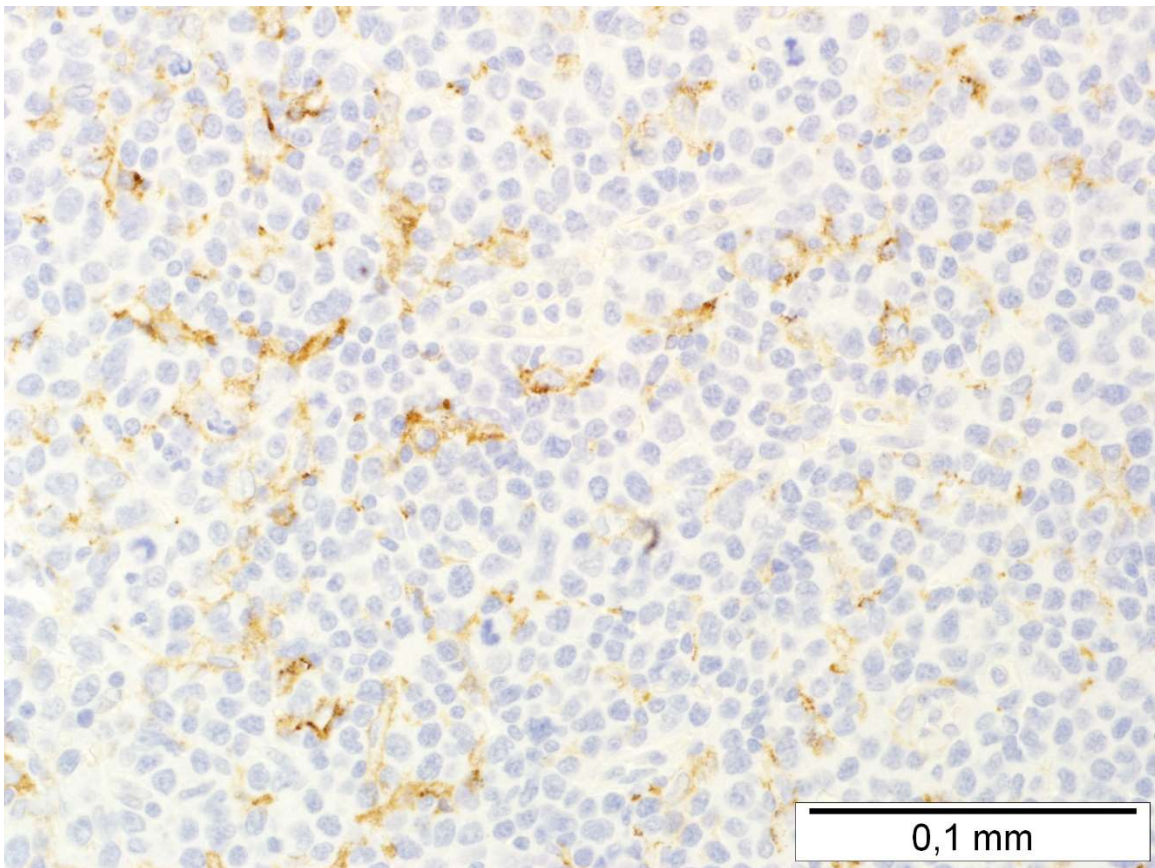
Rycina 7. Ekspresja PD-L1 1 - 49% u pacjenta z FL (powiększenie 400×)



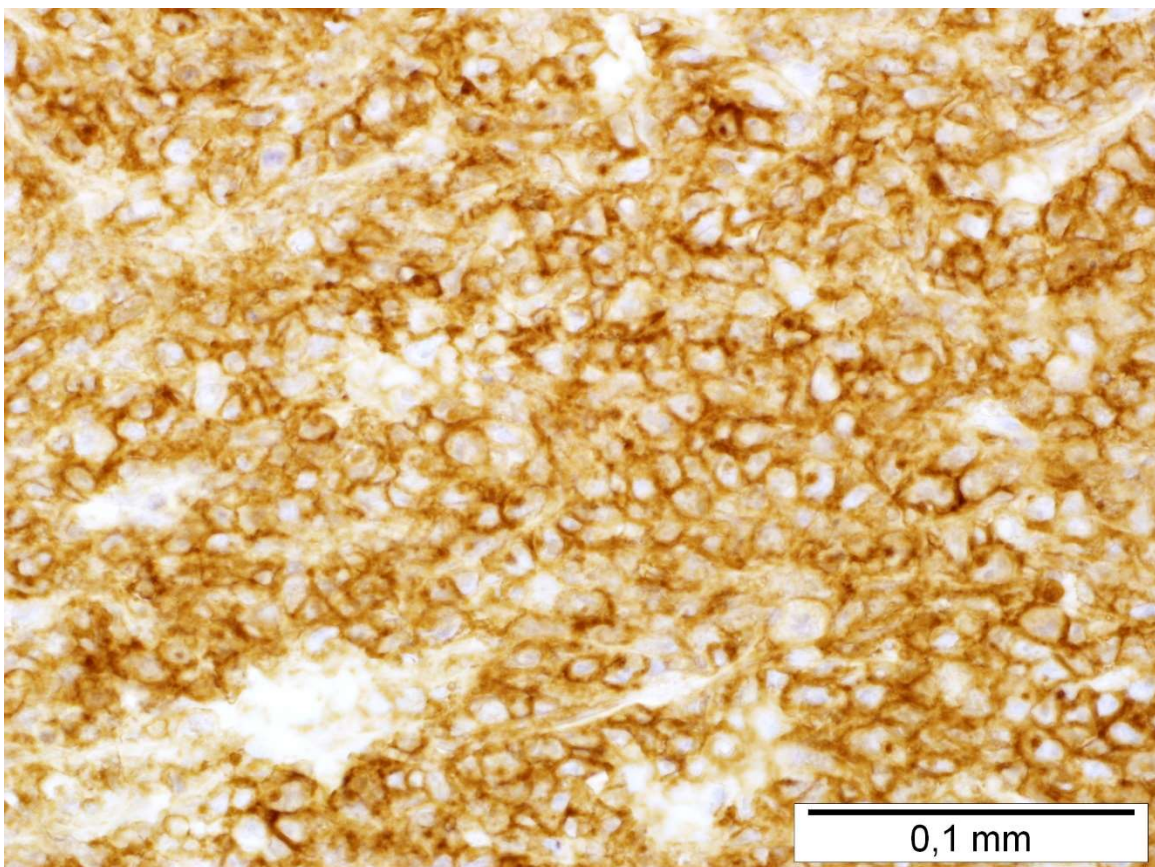
Rycina 8. Ekspresja PD-L1 $\geq 50\%$ u pacjenta z FL (powiększenie 400 \times)



Rycina 9. Ekspresja PD-L1 $< 1\%$ u pacjenta z DLBCL (powiększenie 400 \times)



Rycina 10. Ekspresja PD-L1 1 - 49% u pacjenta z DLBCL (powiększenie 400×)



Rycina 11. Ekspresja PD-L1 $\geq 50\%$ u pacjenta z DLBCL (powiększenie 400×)

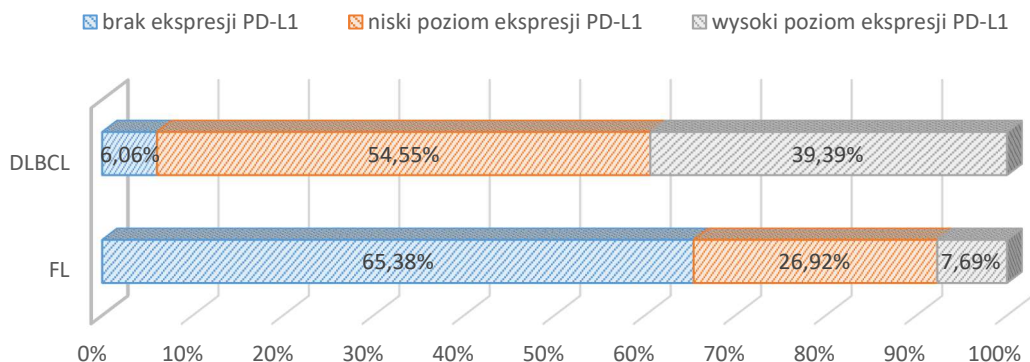
8.2. Analiza porównawcza poziomu ekspresji PD-L1 pomiędzy grupą pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym a grupą pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

Tabela 10. Wyniki analizy związków pomiędzy zdiagnozowanym typem chłoniaka a poziomem ekspresji PD-L1

Rodzaj chłoniaka		PDL1			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
FL	N	17	7	2	26
	%	65,38%	26,92%	7,69%	100,00%
DLBCL	N	2	18	13	33
	%	6,06%	54,55%	39,39%	100,00%
Ogółem	N	19	25	15	59
	%	32,20%	42,37%	25,42%	100,00%
$\chi^2=26,74$; $df=2$; $p<0,001$; $VC=0,641$; $p<0,001$					

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, df - ilość stopni swobody, p - poziom istotności, VC - poziom współczynnika korelacji V Cramera

W wyniku przeprowadzenia analizy odnotowano obecność istotnych statystycznie związków pomiędzy zdiagnozowanym typem chłoniaka a poziomem ekspresji PD-L1. Obserwuje się, że odsetek osób charakteryzujących się brakiem ekspresji PD-L1 był wyższy w grupie ze zdiagnozowanym FL (65,38%; 17 osób) niż w grupie osób ze zdiagnozowanym DLBCL (6,06%; 2 osoby). Niski poziom ekspresji PD-L1 częściej występował w grupie pacjentów z DLBCL (54,55%; 18 osób) niż w grupie pacjentów z FL (26,92%; 7 osób), a wysoki poziom ekspresji również był wyższy u pacjentów z DLBCL (39,39%; 13 osób) niż w grupie pacjentów z FL (7,69%; 2 osoby). Związek poparto testem: $\chi^2=26,74$; $df=2$; $p<0,001$; $VC=0,641$; $p<0,001$, a siła korelacji mierzona współczynnikiem V Cramera jest wysoka.



Rycina 12. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy zdiagnozowanym typem chłoniaka a poziomem ekspresji PD-L1

8.3. Analiza związków pomiędzy poziomem ekspresji PD-L1 a wskazaniami najważniejszych prognostycznych parametrów kliniczno-patologicznych w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym

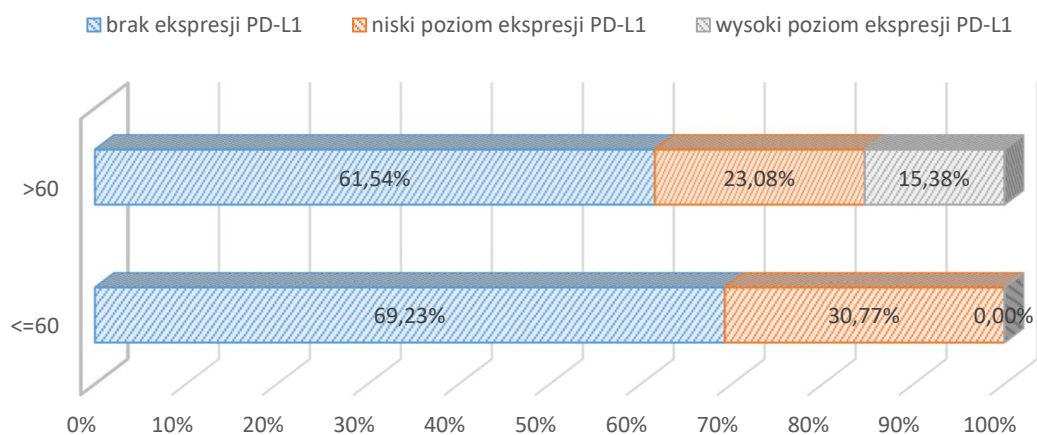
Tabela 11. Wyniki analizy związków pomiędzy wiekiem badanych a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym

wiek		PD-L1 FL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
<=60	N	9	4	0	13
	%	69,23%	30,77%	0,00%	100,00%
>60	N	8	3	2	13
	%	61,54%	23,08%	15,38%	100,00%
Ogółem	N	17	7	2	26
	%	65,38%	26,92%	7,69%	100,00%

$\chi^2=2,98$; $df=2$; $p=0,226$

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, *df* - ilość stopni swobody, *p* - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy wiekiem a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



Rycina 13. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wiekiem a poziomem ekspresji PD-L1

Tabela 12. Wyniki analizy związków pomiędzy stwierdzonym stopniem złośliwości choroby a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym

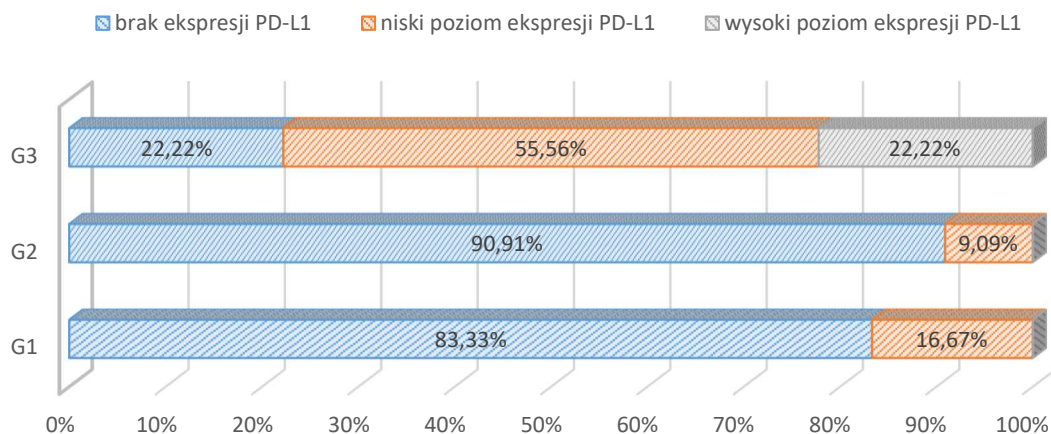
stopień złośliwości (liczba centroblastów)		PD-L1 FL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
G1	N	5	1	0	6
	%	83,33%	16,67%	0,00%	100,00%
G2	N	10	1	0	11
	%	90,91%	9,09%	0,00%	100,00%
G3	N	2	5	2	9
	%	22,22%	55,56%	22,22%	100,00%
Ogółem	N	17	7	2	26
	%	65,38%	26,92%	7,69%	100,00%

$\chi^2=13,06$; $df=4$; $p=0,011$; $VC=0,481$; $p=0,017$

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, df - ilość stopni swobody, p - poziom istotności, VC - poziom współczynnika korelacji V Cramera

W wyniku przeprowadzenia analizy 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 (83,33%; 5 osób) oraz pośrednim stopniem złośliwości – G2 (90,91%;

10 osób). Obie te grupy charakteryzował również zerowy odsetek wystąpień wysokiego poziomu ekspresji PD-L1. Natomiast w grupie pacjentów ze stwierdzonym wysokim stopniem złośliwości choroby – G3 najczęściej obserwowano niski stopień ekspresji PD-L1 (55,56%; 5 osób), zaś brak oraz wysoki poziom ekspresji wystąpiły z taką samą częstością (22,22%; 2 osoby). Związek poparto testem: $\chi^2=13,06$; $df=4$; $p=0,011$; $VC=0,481$; $p=0,017$, a siła korelacji mierzona współczynnikiem V Cramera jest umiarkowana.



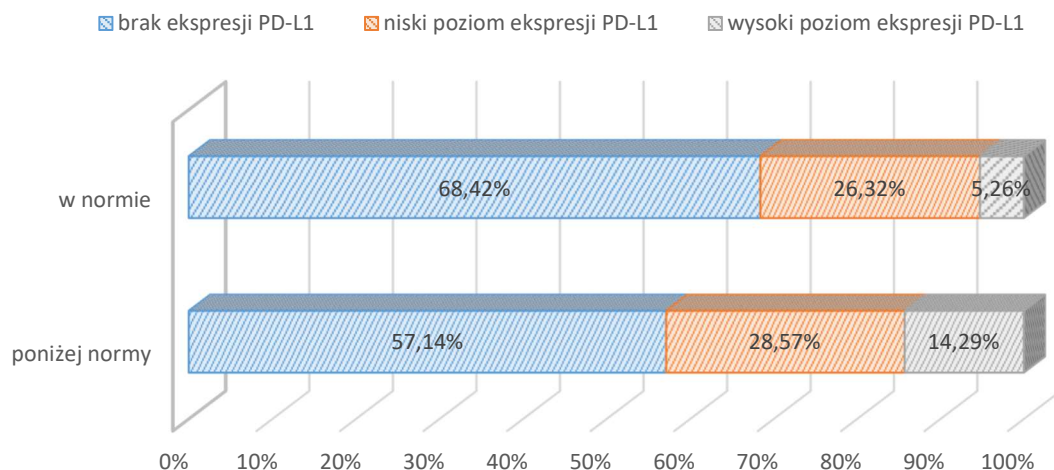
Rycina 14. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy stwierdzonym stopniem złośliwości choroby a poziomem ekspresji PD-L1

Tabela 13. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Hb a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym

Hb (cut off =12)		PD-L1 FL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
poniżej normy	N	4	2	1	7
	%	57,14%	28,57%	14,29%	100,00%
w normie	N	13	5	1	19
	%	68,42%	26,32%	5,26%	100,00%
Ogółem	N	17	7	2	26
	%	65,38%	26,92%	7,69%	100,00%
$\chi^2=0,59$; $df=2$; $p=0,744$					

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, df - ilość stopni swobody, p - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy poziomem Hb a poziomem ekspresji PD-L1 ($p > 0,05$).



Rycina 15. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Hb a poziomem ekspresji PD-L1

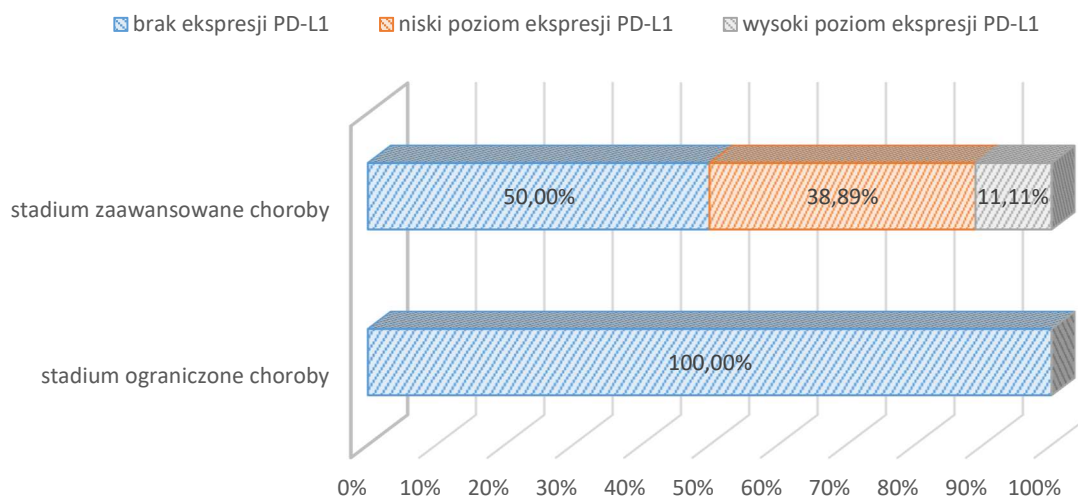
Tabela 14. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbour a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym

Ann Arbour		PD-L1 FL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
stadium ograniczone choroby	N	8	0	0	8
	%	100,00%	0,00%	0,00%	100,00%
stadium zaawansowane choroby	N	9	7	2	18
	%	50,00%	38,89%	11,11%	100,00%
Ogółem	N	17	7	2	26
	%	65,38%	26,92%	7,69%	100,00%

$\chi^2=8,59$; $df=2$; $p=0,014$; $VC=0,485$; $p=0,047$

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, *df* - ilość stopni swobody, *p* - poziom istotności, *VC* - poziom współczynnika korelacji *V* Cramera

W wyniku przeprowadzenia analizy odnotowano 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% pacjentów, a wysoka ekspresja u 11,11% badanych. Związek poparto testem: $\chi^2=8,59$; $df=2$; $p=0,014$; $VC=0,485$; $p=0,047$, a siła korelacji mierzona współczynnikiem V Cramera jest umiarkowana.



Rycina 16. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbour a poziomem ekspresji PD-L1

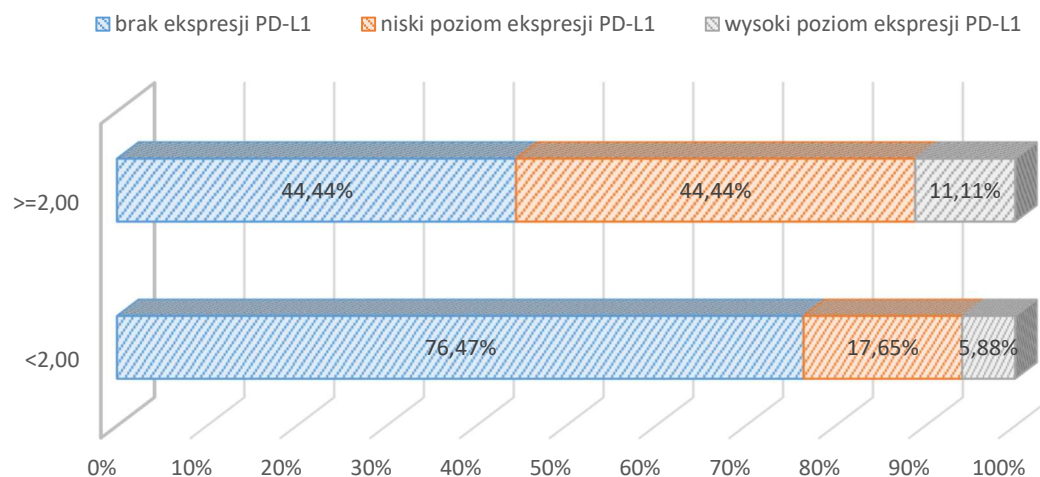
Tabela 15. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym

Skala ECOG		PD-L1 FL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
<2,00	N	13	3	1	17
	%	76,47%	17,65%	5,88%	100,00%
≥2,00	N	4	4	1	9
	%	44,44%	44,44%	11,11%	100,00%
Ogółem	N	17	7	2	26
	%	65,38%	26,92%	7,69%	100,00%

$\chi^2=2,66$; $df=2$; $p=0,265$

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, *df* - ilość stopni swobody, *p* - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



Rycina 17. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1

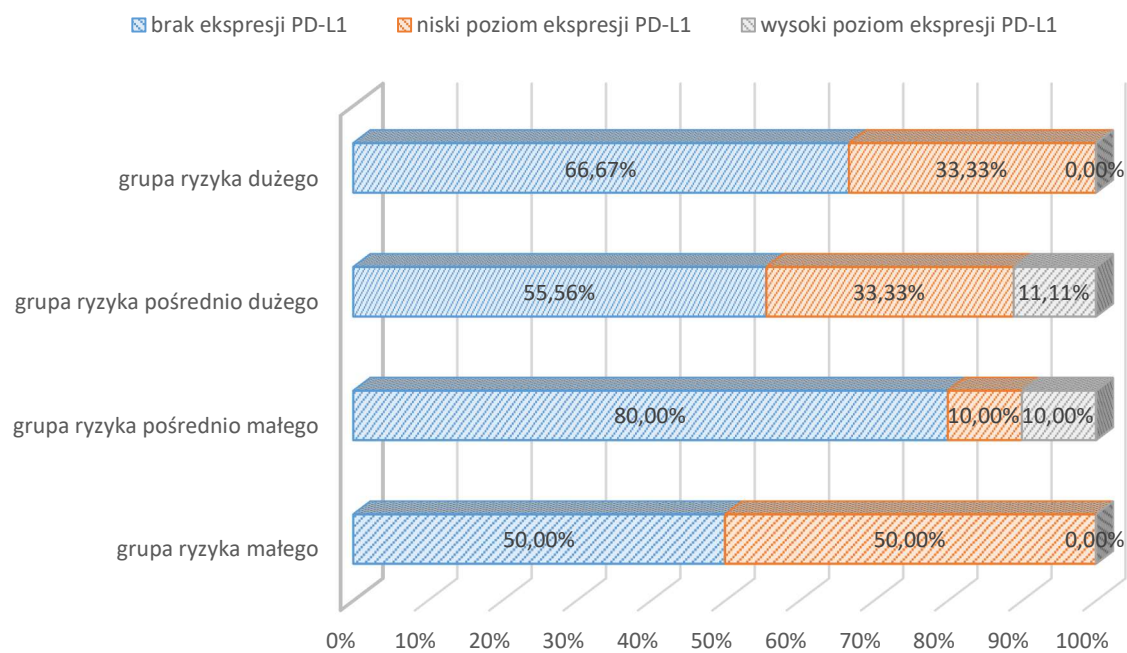
Tabela 16. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali FLIPI a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym

Ryzyko FLIPI		PD-L1 FL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
grupa ryzyka małego	N	2	2	0	4
	%	50,00%	50,00%	0,00%	100,00%
grupa ryzyka pośrednio małego	N	8	1	1	10
	%	80,00%	10,00%	10,00%	100,00%
grupa ryzyka pośrednio dużego	N	5	3	1	9
	%	55,56%	33,33%	11,11%	100,00%
grupa ryzyka dużego	N	2	1	0	3
	%	66,67%	33,33%	0,00%	100,00%
Ogółem	N	17	7	2	26
	%	65,38%	26,92%	7,69%	100,00%
$\chi^2=4,07$; $df=6$; $p=0,668$					

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat,

df - ilość stopni swobody, *p* - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy wynikiem na skali FLIPI a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



Rycina 18. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali FLIPI a poziomem ekspresji PD-L1

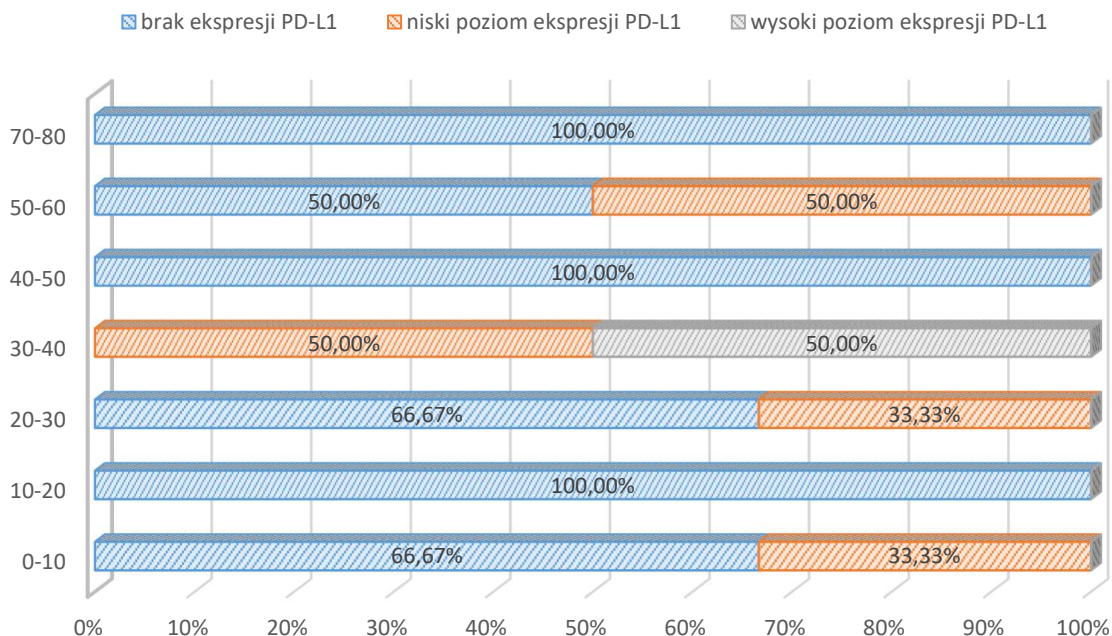
Tabela 17. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem ekspresji Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym

Ki67(%)		PD-L1 FL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
0-10	N	2	1	0	3
	%	66,67%	33,33%	0,00%	100,00%
10-20	N	2	0	0	2
	%	100,00%	0,00%	0,00%	100,00%
20-30	N	2	1	0	3
	%	66,67%	33,33%	0,00%	100,00%
30-40	N	0	1	1	2
	%	0,00%	50,00%	50,00%	100,00%
40-50	N	1	0	0	1
	%	100,00%	0,00%	0,00%	100,00%
50-60	N	1	1	0	2
	%	50,00%	50,00%	0,00%	100,00%
70-80	N	1	0	0	1
	%	100,00%	0,00%	0,00%	100,00%
Ogółem	N	9	4	1	14
	%	64,29%	28,57%	7,14%	100,00%
$\chi^2=10,07$; $df=12$; $p=0,610$					

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat,

df - ilość stopni swobody, p - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy poziomem ekspresji Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



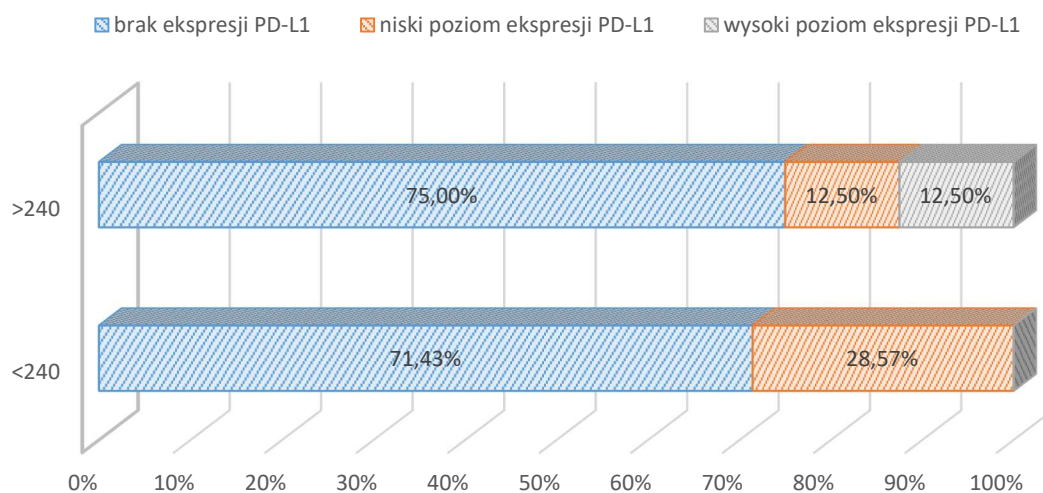
Rycina 19. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem ekspresji Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1

Tabela 18. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym

LDH (cut off = 240)		PD-L1 FL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
<240	N	5	2	0	7
	%	71,43%	28,57%	0,00%	100,00%
>240	N	6	1	1	8
	%	75,00%	12,50%	12,50%	100,00%
Ogółem	N	11	3	1	15
	%	73,33%	20,00%	6,67%	100,00%
$\chi^2=1,75$; $df=2$; $p=0,417$					

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, *df* - ilość stopni swobody, *p* - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



Rycina 20. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1

8.4. Analiza związków pomiędzy poziomem ekspresji PD-L1 a wskazaniami najważniejszych prognostycznych parametrów kliniczno-patologicznych w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

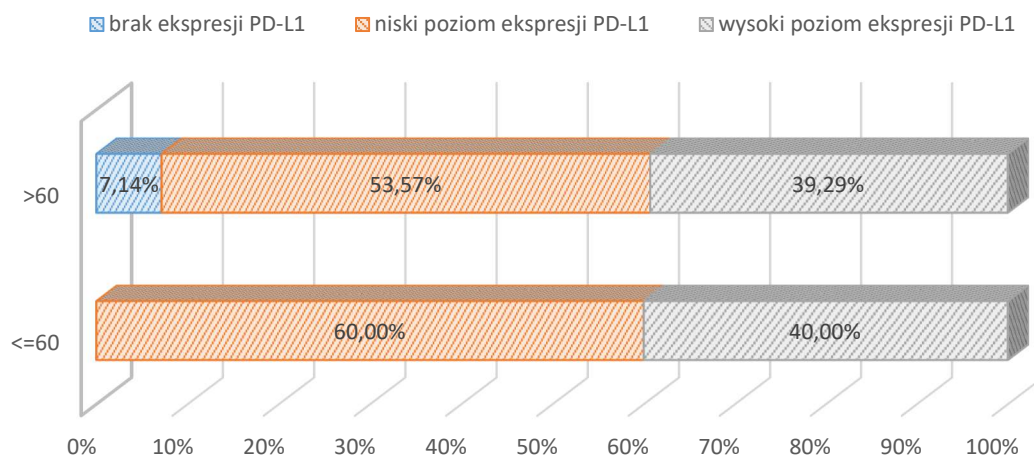
Tabela 19. Wyniki analizy związków pomiędzy wiekiem badanych a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

wiek		PD-L1 DLBCL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
<=60	N	0	3	2	5
	%	0,00%	60,00%	40,00%	100,00%
>60	N	2	15	11	28
	%	7,14%	53,57%	39,29%	100,00%
Ogółem	N	2	18	13	33
	%	6,06%	54,55%	39,39%	100,00%

$\chi^2=0,69$; $df=2$; $p=0,709$

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, df - ilość stopni swobody, p - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy wiekiem a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



Rycina 21. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wiekiem a poziomem ekspresji PD-L1

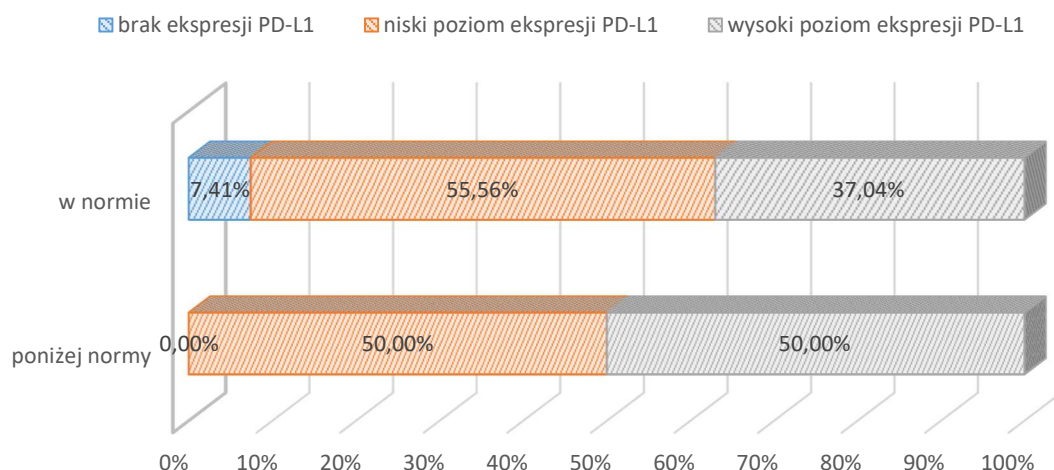
Tabela 20. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Hb a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

Hb (cut off = 12)		PD-L1 DLBCL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
poniżej normy	N	0	3	3	6
	%	0,00%	50,00%	50,00%	100,00%
w normie	N	2	15	10	27
	%	7,41%	55,56%	37,04%	100,00%
Ogółem	N	2	18	13	33
	%	6,06%	54,55%	39,39%	100,00%

$\chi^2=1,03$; $df=2$; $p=0,598$

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, df - ilość stopni swobody, p - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy poziomem Hb a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



Rycina 22. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Hb a poziomem ekspresji PD-L1

Tabela 21. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbour a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

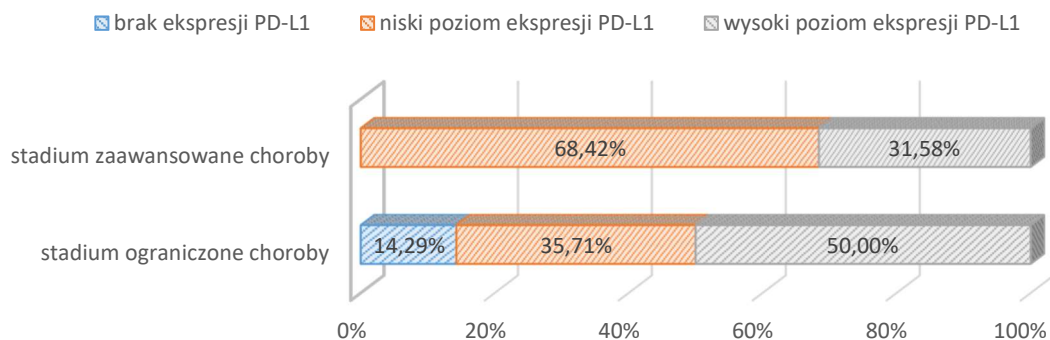
Ann Arbour		PD-L1 DLBCL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
stadium ograniczone choroby	N	2	5	7	14
	%	14,29%	35,71%	50,00%	100,00%
stadium zaawansowane choroby	N	0	13	6	19
	%	0,00%	68,42%	31,58%	100,00%
Ogółem	N	2	18	13	33
	%	6,06%	54,55%	39,39%	100,00%

$\chi^2=5,77$; $df=2$; $p=0,056$;

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, df - ilość stopni swobody, p - poziom istotności,

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 już 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 (31,58%; 6 osób).



Rycina 23. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbor a poziomem ekspresji PD-L1

Tabela 22. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

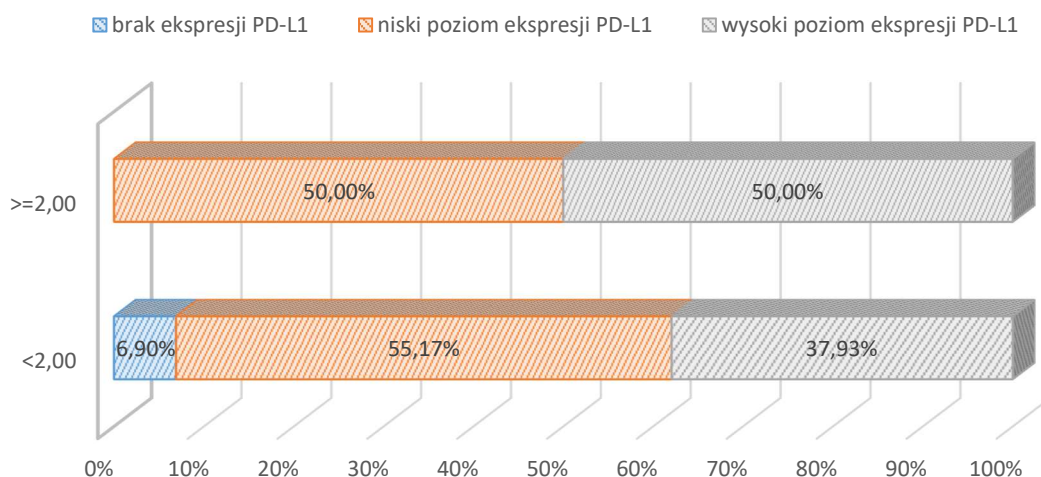
Skala ECOG		PD-L1 DLBCL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
<2,00	N	2	16	11	29
	%	6,90%	55,17%	37,93%	100,00%
≥2,00	N	0	2	2	4
	%	0,00%	50,00%	50,00%	100,00%
Ogółem	N	2	18	13	33
	%	6,06%	54,55%	39,39%	100,00%

$\chi^2=0,66$; $df=2$; $p=0,720$

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat,

df - ilość stopni swobody, *p* - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



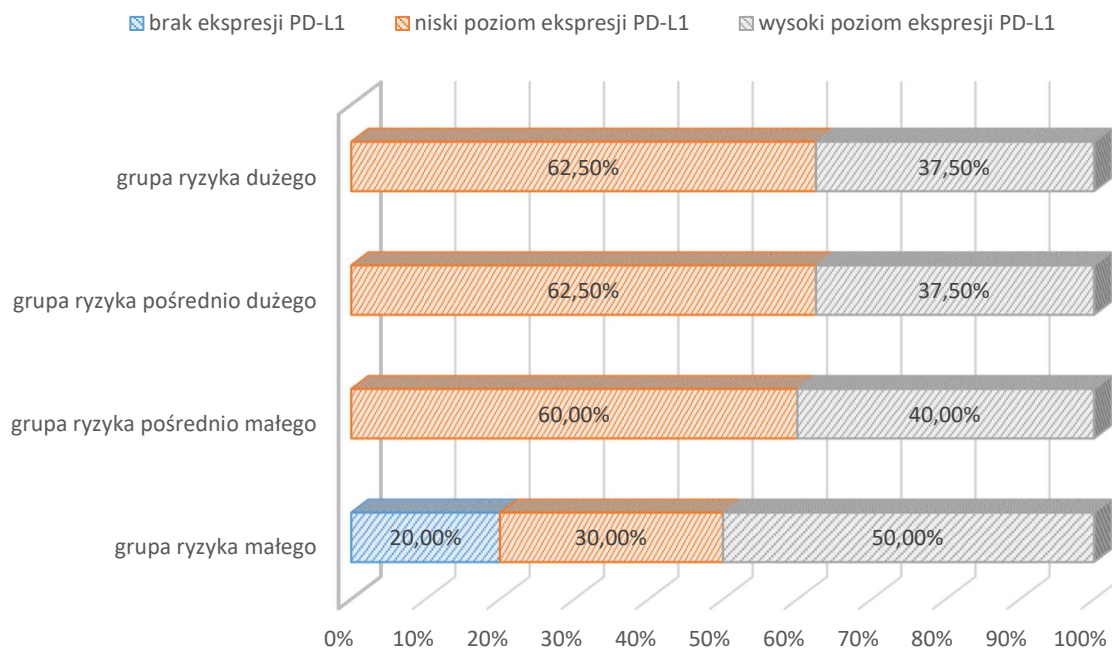
Rycina 24. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali ECOG a poziomem ekspresji PD-L1

Tabela 23. Wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali IPI a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

Ryzyko IPI		PD-L1 DLBCL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
grupa ryzyka małego	N	2	3	5	10
	%	20,00%	30,00%	50,00%	100,00%
grupa ryzyka pośrednio małego	N	0	6	4	10
	%	0,00%	60,00%	40,00%	100,00%
grupa ryzyka pośrednio dużego	N	0	5	3	8
	%	0,00%	62,50%	37,50%	100,00%
grupa ryzyka dużego	N	0	4	1	5
	%	0,00%	80,00%	20,00%	100,00%
Ogółem	N	2	18	13	33
	%	6,06%	54,55%	39,39%	100,00%
$\chi^2=7,61$; $df=6$; $p=0,268$					

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, *df* - ilość stopni swobody, *p* - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy wynikiem na skali IPI a poziomem ekspresji PD-L1 ($p > 0,05$).



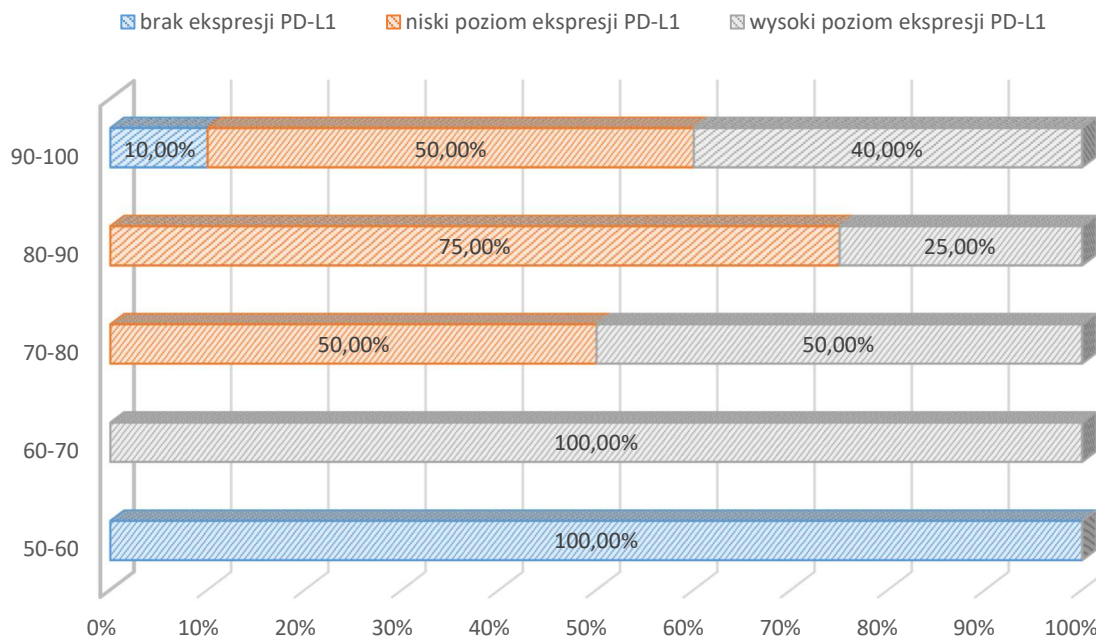
Rycina 25. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy wynikiem na skali IPI a poziomem ekspresji PD-L1

Tabela 24. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

Ki67(%)		PD-L1 DLBCL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
50-60	N	1	0	0	1
	%	100,00%	0,00%	0,00%	100,00%
60-70	N	0	0	1	1
	%	0,00%	0,00%	100,00%	100,00%
70-80	N	0	4	4	8
	%	0,00%	50,00%	50,00%	100,00%
80-90	N	0	3	1	4
	%	0,00%	75,00%	25,00%	100,00%
90-100	N	1	5	4	10
	%	10,00%	50,00%	40,00%	100,00%
Ogółem	N	2	12	10	24
	%	8,33%	50,00%	41,67%	100,00%
$\chi^2=9,63$; $df=8$; $p=0,292$					

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, df - ilość stopni swobody, p - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy poziomem Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



Rycina 26. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem Ki67 a poziomem ekspresji PD-L1

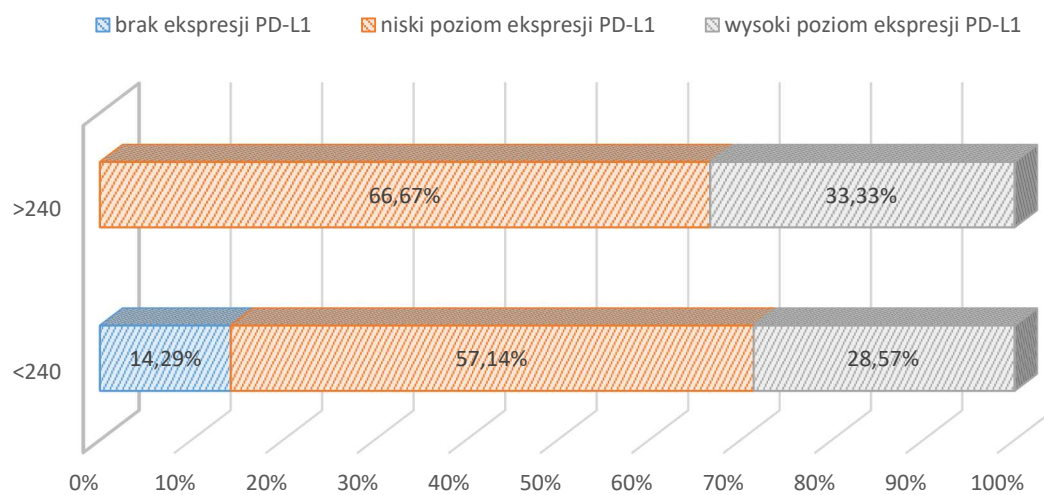
Tabela 25. Wyniki analizy związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1 w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B

LDH (cut off = 240)		PD-L1 DLBCL			Ogółem
		brak ekspresji PD-L1	niski poziom ekspresji PD-L1	wysoki poziom ekspresji PD-L1	
<240	N	1	4	2	7
	%	14,29%	57,14%	28,57%	100,00%
>240	N	0	6	3	9
	%	0,00%	66,67%	33,33%	100,00%
Ogółem	N	1	10	5	16
	%	6,25%	62,50%	31,25%	100,00%

$\chi^2=1,74$; $df=2$; $p=0,419$

N - liczebność grupy, % - odsetek grupy, χ^2 - wynik ilorazu wiarygodności Chi-kwadrat, *df* - ilość stopni swobody, *p* - poziom istotności

W wyniku przeprowadzenia analizy nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1 ($p>0,05$).



Rycina 27. Wykres prezentujący wyniki analizy związków pomiędzy poziomem LDH a poziomem ekspresji PD-L1

9. Omówienie wyników

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 nie zaobserwowano 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 najczęstszy w grupach osób ze stwierdzonym niskim stopniem złośliwości – G1 (83,33%; 5 osób) oraz pośrednim stopniem złośliwości – G2 (90,91%; 10 osób). W grupie pacjentów ze stwierdzonym wysokim stopniem złośliwości choroby – G3 najczęściej obserwowano niski stopień ekspresji PD-L1 (55,56%; 5 osób), zaś brak oraz wysoki poziom ekspresji wystąpiły z taką samą częstością (22,22%; 2 osoby). Liczne analizy retrospektywne sugerują, że chłoniak grudkowy w stopniu G3 z litymi polami centroblastów (FL3b) jest biologicznie odrębną jednostką, z częstym brakiem translokacji t(14; 18) i ekspresji CD10 oraz zwiększoną ekspresją p53 i MUM1 [43]. Stopień FL3b ma podobny przebieg kliniczny do rozlanego chłoniaka z dużych komórek B (DLBCL), prawdopodobnie dlatego u kilku pacjentów odnotowano dodatnią reakcję z PD-L1. Jednak podgrupa chłoniaka grudkowego w stopniu G3 jest zbyt mała aby wysunąć wiarygodne wnioski. Odnotowano również obecność istotnych statystycznie związków pomiędzy wynikiem na skali Ann Arbor a poziomem ekspresji PD-L1. Obserwuje się, że pacjenci z FL, których wynik na skali Ann Arbor wskazywał na ograniczone stadium choroby bez wyjątku charakteryzowali 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 Arbor 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 pacjentów w ograniczonym stadium choroby (14,29%; 2 osoby) niż w grupie pacjentów 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). Większa ilość wystąpień wysokiego poziomu ekspresji PD-L1 zaobserwowano w grupie w ograniczonym stadium choroby (50%; 7 osób) niż u osób w zaawansowanym

stadium choroby.

W grupie pacjentów z chłoniakiem grudkowym nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy poziomem ekspresji PD-L1 a wiekiem, poziomem Hb, wynikiem na skali ECOG, wynikiem na skali FLIPI, ekspresją Ki67 oraz poziomem LDH.

W grupie pacjentów z chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B również nie udało się potwierdzić obecności istotnych statystycznie związków pomiędzy poziomem ekspresji PD-L1 a wiekiem, poziomem Hb, wynikiem na skali ECOG, wynikiem na skali IPI, ekspresją Ki67 oraz poziomem LDH.

10. Dyskusja

Ostatnie kilkanaście lat to dość intensywny rozwój medycyny pod kątem nowych strategii leczenia chorób nowotworowych. Ogromny postęp technologiczny oraz współpraca wielośrodkowa dały wiele użytecznych rozwiązań w dziedzinie onkologii. Ogromny nacisk kładzie się na jakość życia chorych w czasie terapii przeciwnowotworowej szukając rozwiązań charakteryzujących się jak najmniejszym odsetkiem występowania objawów niepożądanych w trakcie leczenia oraz powikłań po zakończonej terapii. Jak wspomniano wyżej, dużym sukcesem było wprowadzenie do terapii zaawansowanego czerniaka tak zwanych inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych - anty-CTLA-4 (ipilimumabu). Następnie w 2014 roku pojawił się inny inhibitor punktu kontrolnego – nivolumab. Stał się on pierwszym inhibitorem PD-1, który uzyskał rejestrację regulacyjną w leczeniu czerniaka w Japonii. W ciągu następnych 4 lat na całym świecie zarejestrowano kilka innych inhibitorów receptora PD-1 lub jego ligandów: PD-L1 i PD-L2. Są to pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab i awelumab, które wykazują działanie w kilku typach nowotworów. 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 [77]. Schematy leczenia opierają się w głównej mierze na ocenie ekspresji PD-L1 lub PD-L2 w materiale pooperacyjnym lub biopsyjnym.

Celem niniejszej pracy doktorskiej jest ocena ekspresji PD-L1 u pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem grudkowym i chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B. Są to wg danych WHO dwa najczęściej występujące chłoniaki nieziarnicze w Polsce i na świecie [85].

Praca własna wykazała, że ekspresja PD-L1 różni się w zależności od typu rozpoznanego chłoniaka. Odsetek osób charakteryzujących się brakiem ekspresji PD-L1 był wyższy w grupie ze zdiagnozowanym FL niż w grupie osób ze zdiagnozowanym DLBCL. Natomiast ekspresja PD-L1 na poziomie niskim i wysokim częściej występowała w grupie pacjentów z DLBCL niż w grupie pacjentów z FL. Uproszczając można stwierdzić, że ekspresja PD-L1 jest wyższa w chłoniaku rozlanym z dużych limfocytów B niż w chłoniaku grudkowym. Teza ta jest zgodna z założeniem niniejszej pracy, ponieważ spodziewano się, że w chłoniaku DLBCL ze względu na jego bardziej agresywny charakter i przebieg, ekspresja PD-L1 będzie wyższa. Natomiast w przypadku FL zakładano niski poziom ekspresji PD-L1 bądź jej brak.

Wyniki te są zgodne z danymi z piśmiennictwa, ponieważ jak przedstawili Menter i wsp. ekspresję PD-L1 wykazuje 31% przypadków DLBCL oraz tylko 5% FL. Grupa badana stanowiła 253 przypadki DLBCL i 60 przypadków FL, a celem pracy było zbadanie ekspresji PD-L1 na dużą skalę w różnych podtypach chłoniaka z komórek B. Co więcej, analizując dane z wyszczególnieniem stopnia złośliwości FL, tworząc niejako dwa podtypy chłoniaka grudkowego, wykazano większy

odsetek dodatniej reakcji z PD-L1 w stopniu G3 (11%) niż w stopniach G1 i G2 (6%) [78]. W pracy doktorskiej również wykazano podobną zależność, jednak wyniki uzyskano na mniejszej liczbie pacjentów co jest dużym ograniczeniem pracy.

Wartościową pracę na temat schematów ucieczki immunologicznej chłoniaków nieziarnicznych opublikowali w 2015 roku Laurent i współpracownicy [79]. Zbadali to zagadnienie poprzez eksplorację danych transkryptomicznych i immunohistochemicznych (IHC) materiału biopsyjnego od pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem FL i DLBCL. Zdefiniowali oni zestaw genów zaangażowanych w szlaki unikania odpowiedzi przeciwnowotworowej (Immune Escape Gene Set, IEGS) i porównali rozkład poziomów ekspresji tych genów w transkryptomach FL, DLBCL i w normalnych limfocytach B pobranych z dostępnej w ich kraju bazy danych. Wykazano nadekspresję genów PD-1, PD-L1, PD-L2 i LAG3 we wszystkich próbkach chłoniaków, w porównaniu z normalnymi limfocytami B. Badanie immunohistochemiczne materiału dla białek PD-1, PD-L1, PD-L2 i LAG3 potwierdziło ekspresję tych cząsteczek. Wyszczególniono, że 61% pacjentów z DLBCL wykazuje ekspresję PD-L1 (z czego 46% dodatnich reakcji odnotowano na samych komórkach nowotworowych a 15% w mikrośrodowisku nowotworu). W żadnym przypadku chłoniaka grudkowego nie stwierdzono dodatniej reakcji z PD-L1 na komórkach nowotworowych, za to reakcje dodatnie zaobserwowano wyłącznie w mikrośrodowisku nowotworu (zarówno PD-L1 jak i PD-1, PD-L2 i LAG3). Grupa badana była niewielka i obejmowała 27 pacjentów z FL i 27 z DLBCL. Punkt odcięcia dla dodatniego odczynu w PD-L1 wynosiło 10% komórek nowotworowych. Badacze na podstawie analizy danych sformułowali wniosek, że zarówno nowotwory FL, jak i DLBCL wykazują ekspresję genów punktów kontrolnych ucieczki immunologicznej. Co więcej, badanie immunohistochemiczne ujawniło, że podczas gdy nowotwory FL niosą te markery prawie wyłącznie w swoim mikrośrodowisku immunologicznym, DLBCL zawierają te punkty kontrolne w większości, w samych komórkach nowotworowych a nie tylko w swoim mikrośrodowisku. W pracy własnej nie oznaczano immunohistochemicznie komórek tworzących mikrośrodowisko nowotworu, ale opierając się na reakcjach IHC wykonanych w celu postawienia rozpoznania (m.in. CD10, CD19, CD20, CD79a, CD21 i BCL-2 dla FL i CD20, CD22, CD79, CD10, BCL6, MUM1 i CD5 dla DLBCL) z pomocą lekarza patomorfologa typowano komórki nowotworowe i w nich oceniano ekspresję PD-L1. Jednak ogólny wniosek z pracy Laurent i współpracownicy, że ekspresja PD-L1 jest obecna w komórkach nowotworowych DLBCL, a nie ma jej w komórkach nowotworowych FL jest porównywalny z wynikami pracy własnej.

W 2015 roku ukazała się obszerna analiza obejmująca grupę 1253 pacjentów z DLBCL. Kiyasu i wsp. postawili sobie za cel określenie związku kliniczno-patologicznego z dodatnią reakcją PD-L1 w chłoniaku DLBCL [80]. W powyższym badaniu zastosowano technikę podwójnej reakcji immunohistochemicznej z PD-L1 i PAX-5, co było niejako nowatorskim i eksperymentalnym

podejściem. Dlatego porównanie wyników tych badań z wynikami prezentowanej pracy nie jest miarodajne. Jednak wnioski, które wysunięto są podobne do wniosków niniejszej pracy doktorskiej. A mianowicie Kiyasu i współpracownicy odnotowali obecność komórek nowotworowych PD-L1+ w grupie pacjentów w zaawansowanym stadium choroby wg skali Ann Arbour w 71% przypadków, w opozycji do ujemnych reakcji z PD-L1 w grupie pacjentów w ograniczonym stadium choroby wynoszących 29%. Również 71% przypadków PD-L1+ komórek chłoniaka było zakwalifikowanych jako grupa dużego ryzyka wg IPI, a 29% przypadków komórek PD-L1 dodatnich znalazła się w grupie niskiego ryzyka. W powyższej pracy wykonano również analizę wieloczynnikową w celu określenia wartości prognostycznej wykorzystując następujące zmienne: wiek, płeć, stopień zaawansowania klinicznego wg Ann Arbour, stężenie dehydrogenazy mleczanowej, lokalizacje pozawęzłowe, stan sprawności Eastern Cooperative Oncology Group, objawy B, algorytm Hansa (podtyp DLBCL) i ekspresja PD-L1. Badacze stwierdzili, że ekspresja PD-L1 utrzymuje wartość prognostyczną dla wielowymiarowej analizy przeżycia całkowitego (OS) ($P = 0,0323$) i jest powiązana ze złym rokowaniem u pacjentów z DLBCL. Jest to pierwsze doniesienie opisujące kliniczno-patologiczne cechy PD-L1 dodatniego DLBCL. Wysunięto również hipotezę, że w tej podgrupie DLBCL należy rozważyć immunoterapię ukierunkowaną na szlak PD-1/PD-L1. W prezentowanej pracy doktorskiej 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 pacjentów w ograniczonym stadium choroby (14,29%; 2 osoby) niż w grupie pacjentów w zaawansowanym stadium choroby (0%). Analizując rozkład zależności występowania ekspresji PD-L1 od stadium choroby wg skali Ann Arbour można zauważyć, że 100% chorych w stadium zaawansowanym wykazuje ekspresję PD-L1 na poziomie niskim lub wysokim, a w stadium ograniczonym choroby ekspresję PD-L1 wykazuje 85,71% chorych. Nie udało się również potwierdzić istotnych statystycznie związków pomiędzy wynikiem na skali IPI a poziomem ekspresji PD-L1 ($p > 0,05$). Być może kontynuacja badań i zebranie większej ilości pacjentów pozwoliłoby na uzyskanie istotnych statystycznie związków.

Kwon i wsp., przeprowadzili analizę kliniczno-patologiczną ekspresji PD-L1 i PD-1 w komórkach DLBCL oraz w mikrośrodowisku guza [81]. Grupa badana obejmowała 126 pacjentów z rozpoznaniem DLBCL. Wykonano reakcje immunohistochemiczne z PD-L1 i PD-1. Oceniano ekspresję PD-L1 w komórkach nowotworowych i/lub w komórkach immunologicznych naciekających nowotwór (głównie makrofagi) oraz określano liczbę komórek PD-1+ naciekających nowotwór. Punkt odcięcia dla reakcji dodatniej wynosił 10% komórek; zastosowano trójstopniową skalę dla intensywności wybarwienia błony jądrowej komórek. Ekspresję PD-L1 w komórkach guza

zaobserwowano w 61,1% przypadków DLBCL, przy słabym nasileniu w 29,4%, umiarkowanym w 21,4% i silnym w 10,3% przypadków. Silna ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych była istotnie związana z obecnością objawów B (skorygowane $P=0,005$) i zakażeniem wirusem Epsteina-Barr (EBV) (skorygowane $P=0,015$) i miała tendencję do bycia wyższą w immunofenotypie ABC (16,7%) niż w immunofenotypie GCB (2,5%) (skorygowane $P = 0,271$). DLBCL z ekspresją PD-L1 w komórkach nowotworowych/makrofagach wykazywały podobną charakterystykę kliniczno-patologiczną. Ilość komórek PD-1+ naciekających nowotwór korelowały dodatnio z poziomem ekspresji PD-L1 w komórkach nowotworowych ($P = 0,042$) lub w komórkach nowotworowych/makrofagach ($P = 0,03$). Zwiększona infiltracja komórek PD-1+ była związana z wydłużeniem czasu przeżycia wolnego od progresji ($P = 0,005$) i przeżycia całkowitego ($P = 0,026$) u pacjentów z DLBCL leczonych rytuksymabem-cyklofosfamidem, doksorubicyną, winkrystyną, prednizonem (R-CHOP), podczas gdy ekspresja PD-L1 nie miała znaczenia prognostycznego. Wysłunięto następujący wniosek: PD-L1 i PD-1 ulegają zróżnicowanej ekspresji w DLBCL przez komórki nowotworowe i komórki odpornościowe naciekające nowotwór i mogą być potencjalnymi celami terapeutycznymi przy zastosowaniu blokady PD-1/PD-L1. W przedstawionej pracy doktorskiej ze względu na brak dostępu do kompletnych danych klinicznych pacjentów takich jak występowanie objawów B oraz zakażenie wirusem Epsteina – Barr nie przeprowadzono korelacji ekspresji PD-L1 z tymi parametrami. Jednak odsetek przypadków PD-L1 dodatnich w grupie pacjentów DLBCL był podobnie wysoki i wyniósł 93,94%.

Podobne wyniki badań odnośnie występowania reakcji z PD-L1 u pacjentów EBV pozytywnych opublikowali Chen i wsp., [80]. Wszystkie przypadki DLBCL EBV-dodatnie, w tym 9/9 (100%) EBV-dodatnie DLBCL osób starszych i 7/7 (100%) EBV-dodatnie DLBCL związane z niedoborem odporności, wykazywały silną reakcję błonową z PD-L1. Z kolei tylko 7/66 (11%) przypadków DLBCL, NOS z ujemnym wynikiem testu EBV wykazało silną reakcję komórek nowotworowych z PD-L1. Badacze na podstawie swojej analizy wysunęli następujący wniosek: niektóre agresywne chłoniaki z komórek B oraz nowotwory złośliwe związane z wirusami i niedoborem odporności, związane z nieskuteczną odpowiedzią immunologiczną komórek T, wykazują ekspresję PD-L1 na komórkach nowotworowych i naciekających makrofagach. Wyniki te identyfikują grupę nowotworów, które powinny być brane pod uwagę w terapiach ukierunkowanych na PD-1/PD-L1 i potwierdzają metodę wykrywania PD-L1 w materiale tkankowym za pomocą techniki immunohistochemicznej.

W prezentowanej pracy doktorskiej odsetek przypadków dodatnich w grupie pacjentów z DLBCL był znacznie wyższy niż w analizie Chen i wsp., jednak nie wyszczególniono pacjentów zakażonych wirusem EBV. Przepuszczalnie kontynuacja badań, zebranie większej grupy badanej i wyodrębnienie pacjentów EBV dodatnich dałoby podobne rezultaty.

Yang i wsp., przeprowadzili ciekawe badania na grupie pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem B-komórkowym, m. in. DLBCL i FL [83]. Ich badania opierały się na pomiarze stężenia cząsteczki PD-L1 w osoczu krwi pacjentów w trakcie leczenia przeciwnowotworowego z zastosowaniem rytuksumabu i metotreksatu. Grupa badana składała się z 92 pacjentów a grupa kontrolna z 60 zdrowych osób. Poziomy PD-L1 w osoczu przed leczeniem, po 5, 10 i 15 dniach po leczeniu były mierzone testem ELISA. Analizowano korelacje pomiędzy stężeniem PD-L1 a czasem leczenia. Poziom ekspresji PD-L1 w grupie badanej wyniósł 272,86 pg/ml i był znacznie wyższy niż w grupie kontrolnej, gdzie wyniósł tylko 18,24 pg/ml. Najwyższe stężenie odnotowano u pacjentów chorych na DLBCL a najniższe u pacjentów z FL. Analiza korelacji liniowej wykazała, że poziom ekspresji PD-L1 był ujemnie skorelowany z czasem leczenia ($r=-0,683$, $p<0,01$). Badacze stwierdzili, że PD-L1 posiada wysoką skuteczność diagnostyczną dla chłoniaków B-komórkowych i oczekuje się, że będzie skutecznym celem immunoterapeutycznym w tych chorobach.

Z pewnością rozszerzenie badań o oznaczenie stężeń PD-L1 w osoczu krwi pacjentów z DLBCL i FL, u których zamierzamy ocenić ekspresje PD-L1 na materiale tkankowym dałoby interesujące rezultaty. Odwołując się do badania Yang i wsp., można założyć że stężenia te będą wysokie u pacjentów z DLBCL a niskie u pacjentów z FL, ale czy taka zależność potwierdzi się w badaniu immunohistochemicznym? I czy pacjenci wyselekcjonowani w ten sposób do leczenia inhibitorami szlaku PD-1/PD-L1 odpowiedzą na to leczenie? Te pytania pozostawiam otwarte i mam nadzieję, że w niedługim czasie pojawi się na nie odpowiedź.

11. Ograniczenia pracy

Głównym ograniczeniem pracy jest stosunkowo mała liczebność grupy badanej. Nowotwory złośliwe układu chłonnego nie należą do chorób rzadkich, w związku z tym 59 osobowa grupa pacjentów zakwalifikowanych do analizy wydaje się być niewielka w porównaniu do innych badań naukowych, ale nadal jest reprezentatywna. Ilość osób włączona do badania wynikała z kilku ważnych ograniczeń. Przede wszystkim z ograniczonej dostępności do danych klinicznych. Wielu pacjentów w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym miało wykonywaną jedynie biopsję chirurgiczną węzła chłonnego w celu postawienia rozpoznania histopatologicznego. Dalej pacjenci byli kierowani do oddziałów hematologicznych w innych ośrodkach. Po drugie, część materiałów tkankowych była niezadawalająca, nienadająca się do przeprowadzenia miarodajnych reakcji immunohistochemicznych. Po trzecie wysoki koszt odczynników do badań immunohistochemicznych uniemożliwił wykonanie realizacji projektu w zakładanym początkowo wymiarze.

12. Wnioski

1. 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 nie zaobserwowano ekspresji PD-L1.
2. W grupie pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem grudkowym zaobserwowano zależność pomiędzy stwierdzonym stopniem złośliwości a ekspresją PD-L1; 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 znaleziono 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.

13. 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 nivolumabu, 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. Są to: pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab i awelumab, wykazują one działanie w kilku typach nowotworów. 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 grudkowym 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 nie zaobserwowano 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.

14. 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 do not have 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.

15. Piśmiennictwo

- [1] Stachura J, Domagała W, et al. *Patologia - znaczy słowo o chorobie*. Wydawnictwo Polskiej Akademii Umiejętności, Kraków, 2016.
- [2] Ballotti S, Chiarelli F, de Martino M, et al. Autoimmunity: Basic Mechanisms and Implications in Endocrine Diseases. *Horm Res Paediatr* 2006;66:142–52.
- [3] Zou W, Chen L, et al. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2008;8:467–77.
- [4] Nagai S, Azuma M, et al. The CD28–B7 family of co-signaling molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1189, Springer; 2019, p. 25–51.
- [5] Karnell JL, Rieder SA, Ettinger R, Kolbeck R, et al. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Adv Drug Deliv Rev* 2019;141:92–103.
- [6] Grzywnowicz M, Giannopoulos K, et al. Znaczenie receptora programowanej śmierci 1 oraz jego ligandów w układzie immunologicznym oraz nowotworach. *Acta Haematol Pol* 2012;43:132–45.
- [7] Pardoll DM, et al. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12:252–64.
- [8] Wang JC, Xu Y, Huang ZM, Lu XJ, et al. T cell exhaustion in cancer: Mechanisms and clinical implications. *J Cell Biochem* 2018;119:4279–86.
- [9] Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R, et al. The Multiple Pathways to Autoimmunity n.d.
- [10] Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW, et al. Regulated Compartmentalization of Programmed Cell Death-1 Discriminates CD4 + CD25 + Resting Regulatory T Cells from Activated T Cells. *J Immunol* 2006;176:2808–16.
- [11] Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al., et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 2009;206:3015–29.
- [12] Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH, et al. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* 2007;19:309–14.

- [13] Tseng S-Y, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al., et al. B7-DC, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells. vol. 193. 2001.
- [14] Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677–704.
- [15] Chamoto K, Al-Habsi M, Honjo T, et al. Role of PD-1 in immunity and diseases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 410, Springer Verlag; 2017, p. 75–97.
- [16] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. vol. 1. 1992.
- [17] Okazaki T, Honjo T, et al. PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007;19:813–24.
- [18] Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al., et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 1996;8:765–72.
- [19] Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999;11:141–51.
- [20] Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T, et al. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* 1994;23:704–6.
- [21] Riley JL, et al. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 2009;229:114–25.
- [22] Fabrizio FP, Trombetta D, Rossi A, Sparaneo A, Castellana S, Muscarella LA, et al. Gene code CD274/PD-L1 : from molecular basis toward cancer immunotherapy. *Ther Adv Med Oncol* 2018;10:1–18.
- [23] Xie M, Huang X, Ye X, Qian W, et al. Prognostic and clinicopathological significance of PD-1/PD-L1 expression in the tumor microenvironment and neoplastic cells for lymphoma. *Int Immunopharmacol* 2019;77:105999.
- [24] Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al., et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793–800.
- [25] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N, et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1

blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12293–7.

- [26] Wiemann B, Starnes CO, et al. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: A historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994;64:529–64.
- [27] Bickels J, Kollender Y, Merinsky O, Meller I, et al. Coley's toxin: Historical perspective. *Isr Med Assoc J* 2002;4:471–2.
- [28] Wiemann B, Starnes CO, et al. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: A historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994;64:529–64.
- [29] Tsung K, Norton JA, et al. Lessons from Coley's Toxin. *Surg Oncol* 2006;15:25–8.
- [30] Leach DR, Krummel MF, Allison JP, et al. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (80-)* 1996;271:1734–6.
- [31] Dobosz P, Dzieciatkowski T, et al. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2019;10:2965.
- [32] Kang C, Syed YY, et al. Atezolizumab (in Combination with Nab-Paclitaxel): A Review in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Drugs* 2020;80:601–7.
- [33] Oiseth SJ, Aziz MS, et al. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat* 2017;3:250–61.
- [34] Loughlin KR, et al. William B. Coley: His Hypothesis, His Toxin, and the Birth of Immunotherapy. *Urol Clin North Am* 2020;47:413–7.
- [35] Ledford H, Else H, Warren M, et al. Cancer immunologists scoop medicine Nobel prize. *Nature* 2018;562:20–1.
- [36] Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 2006;107:265–76.
- [37] Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al., et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: Results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116:3724–34.
- [38] Biagi JJ, Seymour JF, et al. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. vol. 99. 2002.
- [39] Lorschach RB, Shay-Seymore D, Moore J, Banks PM, Hasserjian RP, Sandlund JT, et al., et al. Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children. vol. 99. 2002.

- [40] Leich E, Ott G, Rosenwald A, et al. Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;24:95–109.
- [41] Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M, et al., et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: A retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* 2015;16:1111–22.
- [42] Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al., et al. World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting - Airlie house, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835–49.
- [43] Kahl BS, Yang DT, et al. Follicular lymphoma: evolving therapeutic strategies. *Blood* 2016;127:2055–63.
- [44] Lech-Marańda E, Warzocha K, et al. Ocena stopnia zaawansowania i odpowiedzi na leczenie u chorych na chłoniaka Hodgkina i chłoniaki nie-Hodgkina-rekomendacje międzynarodowej grupy roboczej z Lugano. *Hematologia* 2015;6:223–32.
- [45] Bell D, Gaillard F, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *Radiopaedia.org*, 2010.
- [46] Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al., et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104:1258–65.
- [47] Nooka AK, Nabhan C, Zhou X, Taylor MD, Byrtek M, Miller TP, et al., et al. Examination of the follicular lymphoma international prognostic index (FLIPI) in the national lymphocare study (NLCS): A prospective US patient cohort treated predominantly in community practices. *Ann Oncol* 2013;24:441–8.
- [48] Luminari S, Cox MC, Montanini A, Federico M, et al. Prognostic tools in follicular lymphomas. *Expert Rev Hematol* 2009;2:549–62.
- [49] Ardeshtna KM, Smith P, Norton A, Hancock BW, Hoskin PJ, MacLennan KA, et al., et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: A randomised controlled trial. *Lancet* 2003;362:516–22.
- [50] Solal-Céligny P, Bellei M, Marcheselli L, Pesce EA, Pileri S, McLaughlin P, et al., et al. Watchful waiting in low-tumor burden follicular lymphoma in the rituximab era: Results of

an F2-study database. *J Clin Oncol* 2012;30:3848–53.

- [51] Álvaro-Naranjo T, Lejeune M, Salvadó MT, Lopez C, Jaén J, Bosch R, et al., et al. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 2006;24:5350–7.
- [52] Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, Emara M, Potter KN, Johnson P, et al., et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:18587–92.
- [53] Van Leeuwen MT, Turner JJ, Joske DJ, Falster MO, Srasuebku P, Meagher NS, et al., et al. Lymphoid neoplasm incidence by WHO subtype in Australia 1982-2006. *Int J Cancer* 2014;135:2146–56.
- [54] Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E, et al. Incidence of haematological malignancy by sub-type: A report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2011;105:1684–92.
- [55] Shirley MH, Sayeed S, Barnes I, Finlayson A, Ali R, et al. Incidence of haematological malignancies by ethnic group in England, 2001-7. *Br J Haematol* 2013;163:465–77.
- [56] Shenoy PJ, Malik N, Nooka A, Sinha R, Ward KC, Brawley OW, et al., et al. Racial differences in the presentation and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma in the United States. *Cancer* 2011;117:2530–40.
- [57] Nogai H, Dörken B, Lenz G, et al. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2011;29:1803–11.
- [58] Warzocha K, et al. Chłoniak rozlany z dużych komórek B — zasady postępowania w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii Diffuse. vol. 4. “Via Medica”; 2013.
- [59] Lenz G, Staudt LM, et al. Aggressive Lymphomas. *N Engl J Med* 2010;362:1417–29.
- [60] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Lee Harris N, Stein H, Siebert R, et al., et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127:2375–90.
- [61] Li S, Young KH, Medeiros LJ, et al. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology* 2018;50:74–87.
- [62] Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, et al., et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol* 2011;29:1452–7.

- [63] Møller MB, Pedersen NT, Christensen BE, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: Clinical implications of extranodal versus nodal presentation - A population-based study of 1575 cases. *Br J Haematol* 2004;124:151–9.
- [64] Takahashi H, Tomita N, Yokoyama M, Tsunoda S, Yano T, Murayama K, et al., et al. Prognostic impact of extranodal involvement in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer* 2012;118:4166–72.
- [65] Castillo JJ, Winer ES, Olszewski AJ, et al. Sites of extranodal involvement are prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: An analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Am J Hematol* 2014;89:310–4.
- [66] Miyazaki K, et al. Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 2016;56:79–88.
- [67] Larouche JF, Berger F, Chassagne-Clément C, Ffrench M, Callet-Bauchu E, Sebban C, et al., et al. Lymphoma recurrence 5 years or later following diffuse large B-cell lymphoma: Clinical characteristics and outcome. *J Clin Oncol* 2010;28:2094–100.
- [68] Maurer MJ, Ghesquiè H, Jais J-P, Witzig TE, Haioun C, Thompson CA, et al., et al. Event-Free Survival at 24 Months Is a Robust End Point for Disease-Related Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Immunochemotherapy. *J Clin Oncol* 2014;32:1066–73.
- [69] El-Galaly T, Mylam KJ, Bøgsted M, Brown P, Rossing M, Gang AO, et al., et al. Role of routine imaging in detecting recurrent lymphoma: A review of 258 patients with relapsed aggressive non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol* 2014;89:575–80.
- [70] Brenner DJ, Hall EJ, et al. Computed Tomography — An Increasing Source of Radiation Exposure. *N Engl J Med* 2007;357:2277–84.
- [71] Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, Kong K, et al., et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: A correlative biomarker study. *Lancet Oncol* 2015;16:541–9.
- [72] Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, Soo J, Craig AFM, Esfahani MS, et al., et al. Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2018;36:2845–53.
- [73] Liu Y, Barta SK, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2019;94:604–16.

- [74] Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X, et al. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res* 2017;5.
- [75] Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C, et al. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2017;4:92–101.
- [76] Kersten MJ, Spanjaart AM, Thieblemont C, et al. CD19-directed CAR T-cell therapy in B-cell NHL. *Curr Opin Oncol* 2020;32:408–17.
- [77] Gravelle P, Burroni B, Péricart S, Rossi C, Bezombes C, Tosolini M, et al., et al. Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: A summary of immunohistochemical studies. *Oncotarget* 2017;8:44960–75.
- [78] Menter T, Bodmer-Haecki A, Dirnhofer S, Tzankov A, et al. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. *Hum Pathol* 2016;54:17–24.
- [79] Laurent C, Charmpi K, Gravelle P, Tosolini M, Franchet C, Ysebaert ic, et al., et al. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas n.d.
- [80] Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, et al., et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2015;126:2193–201.
- [81] Kwon D, Kim S, Kim PJ, Go H, Nam SJ, Paik JH, et al., et al. Clinicopathological analysis of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1 expression in the tumour microenvironments of diffuse large B cell lymphomas. *Histopathology* 2016;68:1079–89.
- [82] Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, Sun HH, Roemer MG, Xu ML, et al., et al. PD-L1 Expression is Characteristic of a Subset of Aggressive B-Cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies. *Clin Cancer Res* 2013;19:3462–73.
- [83] Yang J, Hu G, et al. Significance of PD-L1 in the diagnosis and treatment of B-cell malignant lymphoma. *Oncol Lett* 2019;17:3382–6.
- [84] <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/> dostę: 12.02.2021
- [85] <https://hematoonkologia.pl/chloniak-nie-hodgkina/diagnoza> – dostę: 23.08.2021