

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Vesna MAKOVŠEK

**IZRAŽANJE POVRŠINSKEGA ANTIGENA CD20 PRI
BOLNIKI S FOLIKULARNIM LIMFOMOM**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Vesna MAKOVŠEK

**IZRAŽANJE POVRŠINSKEGA ANTIGENA CD20 PRI BOLNIKI S
FOLIKULARNIM LIMFOMOM**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

**EXPRESSION OF CD20 ANTIGEN IN PATIENTS WITH
FOLLICULAR LYMPHOMA**

M. Sc. Thesis

Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Onkološkem inštitutu Ljubljana, Zaloška cesta 2, v Laboratoriju za pretočno citometrijo oddelka za citopatologijo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje in Senat oddelka sta z dnevom 23. 1. 2015 imenovala za mentorico prof. dr. Majo Čemažar, za somentorico doc. dr. Veroniko Kloboves Prevodnik in za recenzenta prof. dr. Roka Kostanjška.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Maja ČEMAŽAR

Onkološki inštitut Ljubljana

Članica: doc. dr. Veronika Kloboves Prevodnik, dr. med.

Onkološki inštitut Ljubljana

Član: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Vesna MAKOVŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
 DK UDK 6:616(043.2)=163.6
 KG rituksimab/površinski antigen CD20/pretočna citometrija/folikularni limfom/Ne hodgkinov limfom/
 AV diplomirana biologinja MAKOVŠEK, Vesna
 SA ČEMAŽAR, Maja (mentorica)/KLOBOVES PREVODNIK, Veronika (somentorica)/KOSTANJŠEK, Rok (recenzent)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
 LI 2015
 IN IZRAŽANJE POVRŠINSKEGA ANTIGENA CD20 PRI BOLNIKI S FOLIKULARNIM LIMFOMOM
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
 OP XII, 68 str., 15 pregl., 26 sl, 60 vir.
 IJ sl
 JI sl/en

AI Anti-CD20 monoklonsko protitelesko rituksimab (R) je najbolj uveljavljeno biološko zdravilo, ki dokazuje izboljšano celokupno odzivanje (CO) na zdravljenje in celokupno preživetje bolnikov z limfomi celice B. Ker je bilo doslej opravljenih le nekaj raziskav na temo povezave med izražanjem antigena CD20 na rakavih celicah in uspehom zdravljenja limfomov celic B, je bil namen naloge raziskati omenjeno povezavo pri bolnikih s folikularnim limfomom (FL). V prvem delu smo ugotavljali povezavo med izraženostjo CD20 in klinično patološkimi dejavniki ter povezavo med stopnjo izražanja CD20 in uspehom zdravljenja z R. V drugem delu raziskave smo preverjali, ali se stopnja izražanja antigena CD20 med zdravljenjem spreminja v odvisnosti od časa in izbora zdravljenja. V prvi del naloge smo vključili 74 bolnikov s FL, ki so bili v obdobju med letoma 2005 in 2011 zdravljeni na Onkološkem inštitutu v Ljubljani (OIL) in pri katerih je bila pred začetkom zdravljenja narejena citopatološka preiskava z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom (IFC). V drugi del naloge smo vključili 12 bolnikov s ponovitvijo bolezni, pri katerih je bila citopatološka preiskava z IFC narejena tri ali večkrat. Na podlagi rezultatov meritev vzorcev, pridobljenih z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo (ABTI), smo semikvantitativno določili intenziteto izražanja antigena CD20. Učinkovitost zdravljenja smo ocenili s (CO), preživetjem brez ponovitve bolezni in celokupno preživetje. Pokazali smo, da na preživetje bolnikov s FL vpliva le starost nad 60 let ($p < 0,028$), medtem ko drugi klinično patološki dejavniki na preživetje ne vplivajo. Pri 47 bolnikih, zdravljenih z R, smo določili mejno vrednost izraženosti antigena CD20 pri 30000 molecules of equivalent soluble fluorochrome (MESF) in potrdili, da je ta napovedni dejavnik, ki napoveduje boljši CO na zdravljenje z R ($p < 0,0001$) in boljše celokupno preživetje (razmerje tveganja [HR], 3,922; 95-% interval zaupanja [CI], 1,122–66,731, $p = 0,041$) pri bolnikih, ki imajo CD20 izražen nad mejno vrednostjo. Statistično značilne razlike v preživetju brez ponovitve bolezni med skupinama bolnikov z izraženim antigenom CD20 pod in nad mejno vrednostjo nismo ugotovili (HR = 0,0; 95-% CI = 0,003–36,930, $p = 0,646$). Mejna vrednost izražanja CD20 pri 30000 MESF je poleg starosti pomemben napovedni dejavnik celokupnega preživetja tudi pri vseh 74 bolnikih, vključenih v raziskavo. Pokazali smo tudi, da se izražanje antigena CD20 s časom spreminja v določenem območju in da so ta nihanja večja, če bolnika zdravimo. Če je CD20 pred prvim zdravljenjem izražen pod mejno vrednostjo, bo tudi po zdravljenju ostal izražen pod njo. Rezultati tako potrjujejo medsebojno povezavo izraženosti CD20 ter odgovora na zdravljenje in preživetja bolnikov s FL. Mejna vrednost izraženosti antigena CD20 bi bilo treba upoštevati pri načrtovanju zdravljenja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
 DC UDC 6:616(043.2)=163.6
 CX rituximab/CD20/ flow cytometry/follicular lymphoma/non-Hodgkin lymphoma
 AU graduate biologist MAKOVŠEK, Vesna
 AA ČEMAŽAR, Maja (supervisor)/KLOBOVES PREVODNIK, Veronika (co-advisor) /Rok KOSTANJŠEK (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study in Structural and functional biology
 PY 2015
 TI THE PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF CD20 EXPRESSION IN FOLLICULAR LYMPHOMA
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
 NO XII, 66 p., 15 tab., 26 fig., 60 ref.
 LA sl
 AL sl/en

AB The anti-CD20 monoclonal antibody rituximab (R) is the most common biological drug that has improved the overall response rate as well as the overall survival (OS) of patients with B-cell lymphomas (BCL). Only a few studies, examining whether higher CD20 expression parallels with better treatment outcome and OS. The main objective of this study was to investigate the expression of CD20 in patients with FL and its relevance in treatment. In the first part of our study, looked into the relationship between CD20 expression level and treatment response to R. In the second part of the study, we examined whether variation of expression level of CD20 antigen during the treatment depended on the time and the type of therapy. Seventy-four patients with primary FL treated at the Institute of Oncology Ljubljana (OIL) between 2005 and 2011 were enrolled in the first part of the study. All the patients had the CD20 expression assessed prior to the beginning of the treatment by quantitative flow-cytometric measurements. In the second part of the study, we included 12 patients with disease relapse and all 12 patients had the CD20 expression assessed minimum three times. Based on the samples' measurement results, obtained with fine needle aspiration biopsy (FNAB), the intensity of CD20 expression was determined semi-quantitative. The treatment outcome was evaluated in terms of overall response rate (ORR), disease-free survival (DFS) and OS. We showed that only age over 60 years has a negative impact on OS ($p < 0,028$), while other clinicopathological parameters have no significant effect. The cut-off value of CD20 expression was determined at 30000 molecules of equivalent soluble flouochrome (MESF) in 47 patients with FL treated with R. Our data show that the level of CD20 expression above the cut-off value is a predictive factor that predicts better ORR after R therapy ($p < 0,0001$) and better OS (hazard ratio [HR], 3,922; 95% confidence interval [CI], 1,122-66,731, $p = 0,041$). No significant difference was observed in DFS between the patients with CD20 antigen expressed above the cut-off value and those expressing CD20 antigen below the cut-off value (HR=0.0; 95% CI=0.003-36.930, $p = 0.646$). Besides age, the cut-off value at 30000 MESF was an important predictive factor of OS also for all the 74 patients, included in our study. We also showed that CD20 expression alters in relation to time in a specific range and that these alterations are higher if the treatment is induced. If the level of CD20 expression is below the cut-off value before the treatment is induced, it will remain expressed bellow this value. These results confirm the correlation between a higher level of CD20 expression and the improved ORR and OS in patients with FL. This cut-off value should be considered when the decision regarding treatment is taken.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 MALIGNI LIMFOMI	2
2.2 FOLIKULARNI LIMFOM	2
2.2.1 Etiologija in patogene za	3
2.2.2 Epidemiologija	3
2.2.3 Morfološke in klinične značilnosti	4
2.2.4 Diagnostika	4
2.3 ZDRAVLJENJE	5
2.3.1 Vloga rituksimaba v zdravljenju FL	5
2.3.2 Novi pristopi zdravljenja FL	6
2.3.3 Smernice zdravljenja	6
2.4 BIOLOŠKA ZDRAVILA	8
2.4.1 Rituksimab	9
2.5 POVRŠINSKI ANTIGENI, POMEMBNI ZA ZDRAVLJENJE Z BIOLOŠKIMI ZDRAVILI	12
2.5.1 Površinski antigen CD20	12
2.5.2 Spremembe v izražnosti površinskega antigena CD20	13
2.5.3 Merjenje izražanja površinskih antigenov oziroma CD20	14
2.6 NAMEN DELA	15
3 ZASNOVA RAZISKAVE IN METODE	16
3.1 BOLNIKI	16
3.2 CITOPATOLOŠKA PREISKAVA	16

3.3	IMUNOFENOTIPIZACIJA S PRETOČNIM CITOMETROM	17
3.3.1	Štetje celic	17
3.3.2	Postavitev delovne diagnoze limfoma in izbor protiteles	17
3.3.3	Priprava vzorcev za meritev s pretočnim citometrom	18
3.3.4	Meritev s pretočnim citometrom	18
3.3.5	Analiza rezultatov pretočnocitometričnih meritev	18
3.3.6	Kvantifikacija intenzitete izražanja površinskega antigena CD20	20
3.4	DOLOČANJE KLINIČNEGA STADIJA	20
3.5	OCENA ODGOVORA NA ZDRAVLJENJE	21
3.6	DOLOČITEV MEJNE VREDNOSTI IZRAŽANJA POVRŠINSKEGA ANTIGENA CD20	21
3.7	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	22
4	REZULTATI	23
4.1	KLINIČNE IN PATOLOŠKE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV TER NAČIN IN POTEK ZDRAVLJENJA	24
4.1.1	Celokupno preživetje bolnikov, vključenih v prvi del naloge	28
4.2	INTENZITETA IZRAŽENOSTI POVRŠINSKEGA ANTIGENA CD20 V IZHODNIH VZORCIH PRI BOLNIKI S FOLIKULARNIM LIMFOMOM, KI SMO JIH VKLJUČILI V PRVI DEL NALOGE	31
4.2.1	Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s starostjo bolnikov	31
4.2.2	Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s histološkim gradusom bolezni	32
4.2.3	Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 z razširjenostjo bolezni	33
4.2.4	Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s ponovitvijo bolezni	34
4.2.5	Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 z načinom začetnega zdravljenja	36
4.3	USPEŠNOST ZDRAVLJENJA FOLIKULARNEGA LIMFOMA Z RITUKSIMABOM	37
4.3.1	Določitev mejne vrednosti izraženosti površinskega antigena CD20 kot napovednega faktorja	37

4.3.2	Povezanost intenzitete izražanja površinskega antigena CD20 s kvaliteto odgovora na zdravljenje z rituksimabom	39
4.3.3	Povezanost intenzitete izražanja površinskega antigena CD20 s trajanjem odgovora na zdravljenje z rituksimabom	41
4.3.4	Povezanost intenzitete izražanja površinskega antigena CD20 s celokupnim preživetjem	43
4.4	VPLIV NAČINA ZDRAVLJENJA NA IZRAŽANJE POVRŠINSKEGA ANTIGENA CD20	47
5	RAZPRAVA	51
6	SKLEPI	59
7	POVZETEK	60
8	VIRI.....	62
	ZAHVALA.....	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Osnovni panel protiteles.....	17
Pregl. 2:	Razlogi izključitve bolnikov iz raziskave	23
Pregl. 3:	Klinične in patološke značilnosti v raziskavo vključenih bolnikov s folikularnim limfomom	25
Pregl. 4:	Podatki o načinu in uspehu zdravljenja.....	27
Pregl. 5:	Statistično značilne razlike v celokupnem preživetju med skupinami bolnikov z različno starostjo (test krivulj preživetja »log-rank«)	28
Pregl. 6:	Intenziteta izraženosti površinskega antigena CD20 pri bolnikih, starejših in mlajših od 70 let.....	31
Pregl.7:	Intenziteta izraženosti površinskega antigena CD20 v odvisnosti od gradusa folikularnega limfoma	32
Pregl. 8:	Intenziteta izraženosti površinskega antigena CD20 glede na stadij bolezni ...	33
Pregl. 9:	Intenziteta izraženosti površinskega antigena CD20 pri bolnikih brez ponovitve FL in pri bolnikih s ponovitvijo FL	35
Pregl. 10:	Intenziteta izraženosti površinskega antigena CD20 glede na način začetnega zdravljenja.....	36
Pregl. 11:	Statistično značilne razlike v izraženosti površinskega antigena CD20 med skupinami bolnikov, zdravljenih z rituksimabom (test krivulj preživetja »log-rank«).....	38
Pregl. 12:	Porazdelitev bolnikov, zdravljenih z R, glede na kvaliteto odgovora.....	39
Pregl. 13:	Skupine bolnikov glede na starost in izraženost površinskega antigena CD20	44
Pregl. 14:	Primerjava preživetja skupin bolnikov glede na izražanje antigena CD20 in starost.....	45
Pregl. 15:	Preživetje bolnikov glede na izražanje CD20 in starost.....	46
Pregl. 16:	Spreminjanje izražanja površinskega antigena CD20 v odvisnosti od časa in vrste terapije.....	47

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Zgradba rituksimaba.....	9
Sl. 2:	Mehanizem delovanja monoklonskih protiteles (Cheson and Leonard, 2008: 615)	10
Sl. 3:	Zgradba površinskega antigena CD20 (Winiarska in drugi, 2011: 278).....	13
Sl. 4:	Rezultati meritev kalibracijskih kroglic Sphero Rainbow, označenih z APC.....	19
Sl. 5:	Kalibracijski graf za APC-kanal, ki nam pove, ali je delovanje pretočnega citometra linearno in ga lahko uporabljamo tudi za kvantifikacijo celičnih antigenov.....	19
Sl. 6:	Celokupno preživetje skupin bolnikov s starostmi, pri katerih se krivulji preživetja statistično razlikujeta	29
Sl. 7:	Celokupno preživetje bolnikov glede na število linij zdravljenja	29
Sl. 8:	Celokupno preživetje v odvisnosti od gradusa bolezni, stadija in načina začetnega zdravljenja.....	30
Sl. 9:	Izraženost površinskega antigena CD20 pri bolnikih, starejših in mlajših od 60 let	32
Sl. 10:	Izraženost površinskega antigena CD20 v odvisnosti od gradusa bolezni.....	33
Sl. 11:	Grafični prikaz razporeditve izraženosti površinskega antigena CD20 v odvisnosti od stadija bolezni	34
Sl. 12:	Grafični prikaz razporeditve izraženosti površinskega antigena CD20 v odvisnosti od ponovitve bolezni.....	35
Sl. 13:	Grafični prikaz razporeditve izraženosti površinskega antigena CD20 v odvisnosti od načina začetnega zdravljenja	37
Sl. 14:	Celokupno preživetje s stopnjo izraženosti CD20, pri kateri se krivulji preživetja statistično razlikujeta	38
Sl. 15:	Rezultat meritev kalibracijskih kroglic Sphero Rainbow, označenih s FITC, (A) in rezultat meritev izražanja antigena CD20 (B) z označenimi mejnimi vrednostmi CD20, pri katerih se krivulji preživetja statistično razlikujeta	39
Sl. 16:	Grafični prikaz porazdelitve izraženosti površinskega antigena CD20 glede na kvaliteto odgovora	40

Sl. 17:	Porazdelitev bolnikov, zdravljenih z R, glede na kvaliteto odgovora in mejno vrednost izraženosti površinskega antigena CD20 (30000 MESF)	41
Sl. 18:	Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s trajanjem odgovora	42
Sl. 19:	Preživetje brez ponovitve bolezni za bolnike z intenziteto izražanja površinskega antigena CD20 nad in pod mejno vrednostjo 30000 MESF ter nad in pod potencialno mejno vrednostjo 70000 MESF	42
Sl. 20:	Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s celokupnim preživetjem	43
Sl. 21:	Celokupno preživetje glede na mejno vrednost (30000 MESF)	44
Sl. 22:	Preživetje treh skupin bolnikov z izražanjem CD20 pod 30000 MESF, med 30000 in 70000 MESF ter nad 70000 MESF	45
Sl. 23:	Vpliv starosti in izražanja CD20 na preživetje bolnikov s FL	46
Sl. 24:	Izražanje površinskega antigena CD20 pri bolniku na opazovanju in pri bolniku, ki je bil zdravljen le z radioterapijo. Razpon izražanja CD20 je označen s sivo barvo, mejna vrednost izražanja CD20 pri 30000 MESF pa z rdečo črto.	48
Sl. 25:	Vpliv kemoterapije in radioterapije na izražanje antigena CD20. Razpon izražanja CD20 je označen s sivo barvo, mejna vrednost izražanja CD20 pri 30000 MESF pa z rdečo črto.	49
Sl. 26:	Vpliv imunokemoterapije na izražanje antigena CD20. Razpon izražanja CD20 je označen s sivo barvo, mejna vrednost izražanja CD20 pri 30000 MESF pa z rdečo črto.	50

SLOVARČEK

ABTI	aspiracijska biopsija s tanko iglo
ADCC	s protitelesi posredovana celična citotoksičnost
APC	alofikocianin (<i>angl.</i> »allophycocyanin«)
BCR	B-celični receptor
CI	interval zaupanja (<i>angl.</i> »confidence interval«)
CD	<i>angl.</i> »cluster of differentiation«
CDC	od komplementa odvisna citotoksičnost
CO	celokupni odgovor
Cys	cistein (<i>angl.</i> »cysteine«)
DO	delni odgovor
DVCLB	difuzni velikocelični limfom B
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (<i>angl.</i> »ethylenediaminetetraacetic acid«)
FITC	fluorescein izotiocianat (<i>angl.</i> »fluorescein isothiocyanate«)
FL	folikularni limfom
FLIPI	mednarodni prognostični indeks za folikularni limfom (<i>angl.</i> »Follicular lymphoma international prognostic index«)
HL	Hodgkinov limfom
Hpf	vidno polje pri veliki povečave (<i>angl.</i> »high-power field«)
HR	razmerje tveganja (<i>angl.</i> »hazard ratio«)
IFC	imuno fenotipizacija s pretočnim citometrom
IPI	mednarodni prognostični indeks (<i>angl.</i> »International prognostic index«)
Ig	imunoglobulin
I-KT	imunokemoterapija
kDA	kilodalton

KLL	kronična limfocitna levkemija
KT	kemoterapija
mAb	monoklonsko protiteło
MAC	kompleks membranskega napada (<i>angl.</i> »membrane attack complex«)
MESF	enota izraženosti površinskih antigenov, merjenih s pretočno citometrijo (<i>angl.</i> »Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome«)
NHL	Nehodgkinov limfom
NK	celice ubijalke (<i>angl.</i> »natural killer cells«)
OIL	Onkološki inštitut Ljubljana
PB	progres bolezni
PE	fikoeritrin (<i>angl.</i> »phycoerythrin«)
PerCP	peridinin klorofil protein (<i>angl.</i> »peridinin chlorphyll protein«)
PerCP-Cy5.5	peridinin klorofil protein Cy5.5 (<i>angl.</i> »peridinin chlorphyll protein-Cy5.5«)
PKMC	avtologna presaditev krvotvornih matičnih celic
PO	popolni odgovor
R	rituksimab
RT	radioterapija
SD	stabilna bolezen
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
TLR	tolu podobni receptorji (<i>angl.</i> »Toll-like receptors«)

1 UVOD

Površinski antigeni CD opredeljujejo imunofenotipske značilnosti malignih tumorjev, ki so pomembne tako za diagnostiko limfomov kot za načrtovanje zdravljenja s sodobnimi biološkimi zdravili. Površinski antigeni CD se izrazijo kot posledica preureditve genov med diferenciacijo limfocitov. Profil teh se razlikuje med različnimi celicami B in T ter njihovimi razvojnimi stopnjami. Za razvoj bioloških zdravil so najbolj primerni tisti površinski antigeni, ki so izraženi le na malignih celicah ali le na določenem tipu celic, saj se s tem zmanjšajo stranski učinki in nespecifična toksičnost zdravil. Eden takih je površinski antigen CD20, ki se izraža na limfocitih B. Zato je tudi najpogosteje uporabljen kot tarča za imunoterapijo limfomov B (Zola, 2001).

V zadnjem desetletju se je v zdravljenju limfomov uveljavila uporaba monoklonskih protiteles, predvsem rituksimaba, monoklonskega protitelesa proti površinskemu antigenu CD20. Rituksimab je najbolj razširjeno biološko zdravilo v zdravljenju limfomov B, zato je raziskovanje izražanja antigena CD20 ključnega pomena (Adams in Weiner, 2005; Cheson in Leonard, 2008). Kljub temu je bilo narejenih le nekaj študij, s katerimi so raziskovali izražanje CD20 pri pacientih z limfomi B, in še manj študij izražanja CD20 pri bolnikih s folikularnim limfomom.

Učinkovitost zdravljenja se razlikuje med posameznimi tipi limfomov B in je odvisna od dejavnikov, kot so razširjenost bolezni in število predhodnih zdravljenj, ter stopnje izraženosti površinskega antigena CD20, ki se med zdravljenjem lahko spreminja (Suzuki in sod., 2012; Terui in sod., 2009; Olejniczak in sod., 2008).

V sklopu raziskav za magistrsko nalogo smo želeli raziskati, kako se spreminja izražanje antigena CD20 v odvisnosti od zdravljenja in drugih kliničnih ter patoloških značilnosti pri bolnikih s folikularnim limfomom. Naš namen je bil preveriti, ali je izražanje antigena CD20 odvisno od gradusa, stadija bolezni, ponovitve bolezni in izbora prvega zdravljenja (prva hipoteza). Želeli smo tudi preveriti, ali je izražanje antigena CD20 povezano z odgovorom na zdravljenje (druga hipoteza). Na koncu smo preverjali še, ali se stopnja izražanja antigena CD20 med zdravljenjem spreminja v odvisnosti od časa in izbora zdravljenja (tretja hipoteza).

Pričakujemo, da bomo z rezultati raziskave prispevali k boljšemu razumevanju izražanja površinskega antigena CD20 pri bolnikih s folikularnim limfomom in vpliva rituksimaba na to.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MALIGNI LIMFOMI

Maligni limfomi so heterogena skupina novotvorb, ki nastanejo zaradi nenadzorovanega razraščanja celic limfatičnega tkiva. So klonske bolezni, ki nastanejo z maligno preobrazbo ene celice limfatične vrste B, T ali naravne celice ubijalke (NK). Glede na izvor maligne celice, histološko sliko, klinično sliko, potek in prognozo delimo maligne limfome na prekuzorske limfoidne neoplazme, zrele neoplazme B, zrele neoplazme T/NK in Hodgkinov limfom (Swerdlow in sod., 2008). Kljub temu da je bila ta klasifikacija sprejeta in objavljena že v letu 2008, se v kliniki in tudi v literaturi še vedno uporablja stara klasifikacija, kjer so bili maligni limfomi razdeljeni na Hodgkinove limfome (HL) in Nehodgkinove limfome (NHL) (Novaković in sod., 2009; Jezeršek Novaković, 2011).

NHL je skupina limfomov, ki obsega okrog 55 različnih vrst limfomov. Po klasifikaciji Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) te razdelimo na B-celične (34) in T/NK-celične limfome (21), obe skupini pa še naprej na nezrele in zrele (periferne) limfome. Zrele limfome B in T zaradi zelo različnega poteka bolezni klinično razdelimo na visokomaligne ali agresivne in nizkomaligne ali indolentne limfome (Jezeršek Novaković, 2013).

Pri indolentnih limfomih se tumorske celice delijo in razmnožujejo počasi, zaradi česar bolezen v začetnih stadijih težko odkrijemo. Bolniki lahko preživijo več let, vendar bolezen še vedno ni ozdravljiva. Pri agresivnih limfomih se tumorske celice hitro delijo in razmnožujejo. Če bolezni ne zdravimo, ta napreduje hitro, preživetje pa je kratko. V nasprotju z indolentnim limfomom je agresivni limfom ozdravljiv. Pristop k zdravljenju se med skupinama močno razlikuje.

2.2 FOLIKULARNI LIMFOM

Folikularni limfom (FL) je drugi najpogostejši limfom v zahodnem svetu za difuznim velikoceličnim limfomom B (DVCLB). Prizadane celice B v bezgavkah, prepoznane pa je po vsaj delnem folikularnem vzorcu rasti, lahko pa raste tudi difuzno. Delež folikularnih oziroma difuznih območij se razlikuje med posameznimi primeri in je domnevno povezan s prognozo. FL ne delimo v posamezne podtipе, ampak jih razlikujemo glede na gradus (nizki in visoki gradus), ki ga določimo na podlagi števila centroblastov (velike nukleolarne celice). Celice FL izražajo površinske imunoglobuline Ig in s celicami B povezane površinske antigene (CD19, CD20, CD22, CD79a, CD79b, CD10). Klinični potek bolezni se razlikuje glede na stopnjo malignosti in razširjenost bolezni. Ocenev poteka bolezni in izbor zdravljenja pa temelji na napovednih dejavnikih (Vitolo in sod., 2008).

2.2.1 Etiologija in patogeneza

Vzrok za nastanek FL ostaja neznan. Nekatere študije primerov so sicer pokazale nekoliko povišano tveganje v primeru izpostavljenosti pesticidom, kajenju in nekaterim drugim snovem, vendar je to tveganje majhno. Vzročna povezava z domnevno z limfomi povezanimi virusnimi okužbami (Ebstein-Barrov virus, humani T-limfocitotropni virus 1, HPV 8, virus hepatitisa C) ni bila ugotovljena, prav tako pa tudi ne povezava s pomanjkljivo imunsko odzivnostjo (Jaffe in sod., 2011).

Na molekularnem nivoju so pri nastanku limfomov pogoste kromosomske translokacije (Jezeršek Novaković, 2011). Karakteristična molekularna značilnost FL je translokacija t(14;18) (q32;q21), ki je prisotna pri 60–90 % primerov. Do translokacije pride v zgodnji fazi razvoja B-celic, med preureditvijo genov za imunoglobuline (Ig) (Vitulo in sod., 2008). Ta povzroči prekomerno izražanje proteina *bcl-2*, ki ovira normalen proces apoptoze limfocitov v germinalnem centru. Omenjena translokacija je prisotna tudi pri 25 % nebolelih in ne zadostuje za nastanek FL. Za nastanek limfoma so potrebne še druge genetske spremembe. Pri veliki večini bolnikov tako najdemo poleg translokacije t(14;18)(q32;q21) tudi dodatne genetske spremembe, kot so pridobitev, izguba ali mutacije genov *MLL2*, *EPHA7*, *TNFRSF14*, *BCL6*, *CREBBP*, *EZH2* in številnih drugih. Te lahko povzročijo transformacijo v agresivnejšo obliko limfoma (DVCLB). Neznano ostaja, v kateri stopnji razvoja B-celic nastopijo omenjene genetske spremembe, prav tako je nepojasnjena tudi njihova povezanost s translokacijo t(14;18)(q32;q21) in njihov vpliv na patogenezo (Hiddemann in Cheson, 2014).

2.2.2 Epidemiologija

FL predstavlja 20–30 % vseh Nehodgkinovih limfomov (NHL). Pogosteje obolevajo starejši z mediano starostjo ob postavljeni diagnozi med 55 in 59 let. V nasprotju z drugimi malignimi obolenji se FL pojavlja enako pogosto pri moških in ženskah. Nastopi lahko tudi pri posameznikih, mlajših od 20 let. Oboleni so večinoma fantje z visokim gradusom (gradus 3) (Jaffe in sod., 2011).

Pogosteje se pojavlja v zahodnih državah. V ZDA predstavlja 40 % vseh NHL in do 70 % vseh indolentnih limfomov. Incidenca je bila ocenjena med 2,7 in 3,0 na 100.000 prebivalcev (Jaffe in sod., 2011).

V Sloveniji letno obravnavamo nekaj manj kot 400 bolnikov z novoodkritimi NHL. Po podatkih Registra raka Republike Slovenije je v letu 2011 za NHL zbolelo 346 bolnikov, medtem ko je bila za FL incidenca 46. Groba incidenčna stopnja je bila ocenjena na 4,15

na 100.000 prebivalcev. Tako v Sloveniji kot v drugih zahodnih državah obolenje za NHL iz leta v leto narašča, in sicer za 3 % letno (Rak v Sloveniji, 2011).

2.2.3 Morfološke in klinične značilnosti

FL je prepoznaven po folikularnem tipu rasti. Normalna struktura bezgavke je običajno delno ali popolno zabrisana. V histološki mikroskopski sliki prevladujejo neoplastični folikli ali pa področja z difuznim načinom rasti limfoma. Neoplastični folikli niso polarizirani, nimajo plaščne cone in so podobne oblike in velikosti. Prevladujoče celice, ki tvorijo neoplastične folikle, so centrociti (majhni limfociti z zažetimi jedri), med katerimi najdemo centroblaste (velike celice z okroglimi jedri in jasno vidnimi številnimi nukleoli, ki ležijo na robu jedra ob jedrni membrani). Njihov delež se razlikuje od primera do primera in vpliva na klinični potek bolezni (Jaffe in sod., 2011).

FL ima indolenten klinični potek z medianim preživetjem med 8 in 10 let. Zaradi odsotnosti B-simptomov (hujšanje, nočno potenje in nepojasnjena vročina) bolezen odkrijemo pozno, zato je ob diagnozi običajno že močno razširjena (stadij III ali IV). Bolezen lahko zajame bezgavke na različnih mestih in se razširi na ekстранodalne organe (kostni mozeg, tudi vranico in gastrointestinalen trakt ter Waldeyerjev obroč v žrelu, v redkih primerih tudi kožo) (Jaffe in sod., 2011).

Ob začetku zdravljenja je odgovor na to dober, vendar bolezen sčasoma postane neozdrivna na zdravljenje. Sledijo številne ponovitve bolezni in sčasoma smrt. V večini primerov je vzrok smrti transformacija v agresivnejše oblike limfomov B ali k FL pridružene bolezni (Sun, 2008).

2.2.4 Diagnostika

FL običajno diagnosticiramo ali postavimo sum na limfom z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo (ABTI) povečanih bezgavk. Za dokončno potrditev diagnoze pa je nujna histološka preiskava vključno z imunohistokemičnimi preiskavami v celoti odstranjene bezgavke. Na diagnozo FL nakazuje morfološka mikroskopska slika, pozitivno imunohistokemično barvanje za celične površinske markerje CD19, CD20, CD10 in monoklonski imunoglobulin (Ig), citoplazemska ekspresija proteinov *bcl-2* in *bcl-6* ter translokacija t(14;18). V sklopu diagnostičnega postopka ugotavljamo tudi stopnjo malignosti (gradus) in pa napovedne faktorje, s pomočjo katerih ocenimo izhod bolezni (Freedman, 2014; Jezeršek Novaković, 2011).

Z določitvijo gradusa bolezni ocenimo klinično agresivnost tumorja, ki narašča s številom centroblastov. Splošno uveljavljena metoda za določitev gradusa FL v histologiji je Mann-Berardova metoda, na podlagi katere razlikujemo graduse od 1 do 3. Metoda temelji na mikroskopski določitvi števila centroblastov v 10 neoplastičnih foliklih (Mann in Berard, 1983) v vidnem polju pri 40-kratni povečavi (40-kratna) povečava (hpf). Ker se je izkazalo, da imajo bolniki z gradusoma 1 in 2 podobno prognozo, so v klasifikaciji SZO gradusa 1 in 2 združili. Bolnike s FL na podlagi gradusa tako razdelimo v dve skupini: bolnike z nizkim gradusom z od 0 do 15 centroblastov na hpf in bolnike z visokim gradusom (gradus 3) z več kot 15 centroblasti na hpf (Mann in Berard, 1983; Freedman, 2014). Agresivnost poteka FL lahko ocenimo tudi s pomočjo mednarodnega prognostičnega indeksa za FL (FLIPI), ki vključuje 5 napovednih dejavnikov: starost, stadij bolezni, število bezgavčnih lokacij, serumska koncentracija laktatne dehidrogenaze in koncentracija hemoglobina. Prognostični indeks in gradus bolezni ključno vplivata na izbor zdravljenja (Freedman, 2014; Jezeršek Novaković, 2013).

2.3 ZDRAVLJENJE

V zdravljenju bolnikov s FL in drugimi indolentnimi limfomi ostajata citostatska terapija (kemoterapija) in obsevanje z ionizirajočimi žarki (radioterapija) pomembni metodi zdravljenja, vse bolj pa se uveljavlja biološka tarčna terapija (imunoterapija). Zdravljenje v tem primeru poteka z monoklonskimi protitelesi (mAb), ki so sposobna specifične vezave na membranske receptorje B-limfomskih celic (Novaković in sod., 2009). Eno ključnih mAb je rituksimab (R).

2.3.1 Vloga rituksimaba v zdravljenju FL

Uvedba R v zdravljenje bolnikov z NHL je spremenila dolgoročno prognozo bolnikov s CD20-pozitivnimi limfomi B, predvsem FL. Dodatek tega h kemoterapiji izboljša odgovor na zdravljenje, podaljša trajanje remisij in celokupno preživetje pri bolnikih s FL in drugimi CD20-pozitivnimi limfomi B. Pri bolnikih s FL je R učinkovit bodisi v kombinaciji s citostatiki (imunokemoterapija) ali samostojno (imunoterapija) v prvem zdravljenju ali v zdravljenju ponovitev bolezni (Jezeršek Novaković in Benigar, 2008; Cheson in Leonard, 2008).

Vzdrževalno zdravljenje z R pri indolentnih limfomih še podaljša trajanje remisij, nekatere raziskave so pokazale tudi daljše celokupno preživetje. Vzdrževalno zdravljenje pri agresivnih limfomih verjetno ne prinese dodatnega izboljšanja, če so bolniki že med indukcijskim zdravljenjem prejeli R (Jezeršek Novaković in Benigar, 2008).

2.3.2 Novi pristopi zdravljenja FL

Številne raziskave so usmerjene v odkrivanje novih pristopov zdravljenja FL, kot so zdravljenje z drugimi anti-CD20 monoklonskimi protitelesi (obinotuzimab, ofatumumab) in odkrivanje mAb usmerjenih proti drugim za B-celice specifičnim antigenom, z vakcinami, imunomodulatorji (lenalidomide) in novimi zdravili, kot so zaviralci tirozin kinaze, proteasomski zaviralci (bortezomib) (Freedman, 2014; Hiddemann in Cheson, 2014).

2.3.3 Smernice zdravljenja

Po opravljenih preiskavah bolnika zdravimo glede na razširjenost bolezni (klinični stadij), prognostični indeks FLIPI in bolnikovo splošno stanje. Pristop k zdravljenju je odvisen od ugotovljene stopnje malignosti limfoma (Novaković in sod., 2009).

Sheme zdravljenja NHL:

- ◆ ACVBP: doksorubicin, ciklofosfamid, vinkristin, bleomicin, kortikosteroid;
- ◆ BEAM: karmustin, etopozid, citarabin, melfalan;
- ◆ CBV: ciklofosfamid, karmustin, etopozid;
- ◆ CBVPP: ciklofosfamid, karmustin, etopozid, prokarbazin, kortikosteroid;
- ◆ COP: ciklofosfamid, vinkristin, kortikosteroid;
- ◆ CHOP: ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, kortikosteroid;
- ◆ DHAP: citarabin, cisplatin, kortikosteroid;
- ◆ FC: fludarabin, ciklofosfamid;
- ◆ VIM: etopozid, ifosfamid, metotreksat (DeVita in sod., 2009).

2.3.3.1 Prvo zdravljenje

- FL nizke stopnje malignosti (gradusa 1 in 2)

Manj kot 10 % bolnikov s FL ima bolezenski stadij ob diagnozi I ali II. Take bolnike zdravimo z operativno odstranitvijo prizadetih bezgavk in/ali obsevanjem. Pri veliki večini bolnikov je ob diagnozi bolezen razširjena (stadij III/IV). Pri teh bolnikih se je na osnovi izkušenj iz preteklosti izkazalo, da agresiven pristop k zdravljenju ne vpliva na bolnikovo preživetje oziroma ga lahko poslabša. Zato takšnega bolnika le klinično spremljamo in ga ne zdravimo, vse dokler je bolezen stabilna (Freedman, 2014; Jezeršek Novaković, 2011). Če bolezen napreduje, začnemo z zdravljenjem, ko ta bolniku začne povzročati težave

(nenadna nagla rast bezgavk, pojav splošnih simptomov, pojav anemije, trombocitopenije itd.). Izbor zdravljenja je odvisen predvsem od bolnikovega splošnega stanja.

Bolnike s stadijem III/IV v dobri splošni kondiciji ter brez spremljajočih bolezni zdravimo z imunokemoterapijo po shemi R-CHOP. Tej sledi v primeru delnega ali popolnega odgovora vzdrževalno zdravljenje z R. S tem začnemo 8 do 12 tednov po zadnjem ciklu R-CHOP. Bolniki tega prejmejo vsakih 8 tednov do skupno 2 let ali do napredovanja bolezni. Če je dosežena popolna remisija, bolnika spremljamo.

Bolnike s stadijem III/IV, ki so v slabši splošni kondiciji ali starejši od 60 let, zdravimo z manj agresivno imunokemoterapijo (R-COP, R-klorambucil), v primeru agresivnega poteka ali nezadostnega odgovora pa po shemi R-CHOP. Imunokemoterapiji sledi vzdrževalno zdravljenje z R. Simptomatske bolnike z majhnim bremenom bolezni lahko zdravimo z R v monoterapiji (4 cikli). Pričakovan je slabši odgovor na zdravljenje in krajše trajanje remisije. V primeru vsaj delnega odgovora sledi vzdrževalno zdravljenje z R (Hiddemann in Cheson, 2014; Jezeršek Novaković, 2011).

- FL visoke stopnje malignosti (gradusa 3a in 3b)

Bolnike s stadijema I in II zdravimo z od 3 do 8 cikli R-CHOP (odvisno od velikosti tumorske mase), bolnike s stadijem III/IV pa z 8 cikli. Po končani imunokemoterapiji prizadeto regijo obsevamo.

Pri bolnikih, mlajših od 60 let z visokim prognostičnim indeksom, se lahko odločimo za agresivnejšo obliko imunokemoterapije (npr. R-ACVBP). Bolnike z visokim tveganjem pa zdravimo z intratekalno kemoterapijo.

V primeru kombiniranega agresivnega in indolentnega CD20-pozitivnega limfoma po doseženi popolni remisiji agresivnega limfoma sledi vzdrževalno zdravljenje z R kot velja za FL nizke stopnje malignosti (Hiddemann in Cheson, 2014; Jezeršek Novaković, 2011).

2.3.3.2 Zdravljenje ponovitve bolezni

Verjetnost ponovitve bolezni je največja v prvih dveh letih po zaključenem zdravljenju. Bolnika s ponovitvijo limfoma obravnavamo z enakimi diagnostičnimi metodami kot pri primarni diagnostiki. Izbor sheme zdravljenja je odvisen od dosedanjega zdravljenja, obsega in lokalizacije ponovitve ter bolnikovega splošnega stanja (Jezeršek Novaković, 2011). Po doseženem popolnem ali delnem odgovoru s konvencionalno imunokemoterapijo pride v poštev visokodozna terapija z različnimi kombinacijami kemoterapevtikov in v posebnih primerih presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC),

lahko tudi imunokemoterapija ali radioimunoterapija (Freedman, 2014; Jezeršek Novaković, 2011).

Bolnike s ponovitvijo limfoma več kot 3 leta po prvem zdravljenju obravnavamo kot bolnike z novoodkritimi limfomi (Jezeršek Novaković, 2011).

- FL nizke stopnje malignosti (gradusa 1 in 2)

Bolnike v dobri splošni kondiciji ter brez spremljajočih bolezni zdravimo z imunokemoterapijo po shemi R-CHOP do izpolnjene doze antraciklinov, nato z R-FC in visokodozno terapijo, ki ji sledi PKMC. Zbiranje PKMC opravimo že pred uvedbo R-FC, če je infiltracija kostnega mozga manj kot 20-odstotna.

Bolnike, ki so v slabši splošni kondiciji ali starejši od 60 let, zdravimo po shemi R-CHOP do izpolnjene doze antraciklinov (ali z drugo kombinacijo imunokemoterapije), ki ji sledi vzdrževalno zdravljenje z R, če tega še niso prejeli. V sklopu vzdrževalnega zdravljenja bolniki prejema R v 12-tedenskih razmikih do skupno 2 let ali do progressa bolezni. Pri bolnikih, ki so že prejeli imunokemoterapijo v enem od predhodnih zdravljenj in pri katerih se je bolezen ponovila, se odločimo za izbor kemoterapije na podlagi dosedanjih zdravljenj. Če je dosežena dobra delna ali popolna remisija, sledi vzdrževalno zdravljenje z R.

V primeru druge ponovitve bolezni bolnika zdravimo z imunoradioterapijo (zevalin). V primeru progressa med zdravljenjem ali v 6 mesecih po zdravljenju z R ali kombinacijo R-kemoterapija, zdravimo s kemoterapevtikom bendamustin (Hiddemann in Cheson, 2014; Jezeršek Novaković, 2011).

- FL visoke stopnje malignosti (gradus 3a in 3b)

Bolnike zdravimo z imunokemoterapijo po shemi R-CHOP (če bolnik v sklopu prvega zdravljenja ni prejel R) ali drugimi shemami (R-VIM, R-CBVPP, DHAP), odvisno od predhodnega zdravljenja. Po doseženem popolnem ali delnem odgovoru sledi visokodozna kemoterapija (kondicioniranje z BEAM ali CBV) (Hiddemann in Cheson, 2014; Jezeršek Novaković, 2011).

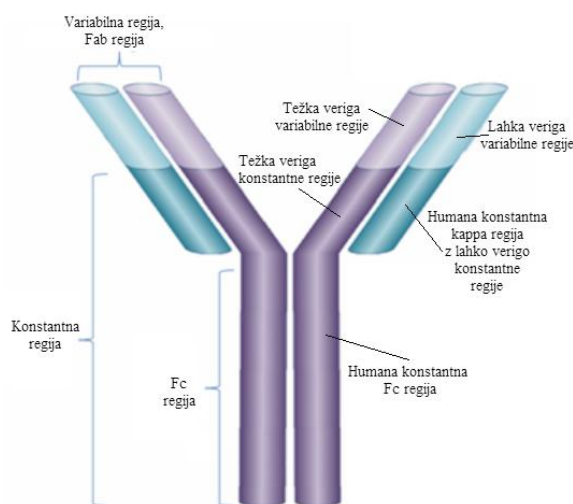
2.4 BIOLOŠKA ZDRAVILA

Biološka zdravila so zdravila, katerih učinkovina je biološka snov ali snov, pridobljena s postopkom, ki vključuje biološke sisteme (Dragoš in sod., 2013). Razdelimo jih lahko na biološka zdravila pridobljena z izolacijo, biološka zdravila pridobljena s sintezo, genska zdravila, monoklonska protitelesa proizvedena s hibridomsko tehnologijo, in rekombinantna biološka zdravila. Rekombinantna biološka zdravila, kot so npr. rekombinantna monoklonska protitelesa, eritropoetin, rastni hormon, inzulin in cepiva,

predstavljajo največjo skupino sodobnih bioloških zdravil (Štrukelj, 2007). Pokrivajo zelo širok spekter možnosti uporabe pri zdravljenju različnih bolezni (neoplazme, presnovne bolezni, avtoimunske bolezni, kronične vnetne bolezni itd.). Najpogosteje se uporabljajo za zdravljenje bolezni po predhodni standardni terapiji, ki je bila neuspešna. Čedalje več se uporabljajo za zdravljenje in upočasnitev napredovanja malignih neoplazem. Trenutno obstaja več kot 20 bioloških zdravil, ki neposredno zmanjšujejo napredovanje malignih neoplazem oziroma pomagajo drugim načinom zdravljenja pri njihovem premagovanju (Dragoš in sod., 2013). Med te uvrščamo tudi R.

2.4.1 Rituksimab

R je himerno mAb, ki se veže na površinski antigen CD20. Sestavljajo ga humana gama teška in kapa lahka veriga konstantne regije (Fc) ter mišja lahka in teška veriga variabilne regije (Fab) (Slika 1). R je bilo prvo mAb, uvedeno v klinično prakso. Uporablja se samostojno ali v kombinaciji s kemoterapijo za zdravljenje limfomov B ter nekaterih drugih bolezni, kot so npr. avtoimunske bolezni in revmatoidni artritis (Smith, 2003). Himerna struktura protitelesa zmanjšuje imunogenost, kar omogoča večkratno zdravljenje (Jezeršek Novaković in sod., 2007).

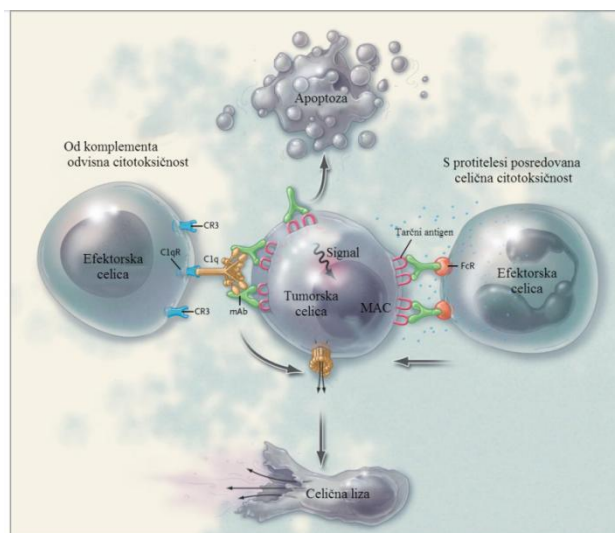


Slika 1: Zgradba rituksimaba

2.4.1.1 Mehanizem delovanja

Monoklonska protitelesa, ki jih uporabljamo v zdravljenju raka, delujejo protitumorsko prek različnih mehanizmov, ki pa še niso v celoti pojasnjeni. Najpogosteje opisani

mehanizmi delovanja so s protitelesi posredovana celična citotoksičnost (ADCC), od komplemента odvisna celična citotoksičnost (CDC) in neposredna indukcija apoptoze (Slika 2) (Adams in Weiner, 2005; Cheson in Leonard, 2008).



Slika 2: Mehanizem delovanja monoklonskih protiteles (Cheson and Leonard, 2008: 615)

R se specifično in z visoko afiniteto veže na površinski antigen CD20, transmembranski protein, ki je izražen tako na običajnih kot na malignih limfocitih B.

Najpomembnejši mehanizem delovanja R je najverjetneje ADCC, pri kateri je celična smrt posredovana prek efektorske celice. Protitelo se veže z variabilnim delom Fab na antigen CD20 na površini limfatične celice. Temu sledi vezava konstantnega dela Fc na receptorje FcR na efektorskih celicah, kot so makrofagi, celice ubijalke (NK) in nevtrofilci. Vezava sproži zaporedje signalnih poti, ki vodijo v sproščanje inflamatornih in citotoksičnih modulatorjev (npr. citokini, kemokini, proteaze), prostih kisikovih radikalov, kar vodi v lizo tarčne celice (Maloney in sod., 2002; Smith, 2003; Adams in Weiner, 2005).

Pomen efektorskega mehanizma CDC v protitumorskem delovanju ni popolnoma jasen. Medtem ko študije *in vitro* potrjujejo pomembnost CDC, te ugotovitve niso soodvisne z rezultati kliničnih študij. CDC sproži vezava R z delom Fc na serumski protein C1q in s tem aktivira klasično pot komplemента. Posledica aktivacije je nalaganje molekul C3b na površini celic ter tvorba kompleksa MAC, ki povzroči pore v celični membrani in celično lizo. C3b molekule na površini tarčnih celic delujejo kot tarče za fagocitozo (Bonavida, 2014; Smith, 2003).

Tretji mehanizem delovanja R predstavlja indukcija apoptoze. Izmed vseh mehanizmov je ta najmanj raziskan. Indukcija apoptoze z R je domnevno posledica aktivacije kaspaz (kaspaze-9 in kaspaze-3). Vendarle nekateri poročajo o od kaspaz neodvisni apoptozi.

Druga opisana pot je apoptoza, posredovana prek proteinov iz družine bcl-2, ki vključuje pro- in antiapoptotične proteine (Rezvani in Maloney 2014, Smith, 2003).

2.4.1.2 Rezistenca na rituksimab

Rezistenca na R predstavlja aktualni problem v zdravljenju limfomov B. Definirana je kot pomanjkanje odgovora na terapije, ki vsebujejo R, oziroma kot napredovanje bolezni 6 mesecev po začetku zdravljenja. Med bolniki z indolentnimi limfomi B je polovica takih, ki na začetno zdravljenje s terapijami, ki vsebujejo R, ne odzovejo. Rezistenca se pogosto razvije tudi med nadaljnjim zdravljenjem. Le 40 % bolnikov, ki so se predhodno odzvali na samostojno ali kombinirano terapijo z R, se ponovno odzove na zdravljenje z R. Pri bolnikih, ki se odzovejo, je čas remisije daljši (Bonavida, 2007; Rezvani in Maloney, 2011). Stopnja rezistence je odvisna od več faktorjev. V klinični praksi se je pokazalo, da je učinek R odvisen od števila prejetih kemoterapij. Bolniki, ki so prejeli veliko število terapij ali so refraktorni na kemoterapijo, se namreč odzovejo slabše v primerjavi z bolniki z manjšim številom prejetih terapij (Maloney in sod., 2002).

Mehanizmov rezistence na R je več in so v splošnem slabo raziskani. Rezistenca se domnevno razvije zaradi sprememb v celični signalizaciji opisanih mehanizmov delovanja R (ACCD, CDC, neposredna indukcija apoptoze), imunoloških dejavnikov, kot so polimorfizmi v receptorski molekuli Fc (Rezvani in Moloney, 2011). Številne raziskave predlagajo kot pomemben mehanizem razvoja rezistence na R, modulacijo izraženosti antigena CD20 in tvorjenje imunskih kompleksov cirkulirajočih CD20 (cCD20) z R (Beum in sod., 2006; Bonavida, 2007; Pedersen in sod., 2011). Splošnejši mehanizmi razvoja rezistence vključujejo spremembe v farmakokinetiki R, ki nakazujejo pomen doze in časa doziranja z R. Koncentracije R v serumu so namreč višje pri bolnikih, ki so se odzvali na zdravljenje, v primerjavi z bolniki, ki se na zdravljenje niso odzvali (Maloney in sod., 2002; Rezvani in Maloney, 2011).

Predlagani so bili nekateri novi terapevtski pristopi, s katerimi bi potencialno lahko zaobšli rezistenco na R. Ti pristopi vključujejo kombinacijo terapije farmakoloških inhibitorjev ali proteasomskih inhibitorjev s citotoksičnimi zdravili ali R (Bonavida, 2007). Raziskave so usmerjene predvsem v načine povečanja izraženosti CD20 (uporaba histondeacetilaznih inhibitorjev), povečanje občutljivosti tumorskih celic na z R inducirano apoptozo prek modulacije intracelularne signalne transdukcije (uporaba proteasomskih inhibitorjev in histondeacetilaznih inhibitorjev), povečanje učinka mehanizma ADCC (uporaba citokinov, agonistov TLR-9) (Rezvani in Maloney, 2011).

V razvoju so laboratorijski testi, s katerimi naj bi bolje napovedali odziv bolnika na zdravljenje z R (ugotavljanje mutacij ali polimorfizmov v receptorski molekuli FcR, metode za kvantitativno ocenitev izražanja gena za npr. antigen CD20) (Cheson in Leonard

2008). S prepoznavanjem bolnikov, odpornih na R, bi se lahko izognili številnim nepotrebnim zdravljenjem in zmanjšali stroške zdravljenja (Rezvani in Maloney, 2011).

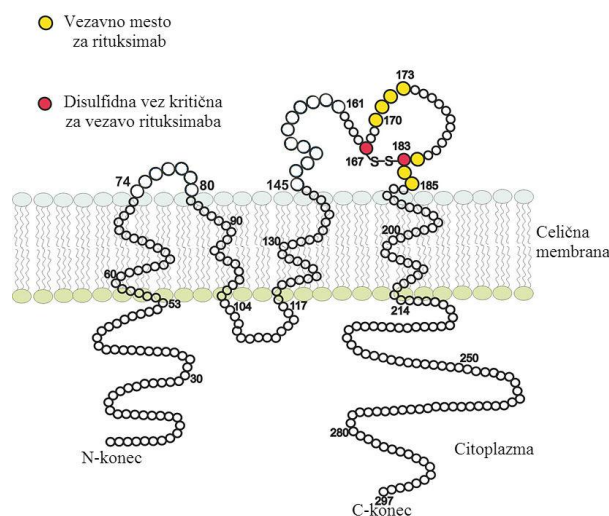
2.5 POVRŠINSKI ANTIGENI, POMEMBNI ZA ZDRAVLJENJE Z BIOLOŠKIMI ZDRAVILI

Površinski antigeni so membranski proteini, ki se določijo s preureditvijo genov med diferenciacijo limfocitov. Ti se razlikujejo med posameznimi tipi limfocitov in njihovimi razvojnimi stopnjami. Pomembno vlogo imajo v procesu zorenja in imunskem odgovoru. Antigene CD pogosto uporabljamo v diagnostiki bolezni in v zdravljenju teh, kjer predstavljajo tarče za biološka zdravila. Za zdravljenje z biološkimi zdravili so pomembni tisti antigeni CD, ki so izraženi le na malignih celicah ali na določenem tipu celice oziroma razvojni stopnji. Na ta način je specifičnost delovanja večja in stranski učinki zdravljenja manjši. Ena najpogosteje uporabljenih tarč v zdravljenju NHL je površinski antigen CD20 (Zola, 2001).

2.5.1 Površinski antigen CD20

Površinski antigen CD20 predstavlja dokaj idealno tarčo za imunoterapijo, saj je izražen na vseh limfocitih B (običajnih in malignih), ne pa na njihovih predstopnjah (hematogonijih), plazmatkah in drugih celičnih tipih (Du in sod., 2007). Raziskave kažejo, da je CD20 prisoten v plazmi kot cirkulirajoči protein, kar domnevno prispeva k rezistenci na R (Beum in sod., 2006; Pedersen in sod., 2011).

Antigen CD20 je 33–37 kDa velik transmembranski fosfoprotein, sestavljen iz štirih membranskih domen. V citoplazmo segata C- in N-konec, ekstracelularni del antigena pa predstavljata velika in domnevno tudi majhna zanka. Za vezavo R je pomembna velika zanka, sestavljena iz približno 44 aminokislin. Disulfidna vez med Cys¹⁶⁷ in Cys¹⁸³ ima kritično vlogo pri prepoznavanju in vezavi R na antigen (Slika 3) (Cragg in sod., 2005; Du in sod., 2007).



Slika 3: Zgradba površinskega antigena CD20 (Winiarska in drugi, 2011: 278)

Vloga površinskega antigena CD20 ni natančno znana. Domnevno deluje kot kalcijev kanalček in je vpleten v številne celične signalne poti, kot so nadzor proliferacije, aktivacije in diferenciacije limfatičnih celic, ter v sprožanje apoptoze (Du in sod., 2007; Jezeršek Novaković in sod., 2007).

2.5.2 Spremembe v izražnosti površinskega antigena CD20

Zmanjšana ekspresija, izguba ekspresije ali modulacija antigena CD20 je eden izmed opisanih mehanizmov rezistence R. Do nedavnega so na ta mehanizem rezistence nakazovale le redke klinične študije, ki so poročale o slabši odzivnosti ali neodzivnosti bolnikov z zmanjšano stopnjo izraženosti CD20 ob ponovnem zdravljenju z R. Pojav popolne izgube izraženosti CD20 je sicer nizka. Do te domnevno pride zaradi epigenetskih sprememb v genu za CD20 (delecije C-konca molekule CD20) in tvorbe imunskih kompleksov CD20 z R. Te komplekse lahko iz celične membrane odstranijo monociti prek receptorske poti Fc, kar povzroči zmanjšano izraženost CD20 in rezistenco na R (Rezvani in sod., 2011; Pedersen in sod., 2011).

Na izražanje antigena CD20 domnevno vplivajo tudi nekateri klinično patološki dejavniki, kot so histološki tip limfoma (npr. pri KLL je CD20 manj izražen v primerjavi s FL), razširjenost bolezni, število terapij in način zdravljenja – tako imunoterapija, kemoterapija kot tudi radioterapija lahko povzročijo spremembe v genu za CD20 in s tem spremembe v izražanju antigena CD20 (Olejniczak in sod., 2006; Terui in sod., 2009).

2.5.3 Merjenje izražanja površinskih antigenov oziroma CD20

Odgovor na zdravljenje z mAb je najverjetneje povezan s stopnjo izraženosti površinskih antigenov. Merjenje njihove izraženosti je zato bistvenega pomena tako za diagnostiko limfoma in kot v zdravljenju. V patologiji se za identifikacijo in merjenje izraženosti antigenov uporabljata imunohistokemična metoda in pretočna citometrija. Prednost pretočne citometrije pred imunohistokemično metodo je, da je ta kvantitativna, zelo natančna in občutljivejša (Johnson in sod., 2009). S kvantitativno imunofenotipizacijo merimo fluorescenčni signal, ki ga oddajajo s fluorokromi označena mAb, vezana na celice v vzorcu. Rezultat meritve predstavlja število izsevanih fotonov. S pomočjo kalibracijske premice, ki jo dobimo z meritvijo standardov z znanim številom vezanega fluorokroma, določimo relativno število antigena na preučevanem celičnem vzorcu, ki ga izrazimo z enoto MESF, *angl.* «Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome» (Horvat, 2011; Kloboves-Prevodnik, 2010).

2.6 NAMEN DELA

Namen naloge je bil raziskati spremembe v izražanju površinskega antigena CD20 pri bolnikih s FL. Predpostavljamo, da je to povezano z nekaterimi kliničnimi in patološkimi značilnostmi, kot so starost, gradus, stadij bolezni, ponovitev bolezni in izbor prvega zdravljenja (prva hipoteza). Domnevamo tudi, da je uspešnost zdravljenja z R odvisna od intenzitete izraženosti antigena CD20 na limfomskih celicah (druga hipoteza). V ta namen smo želeli določiti mejno vrednost izraženosti CD20, pri kateri lahko pričakujemo, da bo zdravljenje z R še učinkovito. S tem smo želeli oceniti odstotek bolnikov, pri katerih je izražanje antigena CD20 premajhno, da bi bilo zdravljenje z R učinkovito. Predpostavljali smo tudi, da se stopnja izraženosti površinskega antigena CD20 na limfomskih celicah spreminja v odvisnosti od časa in izbora zdravljenja (tretja hipoteza). Slednje smo preverjali pri bolnikih z večkratno ponovitvijo bolezni.

Pričakujemo, da bomo z izsledki naloge pripomogli k razjasnitvi sprememb v izražanju površinskega antigena CD20 pri bolnikih s FL in njegovega pomena za uspešnost zdravljenja z biološkim zdravilom R.

3 ZASNOVA RAZISKAVE IN METODE

3.1 BOLNIKI

V prvi del raziskave smo vključili bolnike, ki so v obdobju od 2005 do 2011 zboleli zaradi FL, se zdravili na Onkološkem inštitut Ljubljana (OIL) in imeli pred začetkom zdravljenja opravljeno citopatološko preiskavo in imunofenotipizacijo s pretočnim citotrom (IFC). Podatke o bolnikih, ki so zboleli zaradi FL in se zdravili na OIL, smo pridobili iz Registra raka Republike Slovenije, podatke o rezultatih IFC pa iz arhiva Oddelka za citopatologijo OIL. Načrtovali smo, da bomo v nalogo vključili vsaj 60 bolnikov s FL, in sicer 30 bolnikov, pri katerih se FL po zaključku prvega zdravljenja ni ponovil (skupina 1), in 30 bolnikov, pri katerih se je FL po zaključku prvega zdravljenja ponovil (skupina 2).

V drugi del raziskave smo vključili 12 bolnikov s FL, pri katerih je bila narejena citopatološka preiskava z IFC več kot trikrat. Te bolnike smo poiskali s pomočjo baze podatkov Registra raka Republike Slovenije in baze podatkov Oddelka za citopatologijo OIL. Šest od skupno 12 bolnikov pred začetkom zdravljenja ni imelo narejene citopatološke preiskave z IFC.

Za vse bolnike smo iz elektronskih popisov bolezni na OIL pridobili tudi podatke o poteku bolezni.

3.2 CITOPATOLOŠKA PREISKAVA

Citopatološka preiskava je bila narejena pri vseh bolnikih, vključenih v nalogo, zaradi razjasnitve kilničnega suma na limfom. Vzorce za preiskavo smo pridobili z ABTI povečanih bezgavk. Iz vsakega vzorca smo pripravili dva preparata za mikroskopski pregled in suspenzijo celic za IFC.

En preparat smo posušili na zraku in pobarvali po Giemsi, drug preparat smo fiksirali v Delaunayevem fiksativu in pobarvali po Papanicolaouju. Iz preostanka vzorca smo pripravili suspenzijo celic za IFC, tako da smo preostanek celic sprali iz brizge in igle s celičnim medijem (4,5-% bovini serumski albumini, 0,45-% EDTA v raztopini fosfatnega pufra s 50 IE/ml penicilina).

3.3 IMUNOFENOTIPIZACIJA S PRETOČNIM CITOMETROM

Vzorci za IFC smo obravnavali po standardnem postopku. Najprej smo določili absolutno število celic v suspenziji, nato smo napravili orientacijski mikroskopski pregled celičnega razmaza in se na podlagi tega odločili, ali bomo napravili IFC in katero kombinacijo protiteles (panel protiteles) bomo uporabili.

3.3.1 Štetje celic

V epruveti smo 10 µl vzorca dodali 190 µl Türkove raztopine in premešali, nato smo 10 µl vzorca prenesli v Neubauerjevo komoro »improved bright-line«. Z mikroskopom smo prešteli celice v kotnih poljih. Absolutno število celic v vzorcu smo izračunali po formuli:

$$N = n \times R \times V \times FK \quad \dots(1)$$

N – število celic v vzorcu

n – povprečno število celic v kvadratu

R – faktor redčenja (20)

V – volumen vzorca

FK – faktor komore (10^4)

3.3.2 Postavitev delovne diagnoze limfoma in izbor protiteles

Delovno diagnozo limfoma smo postavili na podlagi orientacijskega mikroskopskega pregleda. V primeru suma na limfom B smo uporabili osnovni panel protiteles (Preglednica 1). Protitelesa, ki smo jih uporabili, so bila konjugirana s fluorescein izotiocianatom (FITC), fikoeritriinom (PE), peridinin klorofil proteinom (PerCP), peridinin klorofil proteinom Cy5,5 in alofikocianinom (APC). Vsa protitelesa, ki smo jih uporabljali, je proizvedlo podjetje BD Biosciences.

Preglednica 1: Osnovni panel protiteles

Epruveta	FITC		PE		PerCP/PerCP-Cy5.5		APC	
	mAbs	vol (µl)	mAbs	vol (µl)	mAbs	vol (µl)	mAbs	vol (µl)
1	CD3*	5	CD19*	5	CD45*	5	CD20	3
2	γ1-FITC	5	γ 1-PE	5	CD19	5	γ 1-APC	3
3	Kappa*	5	Lambda*	5	CD19*	5	CD10	3
4	FMC7*	5	CD23*	5	CD19*	5	CD5	3

* BD Oncomark Reagents; mAbs – monoklonsko protitelo; FITC – fluorescein izotiocianat; PE – fikoeritriin; PerCP – peridinin klorofil protein; PerCP-Cy5.5 – peridinin klorofil protein Cy5.5, APC – alofikocianin

3.3.3 Priprava vzorcev za meritev s pretočnim citometrom

Vzorci smo prefiltrirali skozi filter s premerom por 50 μm in pripravili štiri epruvete. V vsako epruveto smo dodali preračunan volumen celičnega vzorca, da je bilo končno število celic v epruveti 200 000. Dodali smo 1,5 ml pufru (Cell Wash, BD Biosciences) in vzorce 5 minut centrifugirali pri sobni temperaturi s hitrostjo 1500 obratov/minuto. Supernatant smo odlili in v vsako epruveto dodali ustrezen volumen (3 oziroma 5 μl) protiteles, kot je prikazano v Preglednici 1. Vzorce smo inkubirali 20 minut v temi. Nato smo dodali 1,5 ml pufru (Cell Wash, BD Biosciences), premešali na stresalniku, ponovno centrifugirali (5 minut s hitrostjo 1500 obratov/minuto) in zavrgli supernatant. Dodali smo 300 μl pufru (Cell Wash, BD Biosciences) in vzorec izmerili s pretočnim citometrom (Kloboves-Prevodnik in sod., 2004).

3.3.4 Meritev s pretočnim citometrom

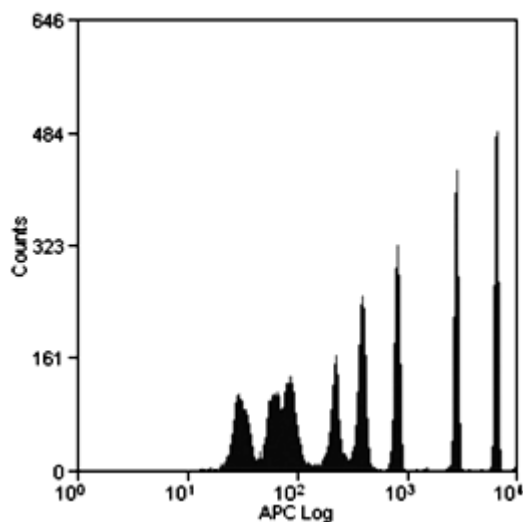
Meritve vzorcev so potekale s šestparametrskim pretočnim citometrom FACSCalibur (BD Biosciences) in osemparametrskim pretočnim citometrom FACS CantoII (BD Biosciences). Stabilnost in linearnost pretočnega citometra smo vsakodnevno preverili s kalibracijskimi kroglicami Calibrate 3 beads (BD Biosciences) in Sphero Rainbow (Spherotech, Illinois v ZDA). Z meritvami vzorcev smo začeli samo, če smo ugotovili, da pretočni citometer deluje optimalno. V posamezni epruveti smo izmerili 20 000 celic, ki so bile CD45- ali CD19-pozitivne. Če 20 000 CD45- ali CD19-pozitivnih celic ni bilo možno izmeriti, ker je bilo takih celic v vzorcu premalo, smo izmerili celoten volumen vzorca.

3.3.5 Analiza rezultatov pretočnocitometričnih meritev

3.3.5.1 Analiza rezultatov meritev kalibracijskih kroglic

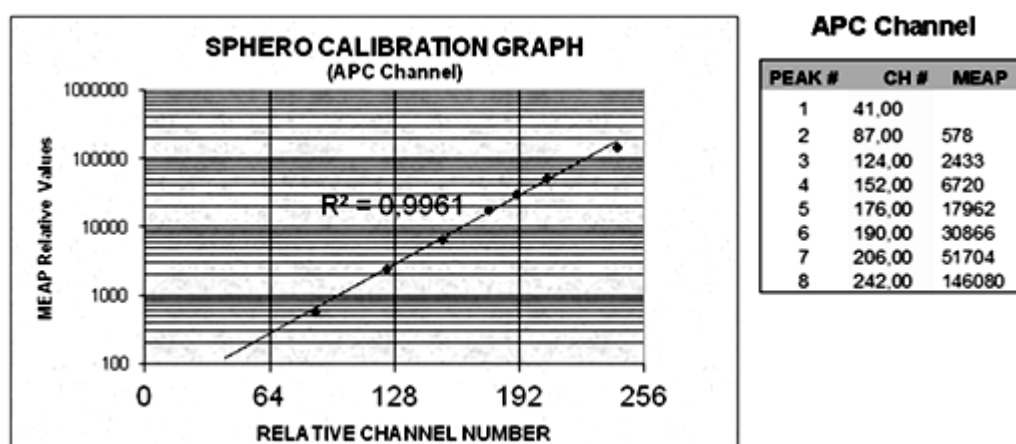
Kalibracijske kroglice Sphero Rainbow uporabljamo za preverjanje linearnosti pretočnega citometra. Kalibracijske kroglice vsebujejo različno količino fluorokroma, ki je znana za vsako kroglico. Z njimi redno preverjamo linearnost pretočnega citometra od leta 2001.

Rezultat analize meritev kalibracijskih kroglic je histogram, ki prikazuje rezultat meritev fluorescence, ki jo oddajajo kroglice, označene z znano količino fluorokroma (Slika 4).



Slika 4: Rezultati meritev kalibracijskih kroglic Sphero Rainbow, označenih z APC

Količina fluorokroma, vezanega na posamezne kroglice, se linearno povečuje. S histograma odčitamo geometrično sredino izmerjene fluorescence za posamezno kroglico in jo pretvorimo v relativno številko kanala. Na podlagi podatkov o relativni številki kanala in količini vezanega fluorokroma na posamezno kroglico v enotah MESF, narišemo kalibracijski graf, ki pove, ali pretočni citometer deluje linearno. S pomočjo kalibracijskega grafa smo kvantificirali celične antigene, saj količina fluorokroma, konjugiranega s protitelesi, vezanimi na celice v vzorcu, sovpada s količino antigena na celicah (Slika 5). Kvantifikacija celičnih antigenov je zanesljiva, če kvantifikacijske kroglice in vzorec izmerimo isti dan z enakimi nastavitvami. Izbira citometra na rezultat kvantifikacije ne vpliva (Schwartz in sod., 2004).



Slika 5: Kalibracijski graf za APC-kanal, ki nam pove, ali je delovanje pretočnega citometra linearno in ga lahko uporabljamo tudi za kvantifikacijo celičnih antigenov

3.3.5.2 Analiza rezultatov meritev površinskega antigena CD20

Za analizo rezultatov meritev s pretočnim citometrom smo uporabili dva programa: za pretočni citometer FACSCalibur smo uporabili program CellQuest (BD Biosciences), za pretočni citometer FACSCanto II pa FACSDiva Software (BD Biosciences). Z omenjenima programoma smo dobili kvalitativne in kvantitativne podatke o izražanju antigena CD20. Na osnovi dobljenega rezultata smo opredelili, ali je celična populacija pozitivna ali negativna. V primeru pozitivnega rezultata smo videli, ali je celična populacija šibko, srednje ali močno pozitivna. Program nam je podal vrednosti izražanja antigena v obliki geometrične sredine.

3.3.6 Kvantifikacija intenzitete izražanja površinskega antigena CD20

Za vsakega bolnika, ki smo ga vključili v raziskavo, smo poiskali rezultate IFC v arhivu laboratorija za citopatologijo in odčitali geometrično sredino izmerjene fluorescence površinskega antigena CD20. Poiskali smo rezultate meritev z APC označenimi kalibracijskimi kroglicami, ki so bile izmerjene isti dan in z enakimi nastavitvami, kot je bila narejena IPC. Na podlagi rezultatov meritev kalibracijskih kroglic in geometrične sredine površinskega antigena CD20 smo s programom PMT Linearity QC Record (Spherotech, Illinois v ZDA) izračunali intenziteto izraženosti površinskega antigena CD20 v enotah MESF. Za posamezen vzorec smo s programom pretvorili geometrično sredino izraženosti površinskega antigena CD20 v relativno številko kanala na skali pretočnega citometra, nato pa to pretvorili v enote MESF.

3.4 DOLOČANJE KLINIČNEGA STADIJA

Klinični stadij smo določili po mednarodno priznani klasifikaciji Ann Arbor, ki razdeli limfome v štiri stadije glede na prizadetost področij bezgavk in/ali nelimfatičnih organov, prisotnost splošnih simptomov ali velike tumorske mase bolezni (Cheson, 2008b).

Stadij I – prizadeto je eno področje bezgavk ali delno prizadet en nelimfatični organ.
Stadij II – prizadeti sta dve skupini ali več skupin bezgavk na isti strani prepone ali pa je delno prizadet en nelimfatični organ ali tkivo in ena skupina ali več skupin bezgavk na isti strani prepone.

Stadij III – prizadete so bezgavke nad in pod prepono, sočasno je lahko delno prizadet en nelimfatični organ ali tkivo ali vranica, lahko tudi oboje.

Stadij IV – v celoti je prizadet en ali več nelimfatičnih organov, samostojno ali skupaj z bezgavkami.

3.5 OCENA ODGOVORA NA ZDRAVLJENJE

Uspeh zdravljenja smo opredelili po uveljavljenih kriterijih International Working Group Criteria (Cheson, 2008a; Cheson, 2008b; Juweid in sod., 2005), ki opredeljujejo naslednje štiri kategorije:

- Popolni odgovor (PO): odsotnost vseh znakov bolezni.
- Delni odgovor (DO): zmanjšanje merljive bolezni (več kot 50-% zmanjšanje vsote zmnožkov premerov do šest največjih merljivih lezij) in odsotnost novih lezij.
- Stabilna bolezen (SD): bolezen se ni zmanjšala za toliko, da bi zadostila kriterijem za DO ali PO, in se ni povečala za toliko, da bi zadostila kriterijem za PB.
- Napredovanje bolezni (PB): pojav nove lezije ali povečanje bolezni za več kot 50 % obstoječe lezije.

Uspeh zdravljenja smo preučevali pri vseh bolnikih iz prvega dela raziskave ter samo pri bolnikih, ki so bili zdravljeni z R. Učinek zdravljenja z R smo ocenili tako, da smo določili celokupni odgovor na zdravljenje (CO) ter celokupno preživetje. Celokupni odgovor na zdravljenje predstavlja bolnike, ki so dosegli popolni ali delni odgovor. Celokupno preživetje bolnikov pa smo ocenili s časovnim intervalom, ki predstavlja čas od postavitve diagnoze do konca sledenja oziroma smrti. Za bolnike, ki so bili zdravljeni z R, smo določili tudi trajanje odgovora na zdravljenje. Ocenili smo ga s časovnim intervalom, ki predstavlja čas preživetja brez ponovitve bolezni. Pri tem smo upoštevali le bolnike, ki so dosegli celokupni odgovor na zdravljenje.

3.6 DOLOČITEV MEJNE VREDNOSTI IZRAŽANJA POVRŠINSKEGA ANTIGENA CD20

Bolnike, ki smo jih vključili v prvi del raziskave in so bili zdravljeni z R, smo razdelili v skupine glede na izraženost površinskega antigena CD20, ki so bile v razmiku 5000 MESF. Za posamezne skupine bolnikov smo naredili krivulje preživetja in jih statistično primerjali. Mejno vrednost, nad katero ocenjujemo, da zdravljenje z R pomeni boljši odgovor na zdravljenje, smo določili, pri vrednosti MESF, kjer sta se krivulji statistično razlikovali.

3.7 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Podatke smo analizirali s pomočjo računalniških programov Excel (Microsoft, ZDA), Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software Inc., ZDA) in Sigmaplot (Systat Software Inc., V. Britanija). Za prikaz podatkov o kliničnih in patoloških značilnostih bolnikov ter o poteku zdravljenja smo uporabili opisno statistiko, zbrali in prikazali pa smo jih v tabelarični obliki. Rezultate meritev površinskega antigena CD20 smo predstavili grafično in za posamezno skupino bolnikov izračunali srednjo vrednost in mero variabilnosti. Kot mero srednje vrednosti smo uporabili mediano, mero variabilnosti podatkov pa smo ocenili z razponom vrednosti ter kvartilnim razmikom.

Ugotovili smo, da se rezultati meritev izraženosti površinskega antigena CD20 ne razporejajo normalno. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med skupinami (v katere so bili bolniki razdeljeni glede na gradus, stadij, ponovitev bolezni in način začetnega zdravljenja) smo tako uporabili neparametrične teste. Uporabili smo Mann-Whitneyjev U-test (v primeru dveh skupin) in Kruscal-Wallisov H-test (v primeru več kot dveh skupin).

Celokupno preživetje in preživetje brez ponovitve bolezni smo ocenjevali s krivuljami preživetja po metodi Kaplan-Meier. Če se preživetje med skupinami bolnikov statistično značilno razlikuje, pa smo preverjali s testom »log-rank«. Če smo ugotovili, da na preživetje vpliva več kot en dejavnik, smo uporabili Coxov model sorazmernih tveganj.

Statistično razliko v celokupnem odgovoru na zdravljenje z R smo ocenjevali pri skupini bolnikov z nad- in pod-mejno vrednostjo izraženim antigenom CD20 s χ^2 -testom. Povezanost med izraženostjo antigena CD20 in trajanjem odgovora na zdravljenje z R oziroma celokupnim preživetjem pa smo ocenili s Spearmanovim koeficientom korelacije.

4 REZULTATI

Od 142 bolnikov, ki so v obdobju od 2005 do 2011 zboleli zaradi FL in se zdravili na OIL, smo v prvi del naloge lahko vključili le 74 (52,1 %) bolnikov. Vključili smo vse bolnike s ponovitvijo bolezni (21; 14,8 %) in 53 (37,3 %) bolnikov, pri katerih se bolezen ni ponovila. Razlogi, zaradi katerih smo bolnike izključili iz raziskave, so prikazani v Preglednica 2. V drugi del naloge smo vključili 12 bolnikov s FL, pri katerih je bila citološka preiskava z IFC opravljena tri ali večkrat. Pri osmih bolnikih je bila citološka punkcija narejena štirikrat, pri treh petkrat in pri enem bolniku šestkrat.

Preglednica 2: Razlogi izključitve bolnikov iz raziskave

Razlog izključitve	Število in odstotek bolnikov (N, %)
Citopatološka preiskava in IFC pred začetkom prvega zdravljenja nista bili narejeni	24 (35,3)
Meritve kalibracijskih kroglic za preverjanje linearnosti pretočnega citometra v času merjenja vzorca niso bile narejene	34 (50,0)
Pri bolnikih, ki so zboleli v obdobju od 2010 do 2011, se bolezen ni ponovila* ali pa citopatološka preiskava in IFC nista bili narejeni	10 (14,7)
Skupaj	68 (100)

N – število bolnikov, % – odstotek bolnikov, IFC – imunofenotipizacija s pretočnim citometrom,* ker smo v obdobju od 2005 do 2009 našli pre malo bolnikov s ponovitvijo bolezni, ki so izpolnjevali kriterije za vključitev v študijo, smo dodatne bolnike s ponovitvijo bolezni poiskali še v letih 2010 in 2011.

4.1 KLINIČNE IN PATOLOŠKE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV TER NAČIN IN POTEK ZDRAVLJENJA

V skupini bolnikov, vključenih v prvi del raziskave, je bilo 33 (44,6 %) moških in 41 (55,4 %) žensk, s povprečno starostjo ob diagnozi 65,7 let (razpon od 33 do 91 let).

Diagnoza FL je bila pri 66 (89,2 %) bolnikih postavljena s histološko preiskavo, pri 8 (10,8 %) bolnikih pa s citopatološko preiskavo. Pri 65 od 66 bolnikov (98,4 %), pri katerih je bila diagnoza FL postavljena s histološko preiskavo, je bil določen gradus bolezni. Pri 1 (1,5 %) bolniku pa gradusa ni bilo mogoče določiti, ker je bila bezgavka le deloma zajeta z limfomom. Pri večini bolnikov je bil ugotovljen gradus bolezni 1–2 in stadij IV (Preglednica 3: Klinične in patološke značilnosti v raziskavo vključenih bolnikov s folikularnim limfomom). Do ponovitve bolezni je prišlo pri 21 (28,4 %) bolnikih. Pri 5 bolnikih (23,8 %) se je bolezen ponovila večkrat, pri 16 (76,2 %) pa le enkrat.

V drugem delu raziskave je bilo med vključenimi bolniki 7 (58,3 %) moških ter 5 (41,7 %) žensk, s povprečno starostjo ob diagnozi 69,8 let (razpon od 56 do 83 let). Pri večini bolnikov je bil ugotovljen gradus bolezni 1–2 in stadij IV (Preglednica 3: Klinične in patološke značilnosti v raziskavo vključenih bolnikov s folikularnim limfomom). Bolezen se je ponovila pri 10 od 12 (83,3 %) bolnikov. Pri 7 (70,0 %) bolnikih se je bolezen ponovila večkrat, pri 3 (30,0 %) pa le enkrat.

Podatki o kliničnih in patoloških značilnostih za bolnike, ki smo jih vključili v prvi in drugi del naloge, so prikazani v Preglednici 3.

Preglednica 3: Klinične in patološke značilnosti v raziskavo vključenih bolnikov s folikularnim limfomom

Klinične in patološke značilnosti	Bolniki (N, %)	
	1. del naloge	2. del naloge
Spol		
Moški	33 (44,6)	7 (58,3)
Ženski	41 (55,4)	5 (41,7)
Skupaj	74 (100,0)	12 (100,0)
Starost		
Povprečje	65,7	69,8
Razpon	33–91	56–83
Klinične značilnosti		
Gradus		
1–2	42 (56,8)	7 (58,3)
3	24 (32,4)	4 (33,3)
Ni določen	8 (10,8)	1 (8,3)
Skupaj	74 (100,0)	12 (100)
Stadij		
I	16 (21,6)	1 (8,3)
II	11 (14,9)	3 (25,0)
III	17 (23,0)	1 (8,3)
IV	30 (40,5)	7 (58,3)
Skupaj	74 (100,0)	12 (100)
Število ponovitev bolezni		
Brez ponovitve	53 (71,6)	2 (16,7)
S ponovitvijo	21 (28,4)	10 (83,3)
Enkratna ponovitev	16 (21,6)	3 (25,0)
Večkratna ponovitev	5 (6,8)	7 (58,3)
Skupaj	74 (100,0)	12 (100,0)

N – število bolnikov, % – odstotek bolnikov

Podatki o načinu zdravljenja in odgovoru na celokupno zdravljenje za bolnike, ki smo jih vključili v prvi in drugi del naloge, so prikazani v Preglednica 4.

Bolniki, vključeni v prvi del naloge, so bili po večini prvotno zdravljeni z radioterapijo (27; 36,5 %) in imunokemoterapijo (35; 47,3 %). Operativno je bilo zdravljenih 6 (8,1 %) bolnikov, s kemoterapijo pa le 1 (1,3 %) bolnik, medtem ko je bilo 5 (6,8 %) bolnikov na opazovanju. Bolniki, ki so bili zdravljeni operativno, so imeli stadij I; bolniki, ki so bili na opazovanju, so imeli stadij, ki je bil večji od I. Iz Preglednice 4 sta razvidna število in odstotek bolnikov, zdravljenih s posameznimi kombinacijami imunokemoterapije in drugih

terapij. Največ bolnikov je prejelo imunokemoterapijo po shemi R-CHOP (33/35; 94,3 %). Celokupni odgovor na začetno zdravljenje je bil dosežen pri 59 od 74 (79,7 %) bolnikov.

Zdravljenje je pri 27 od 74 (36,5 %) bolnikov potekalo v več linijah. V prvi liniji zdravljenja je rituksimab prejelo 35 od 47 (74,5 %) bolnikov, v naslednjih linijah zdravljenja pa še 12 (25,5 %). Celokupni odgovor na celotno zdravljenje je bil dosežen pri 53 od 74 (71,6 %) bolnikov, bolezen je bila stabilna pri 7 (9,4 %) bolnikih, napredovala pa je pri 12 (16,2 %) bolnikih. Pri skupno 35 bolnikih v prvi liniji, zdravljenih s terapijami, ki so vsebovale rituksimab, je bil celokupni odgovor dosežen pri 32 od 35 (91,4 %) bolnikov. Do ponovitve bolezni je prišlo pri 5 od 35 (14,3 %) bolnikov. Pri bolnikih, zdravljenih z radioterapijo, je bil celokupni odgovor dosežen pri 19 od 27 (70,4 %) bolnikov. Do ponovitve bolezni je prišlo pri 7 (25,9 %) bolnikih. Celokupni odgovor je bil dosežen pri vseh (5; 100 %) bolnikih, zdravljenih operativno; pri bolnikih, zdravljenih s kemoterapijo, in bolnikih na opazovanju pa ta ni bil dosežen pri nobenem od bolnikov.

Preglednica 4: Podatki o načinu in uspehu zdravljenja

Način začetnega zdravljenja	Bolniki (N, %)	
	1. del naloge	2. del naloge
Opazovanje	5 (6,8)	0 (0,0)
Operativno	6 (8,1)	0 (0,0)
RT	27 (36,5)	5 (41,7)
KT (leukeran)	1 (1,3)	1 (8,3)
KT (leukeran) + RT	0 (0,0)	2 (16,7)
Imunokemoterapija (I-KT)	35 (47,3)	4 (33,3)
I-KT	3 (4,0)	2 (16,7)
<i>R-CHOP</i>	2 (2,7)	0 (0,0)
<i>R-COP</i>	1 (1,3)	2 (16,7)
I-KT + RT	1 (1,3)	0 (0,0)
I-KT + vzdrževalno zdravljenje (R)	12 (16,2)	1 (8,3)
I-KT + RT + vzdrževalno zdravljenje (R)	17 (23,0)	1 (8,3)
I-KT + PKMC+ vzdrževalno zdravljenje (R)	2 (2,7)	0 (0,0)
Skupaj	74 (100,0)	12 (100,0)
Število linij zdravljenja		
0	6 (8,1)	0 (0,0)
1	41 (55,4)	0 (0,0)
2	15 (20,3)	1 (8,3)
≥ 3	12 (16,2)	11 (91,7)
Skupaj	74 (100,0)	12 (100,0)
Izhod začetnega zdravljenja		
Popolni odgovor	44 (59,4)	5 (41,7)
Delni odgovor	15 (20,3)	1 (8,3)
Stabilna bolezen	6 (8,1)	0 (0,0)
Progres bolezni	9 (12,2)	6 (50,0)
Skupaj	74 (100,0)	12 (100,0)
Izhod celotnega zdravljenja		
Popolni odgovor	43 (58,1)	1 (8,3)
Delni odgovor	10 (13,5)	0 (0,0)
Stabilna bolezen	7 (9,4)	1 (8,3)
Progres bolezni	12 (16,2)	10 (83,3)
Skupaj	74 (100,0)	12 (100,0)
Transformacija*	2 (8,3)	2 (16,6)
Smrt*	10 (13,5)	8 (66,7)

RT – radioterapija, KT – kemoterapija, I-KT – imunokemoterapija, PKMC – avtologna presaditev krvotvornih matičnih celic, N – število bolnikov, % – odstotek bolnikov, * odstotek bolnikov, ki so imeli

transformacijo folikularnega limfoma ali pa so umrli, je preračunan na vse bolnike, ki so bili vključeni v prvi del naloge, in na vse bolnike, ki so bili vključeni v drugi del naloge.

Bolniki iz drugega dela naloge so bili podobno kot bolniki v prvem delu večinoma zdravljeni z radioterapijo in imunokemoterapijo. Z izjemo enega bolnika je bila izbrana imunokemoterapija po shemi R-COP. Zdravljenje je pri 1 (8,3 %) bolniku potekalo z eno linijo zdravljenja, pri 11 (91,7 %) bolnikih pa v več kot dveh linijah. Popoln odgovor na celotno zdravljenje je bil dosežen le pri 1 (8,3 %) bolniku, prav tako je bila pri 1 (8,3 %) bolniku bolezen stabilna, pri 10 (83,3 %) pa je bolezen napredovala. Osem (66,6 %) bolnikov z napredovano obliko bolezni je umrlo, pri 2 (20,0 %) bolnikih pa je prišlo do transformacije iz FL v DVCLB, eden od teh bolnikov je umrl.

4.1.1 Celokupno preživetje bolnikov, vključenih v prvi del naloge

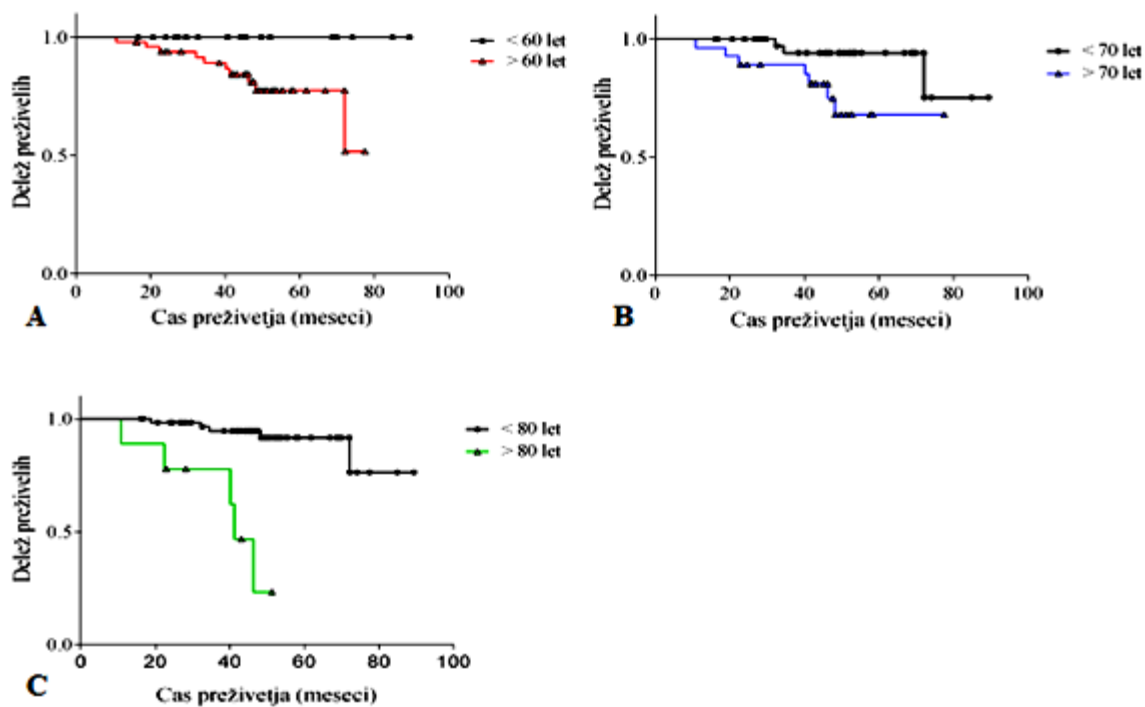
Celokupno preživetje bolnikov, ki smo jih vključili v prvi del naloge, je bilo 86,5–%. Odvisno je bilo le od starosti bolnikov in števila linij zdravljenja.

Bolniki, ki so bili starejši od 60 let, so imeli značilno slabše celokupno preživetje ($p < 0,028$) od mlajših bolnikov (Preglednica 16, Slika 6).

Preglednica 5: Statistično značilne razlike v celokupnem preživetju med skupinami bolnikov z različno starostjo (test krivulj preživetja »log-rank«)

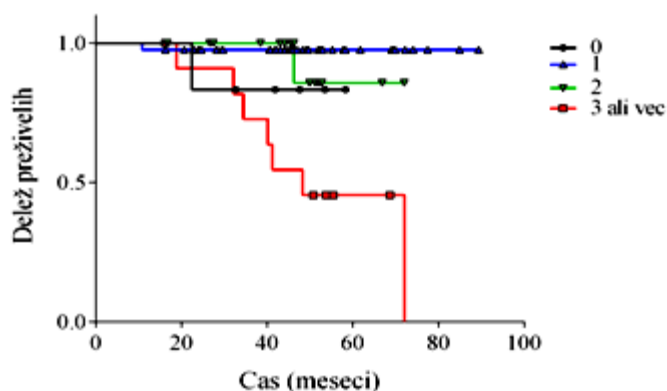
Starost	(vrednost p)	Št. bolnikov v skupini (N)		HR (95-% CI)
		pod	nad	
40 let	$p = 0,555$	3	71	
50 let	$p = 0,364$	7	67	
60 let	$p = 0,028$	24	50	0,0 (0,059–0,838)
70 let	$p = 0,025$	46	28	0,244 (0,062–0,818)
80 let	$p < 0,001$	65	9	0,086 (0,0003–0,0277)

N – število bolnikov, HR – razmerje tveganja, IC – interval zaupanja



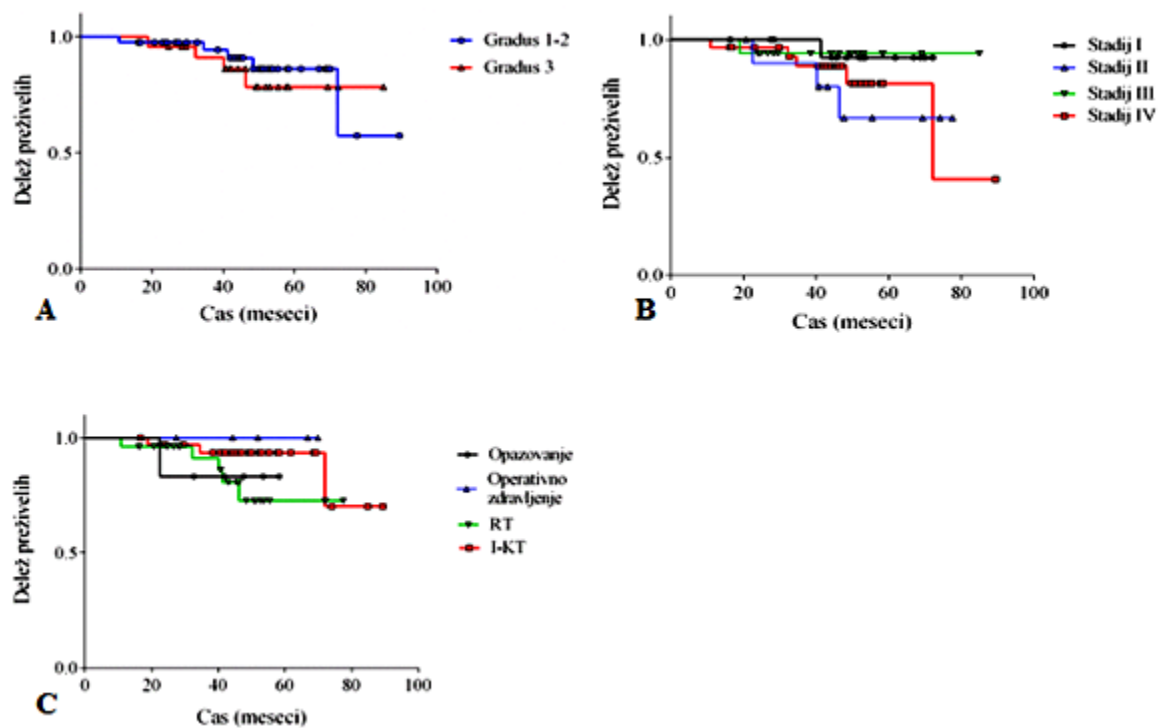
Slika 6: Celokupno preživetje skupin bolnikov s starostmi, pri katerih se krivulji preživetja statistično razlikujeta

Bolniki z eno linijo zdravljenja so imeli statistično boljše celokupno preživetje kot bolniki, ki so bili zdravljeni tri- ali večkrat (HR = 0,040; 95-% CI = 0,004–0,112, $p < 0,0001$). Mediana preživetja je bila dosežena le pri skupini bolnikov s tremi ali več linijami zdravljenja. Ta je znašala 48,3 meseca. Statističnih razlik med ostalimi krivuljami preživetja nismo ugotovili (Slika 7).



Slika 7: Celokupno preživetje bolnikov glede na število linij zdravljenja

Histološki gradus, stadij in način začetnega zdravljenja na preživetje niso vplivali (Slika 8).



Slika 8: Celokupno preživetje v odvisnosti od gradusa bolezni, stadija in načina začetnega zdravljenja

4.2 INTENZITETA IZRAŽENOSTI POVRŠINSKEGA ANTIGENA CD20 V IZHODNIH VZORCIH PRI BOLNIKI S FOLIKULARNIM LIMFOMOM, KI SMO JIH VKLJUČILI V PRVI DEL NALOGE

Mediana izraženosti površinskega antigena CD20 za 74 bolnikov, ki so bili vključeni v prvi del naloge, znaša 65964,5 MESF, razpon vrednosti pa 208–1332582 MESF. Ugotavljali smo, kako je intenziteta izraženosti CD20 v izhodnih vzorcih povezana s starostjo bolnikov, histološkim gradusom, razširjenostjo in ponovitvijo bolezni ter načinom začetnega zdravljenja.

4.2.1 Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s starostjo bolnikov

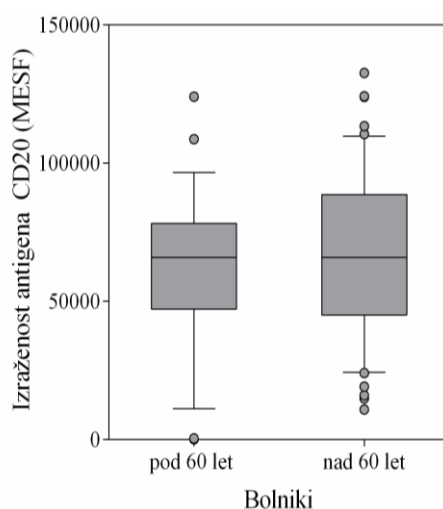
Najvišjo mediano izraženosti površinskega antigena CD20 smo izmerili pri bolnikih, mlajših od 60 let (65964 MESF), kot tudi največji razpon med minimalno in maksimalno izmerjeno vrednostjo izraženosti površinskega antigena CD20 (Preglednica 6).

Preglednica 6: Intenziteta izraženosti površinskega antigena CD20 pri bolnikih, starejših in mlajših od 70 let

Starost	Izražena vrednost površinskega antigena CD20 (MESF)			
	Bolniki (N, %)	Mediana	Razpon	Kvartilni razmik
Pod 60 let	24 (32,4)	65964	208–124048	47872–76785,5
Nad 60 let	50 (67,6)	65886	10864–132582	46104–87627
<i>Vsi bolniki</i>	<i>74 (100)</i>	<i>65964</i>	<i>208–132582</i>	<i>47218–85120</i>

N – število bolnikov, % – odstotek bolnikov

Izražena vrednost površinskega antigena CD20 pri bolnikih, starejših in mlajših od 60 let, se ni statistično razlikovala ($p = 0,462$) (Slika 9).



Slika 9: Izraženost površinskega antigena CD20 pri bolnikih, starejših in mlajših od 60 let

4.2.2 Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s histološkim gradusom bolezni

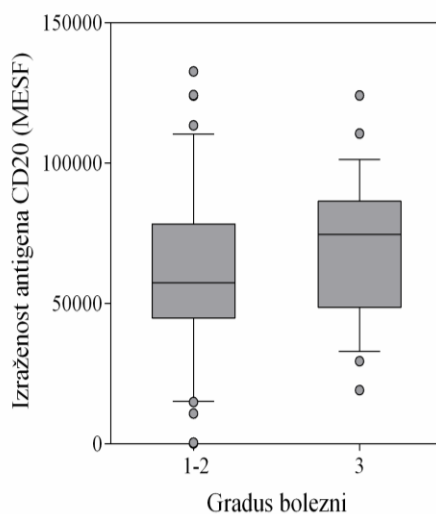
Mediana izraženosti površinskega antigena CD20 je bila v skupini bolnikov z gradusom 3 (74569 MESF) večja kot v skupini bolnikov z gradusom 1–2 (57343 MESF). Največji razpon med minimalno in maksimalno izmerjeno vrednostjo je bil v skupini bolnikov z gradusom 1–2, znotraj katere sta posameznika z največjo in najmanjšo vrednostjo (Preglednica 7).

Preglednica 7: Intenziteta izraženosti površinskega antigena CD20 v odvisnosti od gradusa folikularnega limfoma

Gradus	Izraženost površinskega antigena CD20 (MESF)			
	Bolniki (N, %)	Mediana	Razpon	Kvartilni razmik
1–2	42 (56,8)	57343	208–132582	45575–76741
3	24 (32,4)	74569	19193–124048	55471–86397
Ni določen	8 (10,8)	6977	22017–108668	55888–87841
<i>Vsi bolniki</i>	<i>74 (100)</i>	<i>65964</i>	<i>208–132582</i>	<i>47218–85120</i>

N – število bolnikov, % – odstotek bolnikov

Porazdelitev izraženosti površinskega antigena CD20 glede na bolezenski gradus prikazuje Slika 10. Razlika v intenziteti izraženosti antigena med skupinama ni statistično značilna ($p = 0,177$).



Slika 10: Izražanost površinskega antigena CD20 v odvisnosti od gradusa bolezni

4.2.3 Povezanost intenzitete izražnosti površinskega antigena CD20 z razširjenostjo bolezni

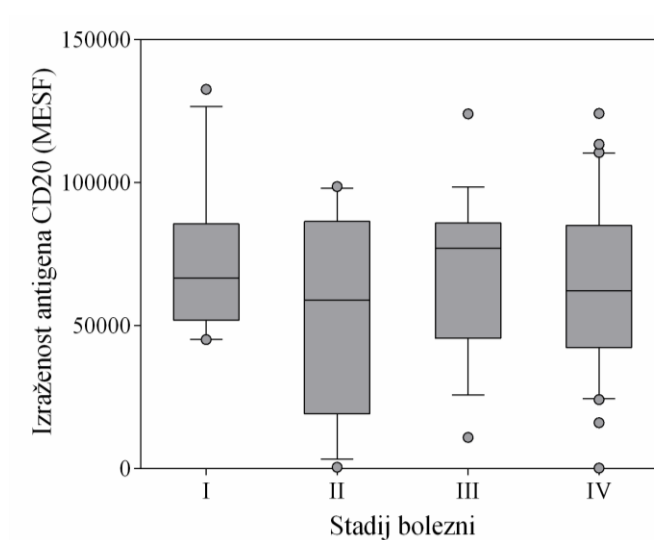
Izmerjena mediana izražnosti površinskega antigena CD20 je bila najvišja v skupini bolnikov z bolezenskim stadijem III (76973 MESF), najnižja pa v skupini bolnikov s stadijem II (58917 MESF). Največji razpon med minimalno in maksimalno vrednostjo je v skupini bolnikov s stadijem IV, znotraj katere je bolnik z najmanjšo vrednostjo, bolnik z največjo vrednostjo pa je v skupini bolnikov s stadijem I (Preglednica 8).

Preglednica 8: Intenziteta izražnosti površinskega antigena CD20 glede na stadij bolezni

Stadij	Izražanost površinskega antigena CD20 (MESF)			
	Bolniki (N, %)	Mediana	Razpon	Kvartilni razmik
I	16 (21,6)	66564	45134–132583	53317–83470
II	11 (14,9)	58917	469–98579	20605–83485
III	17 (23,0)	76973	10864–124048	46891–85273
IV	30 (40,5)	62071	208–124169	44175–81382
<i>Vsi bolniki</i>	<i>74 (100)</i>	<i>65964</i>	<i>208–132582</i>	<i>47218–85120</i>

N – število bolnikov, % – odstotek bolnikov

Porazdelitev izražnosti površinskega antigena CD20 glede na bolezenski stadij prikazuje Slika 11. Razlika v intenziteti izražnosti antigena med skupinami ni statistično značilna ($p = 0,750$).



Slika 11: Grafični prikaz razporeditve izraženosti površinskega antigena CD20 v odvisnosti od stadija bolezni

4.2.4 Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s ponovitvijo bolezni

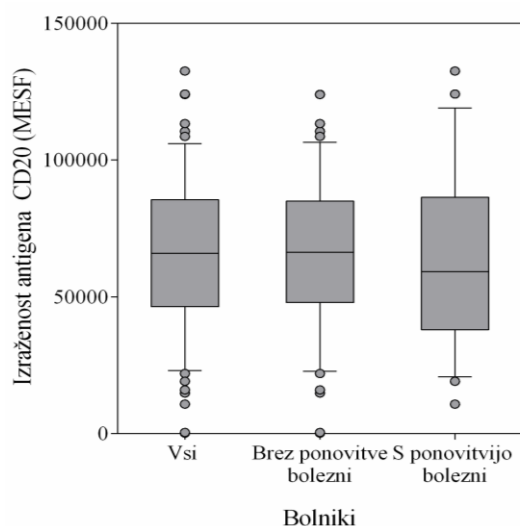
Najvišjo mediano izraženosti površinskega antigena CD20 smo izmerili pri bolnikih brez ponovitve bolezni (66294 MESF), najnižjo pa pri bolnikih z večkratno ponovitvijo bolezni (58917 MESF). Največji razpon med minimalno in maksimalno izmerjeno vrednostjo izraženosti površinskega antigena CD20 je pri skupini bolnikov brez ponovitve bolezni, v kateri je bolnik z minimalno vrednostjo, bolnik z maksimalno vrednostjo, pa je v skupini z večkratno ponovitvijo bolezni (Preglednica 9).

Preglednica 9: Intenziteta izraženosti površinskega antigena CD20 pri bolnikih brez ponovitve FL in pri bolnikih s ponovitvijo FL

Bolniki	Izražena intenziteta površinskega antigena CD20 (MESF)			
	Bolniki (N, %)	Mediana	Razpon	Kvartilni razmik
Vsi bolniki	74 (100)	65964	208–132582	47218–85120
Bolniki brez ponovitve bolezni	53 (71,6)	66294	208–124048	49004–846661
Bolniki s ponovitvijo bolezni	21 (28,4)	59205	10864–132582	45137–86369
Bolniki z enkratno ponovitvijo bolezni	16 (21,3)	63019	10864–132582	43879,8–83418
Bolniki z večkratno ponovitvijo bolezni	5 (6,7)	58917	26926–124169	45137–86480

N – število bolnikov, % – odstotek bolnikov

Grafični prikaz porazdelitve izraženosti površinskega antigena CD20 pri bolnikih brez ponovitve bolezni in z njeno ponovitvijo prikazuje Slika 12. Izraženost površinskega antigena CD20 se med skupinama ni statistično značilno razlikovala ($p = 0,760$). Prav tako se izraženost površinskega antigena CD20 pri bolnikih z enkratno ponovitvijo in pri bolnikih z večkratno ponovitvijo FL ni statistično razlikovala ($p = 0,966$).



Slika 12: Grafični prikaz razporeditve izraženosti površinskega antigena CD20 v odvisnosti od ponovitve bolezni

4.2.5 Poveza nost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 z načinom začetnega zdravljenja

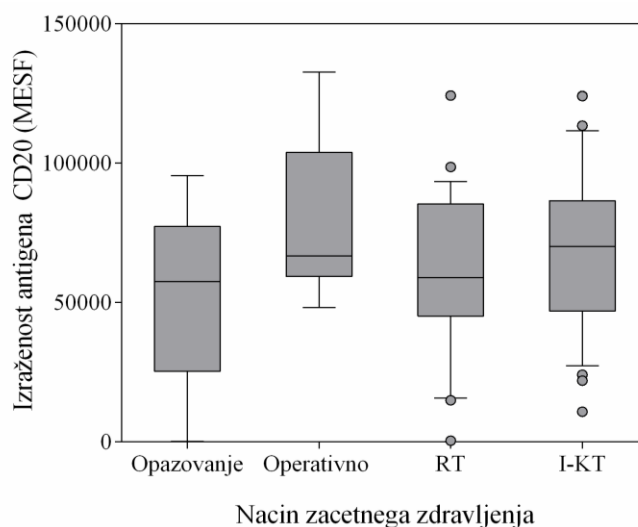
Najvišjo mediano izraženosti površinskega antigena CD20 smo izmerili pri bolnikih, zdravljenih z imunokemoterapijo (70137 MESF), najmanjšo pa pri skupini bolnikov, zdravljenih s kemoterapijo (26926 MESF). Največji razpon med minimalno in maksimalno izmerjeno vrednostjo je bil v skupini bolnikov, zdravljenih z radioterapijo (Preglednica 10).

Preglednica 10: Intenziteta izraženosti površinskega antigena CD20 glede na način začetnega zdravljenja

Način začetnega zdravljenja	Izražena intenziteta površinskega antigena CD20 (MESF)			
	Bolniki (N, %)	Mediana	Razpon	Kvartilni razmik
Opazovanje	6 (8,1)	58222	208–95544	52189–85412
Operativno	5 (6,8)	66294	48199–132582	63082–67182
RT	27 (36,5)	58917	469–124169	45135–83854
KT	1 (1,3)	26926	/	/
I-KT	35 (47,3)	70137	10864–124048	48887–85570
<i>Vsi bolniki</i>	<i>74 (100)</i>	<i>65964</i>	<i>208–132582</i>	<i>47218–85120</i>

N – število bolnikov, % – odstotek bolnikov

Porazdelitev izraženosti površinskega antigena CD20 glede na začetno zdravljenje prikazuje Slika 13. Izražena intenziteta površinskega antigena CD20 se pri bolnikih na opazovanju, zdravljenih operativno, z radioterapijo in imunokemoterapijo, ni značilno razlikovala ($p = 0,521$). Skupine bolnikov, zdravljenih s kemoterapijo, zaradi majhnosti vzorca skupine nismo vključili v grafični prikaz in statistično analizo.



Slika 13: Grafični prikaz razporeditve izraženosti površinskega antigena CD20 v odvisnosti od načina začetnega zdravljenja

4.3 USPEŠNOST ZDRAVLJENJA FOLIKULARNEGA LIMFOMA Z RITUKSIMABOM

4.3.1 Določitev mejne vrednosti izraženosti površinskega antigena CD20 kot napovednega faktorja

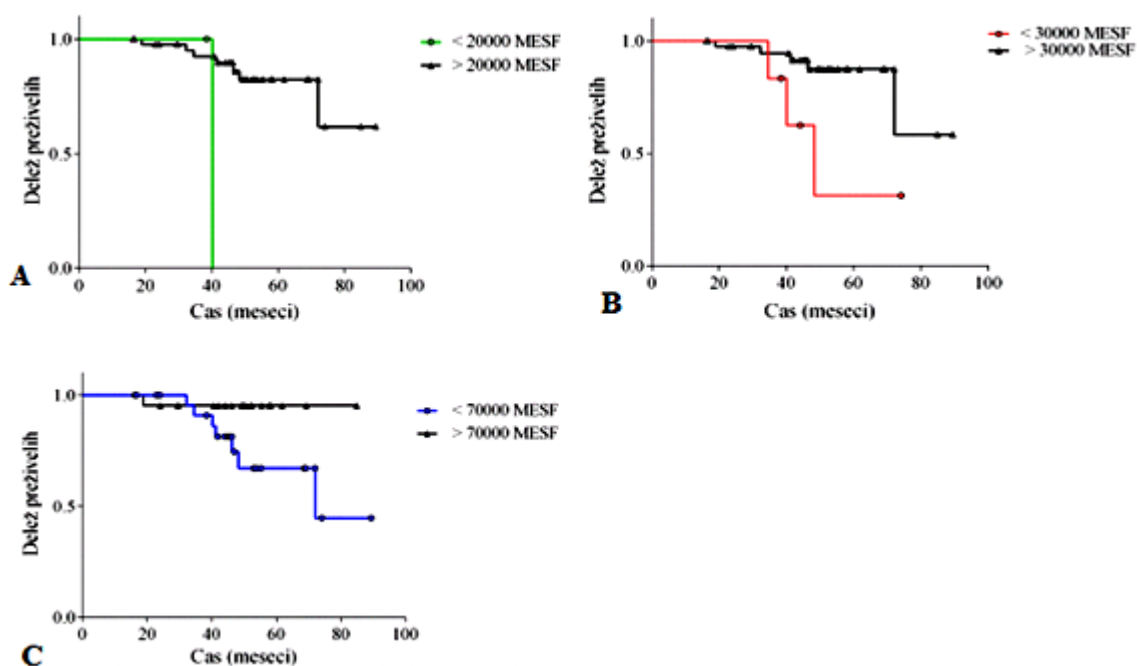
Sedminštirideset izmed skupno 74 (63,5 %) bolnikov, vključenih v prvi del naloge, je bilo zdravljenih z R. Celokupno preživetje pri bolnikih, zdravljenih z R, se je statistično značilno razlikovalo med skupinami bolnikov z različno stopnjo izraženosti površinskega antigena CD20 (Preglednica 11). Krivulji preživetja sta se statistično značilno razlikovali pri skupinah bolnikov z izraženostjo CD20 pod in nad 20000 MESF ter 30000 MESF, pri 70000 MESF pa sta bili krivulji mejno statistično različni (Slika 14).

Mejno vrednost izraženosti površinskega antigena CD20, nad katero zdravljenje z R pomeni boljši odgovor na zdravljenje, smo določili pri vrednosti 30000 MESF (HR = 3,922; 95-% CI = 1,122–66,731, p = 0,041), ker sta v skupini bolnikov, ki imajo površinski antigen CD20 izražen pod 20000 MESF, le 2 bolnika. Nakazuje se tudi možnost, da sta mejni vrednosti dve, saj sta se krivulji preživetja bolnikov s CD20, izraženim pod in nad 70000 MESF, mejno značilno razlikovali (HR = 5,809; 95-% CI = 0,975–15,770, p = 0,058) (Slika 15).

Preglednica 11: Statistično značilne razlike v izražnosti površinskega antigena CD20 med skupinami bolnikov, zdravljenih z rituksimabom (test krivulj preživetja »log-rank«)

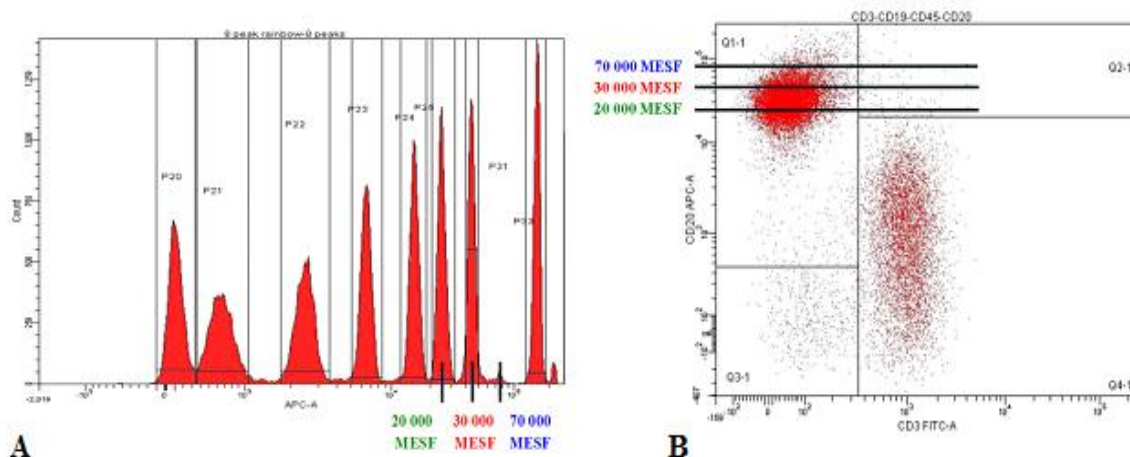
Mejna vrednost (MESF)	(vrednost p)	Bolniki (N)		Mejna vrednost (MESF)	(vrednost p)	Bolniki (N)	
		pod	nad			pod	nad
15 000	p = 0,783	1	46	70 000	p = 0,058	26	21
20 000	p = 0,044	2	45	75 000	p = 0,110	28	19
25 000	p = 0,102	4	43	80 000	p = 0,220	32	15
30 000	p = 0,041	6	41	85 000	p = 0,391	35	12
35 000	p = 0,070	7	40	90 000	p = 0,120	37	10
40 000	p = 0,137	8	39	95 000	p = 0,176	39	8
45 000	p = 0,254	11	36	100 000	p = 0,176	39	8
50 000	p = 0,167	14	33	105 000	p = 0,276	41	6
55 000	p = 0,246	16	31	110 000	p = 0,342	42	5
60 000	p = 0,274	21	26	115 000	p = 0,486	44	3
65 000	p = 0,136	22	25				

N – število bolnikov



Slika 14: Celokupno preživetje s stopnjo izražnosti CD20, pri kateri se krivulji preživetja statistično razlikujeta

Krivulji sta se statistično značilno razlikovali pri skupinah bolnikov z izražnostjo CD20 pod in nad 20000 MESF (A) in pri skupinah bolnikov z izražnostjo antigena CD20 pod in nad 30000 MESF (B) ter mejno statistično pri skupinah bolnikov z izražnostjo antigena CD20 pod in nad 70000 MESF (C).



Slika 15: Rezultat meritev kalibracijskih kroglic Sphero Rainbow, označenih s FITC, (A) in rezultat meritev izražanja antigena CD20 (B) z označenimi mejnimi vrednostmi CD20, pri katerih se krivulji preživetja statistično razlikujeta

4.3.2 Povezanost intenzitete izražanja površinskega antigena CD20 s kvaliteto odgovora na zdravljenje z rituksimabom

Kvaliteto odgovora na zdravljenje z R prikazuje Preglednica 12. Pri 39 (83,0 %) bolnikih je bil dosežen celokupni odgovor, pri 32 (68,1 %) PO in pri 7 (14,9 %) DO.

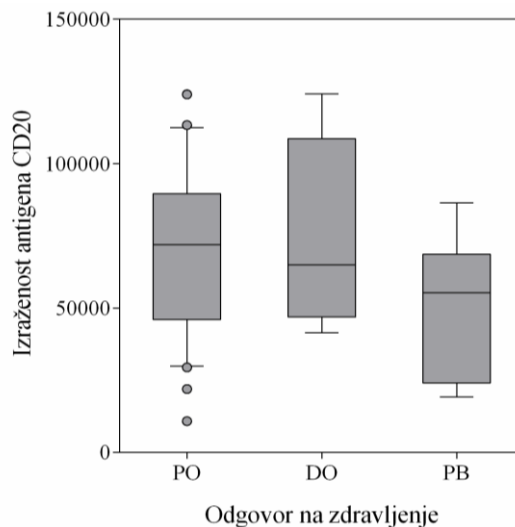
Preglednica 12: Porazdelitev bolnikov, zdravljenih z R, glede na kvaliteto odgovora

Kvaliteta odgovora	Število bolnikov	% bolnikov
PO	32	68,1
DO	7	14,9
PB	7	14,9
SB	1	2,1
CO	39	83,0
Skupaj	47	100

PO – popolni odgovor, DO – delni odgovor, SD – stabilna bolezen, PB – napredovanje bolezni, CO – celokupni odgovor

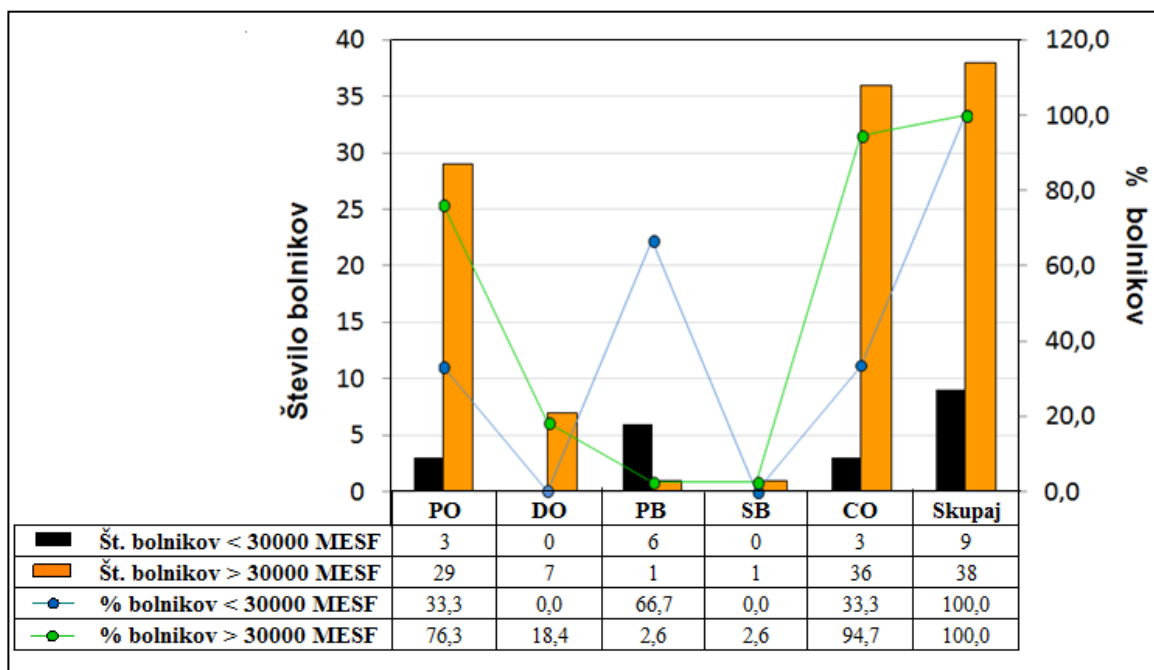
Mediana izraženosti površinskega antigena CD20 je bila najvišja pri bolnikih, ki so dosegli popolni in delni odgovor na zdravljenje z R (71960 MESF za bolnike s popolnim odgovorom in 64938 MESF za skupino bolnikov z delnim odgovorom). Najnižja mediana je bila izmerjena pri bolnikih s progresom bolezni (55321 MESF).

Izraženost površinskega antigena CD20 se med posameznimi skupinami ni statistično značilno razlikovala ($p = 0,238$). Skupine bolnikov s stabilno boleznijo zaradi majhnosti vzorca skupine nismo vključili v grafični prikaz in statistično analizo (Slika 16).



Slika 16: Grafični prikaz porazdelitve izraženosti površinskega antigena CD20 glede na kvaliteto odgovora

Želeli smo tudi oceniti, kakšna je kvaliteta odgovora na zdravljenje z R pri bolnikih z izraženim površinskim antigenom CD20 nad mejno vrednostjo 30000 MESF in pri bolnikih z izraženim površinskim antigenom CD20 pod mejno vrednostjo. V skupini bolnikov nad mejno vrednostjo je 36 (92,3 %) bolnikov s celokupnim odgovorom na zdravljenje, v skupini bolnikov pod mejno vrednostjo pa so 3 (7,7 %) bolniki. Nasprotno pa je v skupini bolnikov s stabilno boleznijo ali progresom bolezni 6 (75 %) bolnikov, ki imajo površinski antigen CD20 izražen pod mejno vrednostjo, in le 2 (25 %) bolnika, ki imata površinski antigen CD20 izražen nad mejno vrednostjo (Slika 167). Odgovor na zdravljenje je v skupini bolnikov s površinskim antigenom CD20, izraženim nad mejno vrednostjo, statistično značilno boljši kot v skupini bolnikov s površinskim antigenom CD20, izraženim pod mejno vrednostjo ($p < 0,0001$). Razlika v odgovoru na zdravljenje je med skupinama značilna tudi pri potencialni mejni vrednosti 70000 MESF ($p = 0,044$).

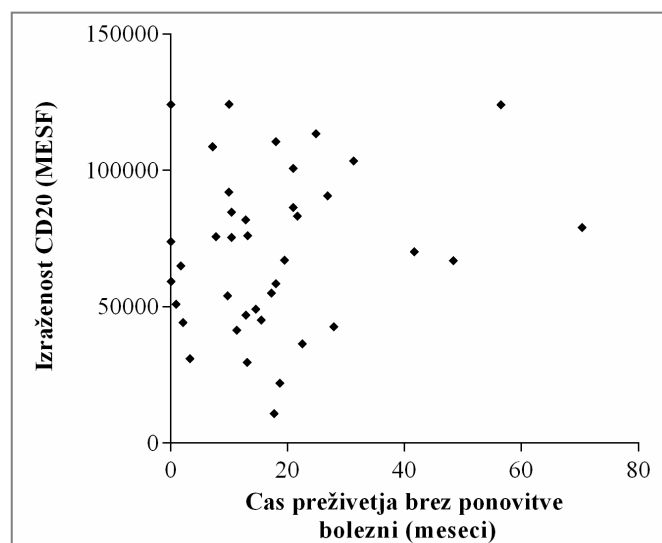


PO – popolni odgovor, DO – delni odgovor, PB – napredovanje bolezni, SD – stabilna bolezen, CO – celokupni odgovor

Slika 17: Porazdelitev bolnikov, zdravljenih z R, glede na kvaliteto odgovora in mejno vrednost izražnosti površinskega antigena CD20 (30000 MESF)

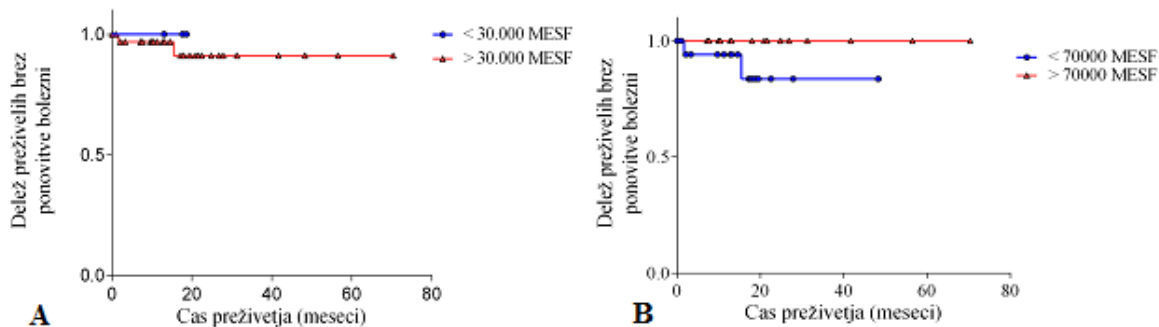
4.3.3 Povezanost intenzitete izražanja površinskega antigena CD20 s trajanjem odgovora na zdravljenje z rituksimabom

Od skupno 47 bolnikov, zdravljenih z R, smo v analizo povezanosti med intenziteto izražnosti površinskega antigena CD20 in trajanjem odgovora na zdravljenje z R vključili 39 bolnikov z doseženim popolnim ali delnim odgovorom. Trajanje odgovora na zdravljenje z R smo ocenili s preživetjem brez ponovitve bolezni. Povezanosti med spremenljivkama nismo dokazali ($p = 0,492$, $r = 0,113$) (Slika 18).



Slika 18: Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s trajanjem odgovora

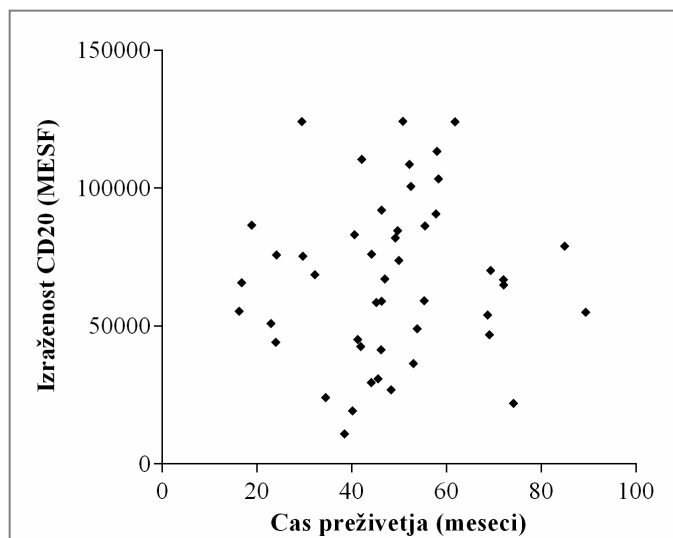
Preveriti smo želeli tudi, ali se trajanje odgovora na zdravljenje z R pri bolnikih z izraženim površinskim antigenom CD20 nad mejno vrednostjo 30000 MESF razlikuje od trajanja odgovora pri bolnikih z izraženim CD20 pod določeno mejno vrednostjo. Ugotovili smo, da se preživetje brez ponovitve bolezni med skupinama statistično ne razlikuje (HR = 0,0; 95-% CI = 0,003–36,930, $p = 0,646$). Mediana preživetja brez ponovitve bolezni v času opazovanja še ni bila dosežena v nobeni od skupin (Slika 19A). Podobne rezultate smo dobili tudi za potencialno mejno vrednost 70000 MESF (Slika 19B).



Slika 19: Preživetje brez ponovitve bolezni za bolnike z intenziteto izražanja površinskega antigena CD20 nad in pod mejno vrednostjo 30000 MESF ter nad in pod potencialno mejno vrednostjo 70000 MESF

4.3.4 Povezanost intenzitete izražanja površinskega antigena CD20 s celokupnim preživetjem

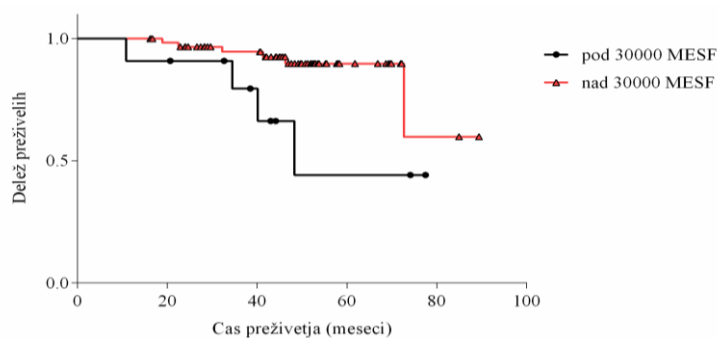
V analizo povezanosti intenzitete izražanja površinskega antigena CD20 s celokupnim preživetjem smo vključili 47 bolnikov z izmerjeno intenziteto izraženosti površinskega antigena CD20 in podatki o celokupnem preživetju. Povezanosti med spremenljivkama nismo dokazali ($p = 0,326$, $r = 0,146$) (Slika 20).



Slika 20: Povezanost intenzitete izraženosti površinskega antigena CD20 s celokupnim preživetjem

Ugotovili smo, da imajo bolniki z intenziteto izraženosti površinskega antigena CD20 nad mejno vrednostjo 30000 MESF statistično boljše celokupno preživetje kot bolniki z intenziteto izraženosti CD20 pod mejno vrednostjo ($HR = 3,922$; 95-% $CI = 1,122-66,730$, $p = 0,041$). Mediana celokupnega preživetja je bila pri bolnikih z izraženostjo površinskega antigena CD20 pod mejno vrednostjo 48,3 meseca, medtem ko pri bolnikih z izraženostjo tega nad mejno vrednostjo ni bila dosežena (Slika 14 B). Pri 6 (12,8 %) bolnikih s FL je bila stopnja izraženosti površinskega antigena CD20 pod mejno vrednostjo 30000 MESF. Podobne rezultate smo dobili tudi za potencialno mejno vrednost 70000 MESF ($HR = 5,809$; 95-% $CI = 0,975-15,770$, $p = 0,058$) (Slika 14C).

Zanimalo nas je tudi, ali se celokupno preživetje 74 bolnikov iz prvega dela naloge, ki imajo CD20 izražen pod in nad mejno vrednostjo 30000 MESF, razlikuje. Ugotovili smo, da imajo bolniki z antigenom CD20, izraženim nad mejno vrednostjo, značilno boljše celokupno preživetje kot bolniki, ki imajo površinski antigen CD20, izražen pod mejno vrednostjo ($p = 0,01$) (Slika 21). Pri 11 (14,9 %) bolnikih s FL je bila stopnja izraženosti površinskega antigena CD20 pod mejno vrednostjo 30000 MESF.



Slika 21: Celokupno preživetje glede na mejno vrednost (30000 MESF)

Rezultati univariatne analize preživetja so pokazali, da je preživetje bolnikov s FL odvisno tako od izražanja CD20 kot od starosti bolnikov in števila linij zdravljenja, zato smo z multivariatno analizo, pri kateri števila zdravljenj nismo upoštevali, preverili, ali sta starost in izražanje CD20 neodvisna napovedna dejavnika. Bolnike smo razdelili v 5 skupin glede na starost in izražanje CD20; skupine za starost in izražanje CD20 smo določili na podlagi rezultatov univariatne analize preživetja (Preglednica 13).

Preglednica 13: Skupine bolnikov glede na starost in izražanje površinskega antigena CD20

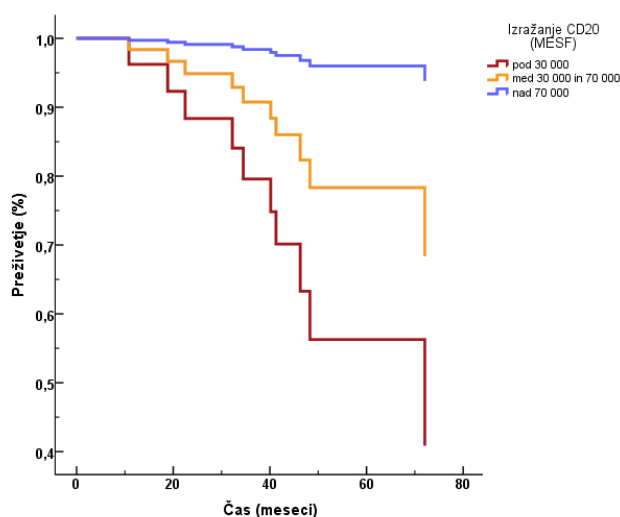
Izražanje antigena CD20 (MESF)	Starost (leta)		Skupaj
	pod 60	nad 60	
Pod 30000	4	7	11
30000–70000	8	23	31
Nad 70000	11	21	32
Skupaj	23	51	74

Test »log-rank« je pokazal, da je preživetje 3 skupin bolnikov, ki so se med seboj razlikovale po izražanju antigena CD20, različno ($p = 0,019$) (Preglednica 14, Slika 22). Preživetje bolnikov se je značilno razlikovalo le v dveh skupinah bolnikov, in sicer z izraženim CD20 pod 30000 MESF in nad 70000 MESF (HR = 14,047; 95-% CI = 1,532–128,838, $p = 0,190$).

Preglednica 14: Primerjava preživetja skupin bolnikov glede na izražanje antigena CD20 in starost

Skupine	Primerjava med skupinami	
	(vrednost p)	(HR; 95-% CI)
CD20 pod 30000 MESH/CD20 med 30000 in 70000 MESH/CD20 nad 70000 MESH	0,058	/
CD20 pod 30000 MESH/CD20 med 30000 in 70000 MESH	0,104	0,104; 0,693–51,393
CD20 pod 30000 MESH/CD20 nad 70000 MESH	0,019	14,047; 1,532–128,838
Starost pod 60 let/starost nad 60 let	0,028	/

HR – razmerje tveganja, CI – interval zaupanja



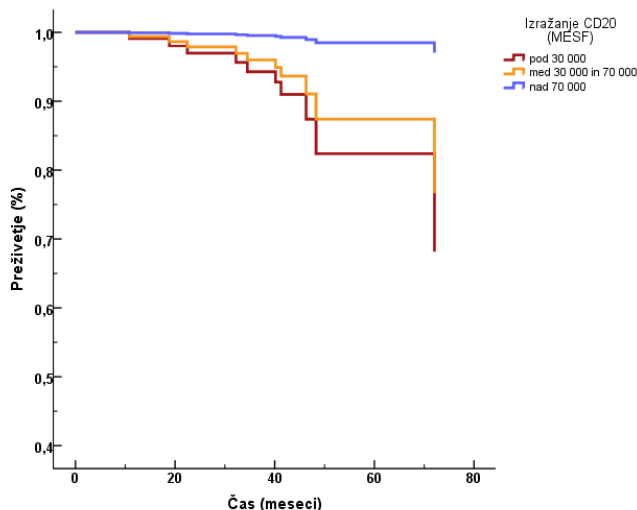
Slika 22: Preživetje treh skupin bolnikov z izražanjem CD20 pod 30000 MESH, med 30000 in 70000 MESH ter nad 70000 MESH

Ker so bili v skupini bolnikov, ki so imeli izražen CD20 pod 30000 MESH, le 4 bolniki, mlajši od 60 let, in je 7 bolnikov bilo starejših od 60 let, se je izkazalo, da vpliva starosti v multivariatni Coxovi analizi preživetja ni možno oceniti z uporabo takšnih dveh starostnih skupin. Zato smo se odločili, da v analizi preživetja starost upoštevamo kot linearno spremenljivko. Ugotovili smo, da na preživetje bolnikov s FL neodvisno vplivata starost (HR = 1,162; 95-% CI 1,054–1,281, $p = 0,002$) in izraženost CD20 pod mejno vrednostjo 30000 MESH (HR = 0,078; 95-% CI = 0,008–0,726, $p = 0,025$) (Slika 23, Preglednica 15).

Preglednica 15: Preživetje bolnikov glede na izražanje CD20 in starost

Skupine	Rezultati Coxove analize (p; HR; 95-% CI)	
	Starost nad in pod 60 let	Starost linearna spremeljivka
	(p = 0,005)	(p = 0,001)
CD20 pod 30000 MESF/CD20 med 30000 in 70000 MESF	p = 0,15 (0,386; 0,013–1,453)	p = 0,602 (0,695; 0,177–2,727)
CD20 pod 30000 MESF/CD20 nad 70000 MESF	p = 0,017 (0,067; 0,007–0,621)	p = 0,025 (0,078; 0,008–0,726)
Starost pod 60 let/starost nad 60 let	p = 0,960 (308261; 0,0–3,157E+218)	p = 0,002 (1,162; 1,054–1,281)

HR – razmerje tveganja, CI – interval zaupanja



Slika 23: Vpliv starosti in izražanja CD20 na preživetje bolnikov s FL

4.4 VPLIV NAČINA ZDRAVLJENJA NA IZRAŽANJE POVRŠINSKEGA ANTIGENA CD20

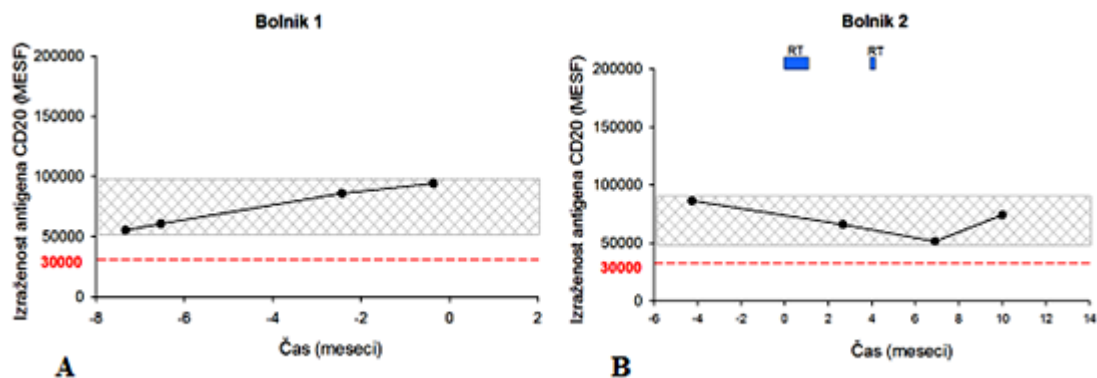
Vpliv načina zdravljenja na izražanje površinskega antigena CD20 smo preučevali pri 12 bolnikih, vključenih v 2. del naloge. Izražanje antigena CD20 se spreminja skozi čas in je odvisno od načina zdravljenja (Preglednica 16). Pri bolnikih je bilo opravljenih od 4 do 6 zaporednih meritev izražanja CD20 površinskega antigena. Razen 5 bolnikov so imeli vsi CD20 izmerjen pred začetkom zdravljenja.

Preglednica 16: Spreminjanje izražanja površinskega antigena CD20 v odvisnosti od časa in vrste terapije

Bolniki			Zdravljenje			Podatki o izraženosti površinskega antigena CD20			
Št.	Spol	Starost	Način	Izhod	Opazovalno obdobje (mesece)	Izhodni vzorec (DA/NE)	Meritve (N)	Razpon	Nad/pod mejno vrednostjo
1	M	67	O	živ	20,30	DA	4	55321–94119	nad
2	Ž	61	RT	živ	55,47	DA	4	51274–86369	nad
3	M	74	RT + KT	živ	271,53	NE	6	8299–97347	nad in pod
4	Ž	71	RT + KT	smrt	101,03	DA	5	19702–84010	nad in pod
5	M	56	RT + KT	smrt	77,33	NE	4	50677–191151	nad
6	M	67	RT + KT	smrt	113,23	NE	4	53068–89861	nad
7	M	78	I-KT	živ	85,97	DA	4	48713–113725	nad
8	M	60	I-KT	živ	16,73	DA	4	39094–65635	nad
9	Ž	70	I-KT	smrt	32,23	DA	5	15550–68656	nad in pod
10	Ž	83	I-KT	smrt	40,17	NE	4	12277–63711	nad in pod
11	M	74	I-KT	smrt	129,53	NE	4	12231–24410	pod
12	Ž	76	I-KT	smrt	48,30	DA	5	1477–26926	pod

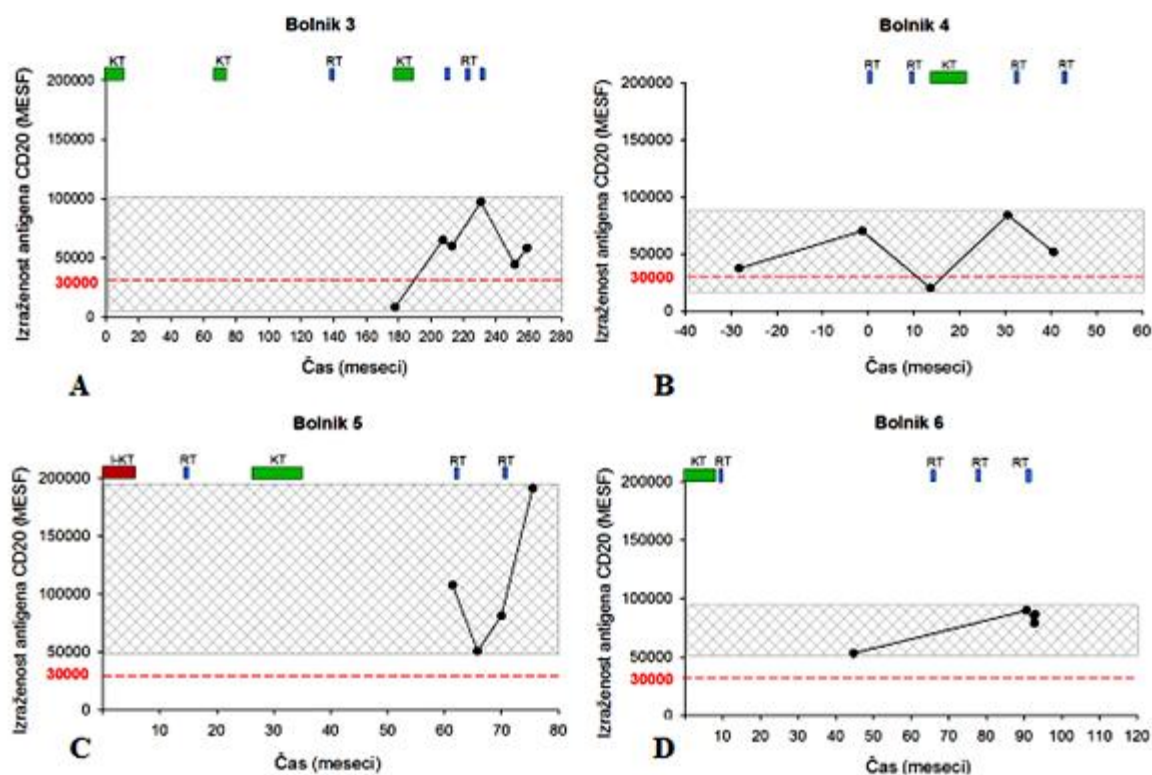
Ž – ženske, M – moški, O – opazovanje, R – radioterapija, RT + KT – radioterpija in kemoterapija, I-KT – imunokemoterapija

Pri bolniku, ki v času spremljanja ni bil zdravljen, se je izraženost antigena CD20 spreminjala v razponu 38798 MESF (Slika 24A). Podoben razpon (35095 MESF) izražanja antigena CD20 smo ugotovili tudi pri bolniku, ki je bil zdravljen samo z radioterapijo (Slika 24B). Oba bolnika sta imela površinski antigen CD20 ves čas izražen nad mejno vrednostjo 30000 MESF.



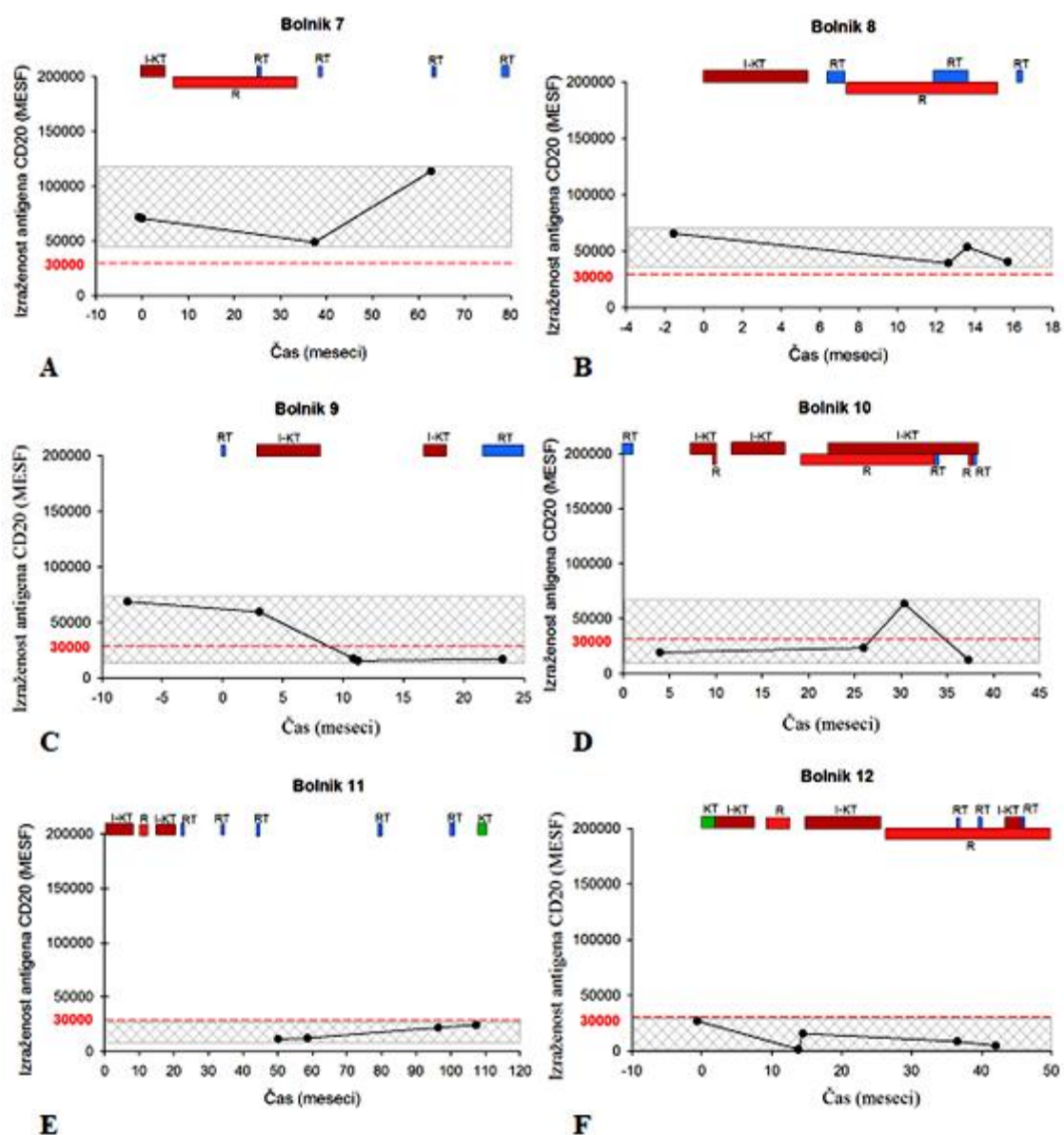
Slika 24: Izražanje površinskega antigena CD20 pri bolniku na opazovanju in pri bolniku, ki je bil zdravljen le z radioterapijo. Razpon izražanja CD20 je označen s sivo barvo, mejna vrednost izražanja CD20 pri 30000 MESF pa z rdečo črto.

Pri večini bolnikov (1 od 4), zdravljenih z radioterapijo in kemoterapijo, je bil razpon izraženosti površinskega antigena CD20 precej večji kot pri bolniku, ki je bil le na opazovanju (od 55321 do 94119 MESF). Pri vseh bolnikih je opaziti povečano izražanje CD20 po radioterapiji, pred katero so bolniki prejeli kemoterapijo. Pri bolnikih 3 in 5 je bilo povečanje najizrazitejše (Slika 25). Pri dveh bolnikih so bile vse izmerjene vrednosti izražanja površinskega antigena CD20 ves čas nad mejno vrednostjo (bolnika 5 in 6), pri drugih dveh pa so bile nekatere izmerjene vrednosti nad, druge pa pod mejno vrednostjo (bolnika 3 in 4).



Slika 25: Vpliv kemoterapije in radioterapije na izražanje antigena CD20. Razpon izražanja CD20 je označen s sivo barvo, mejna vrednost izražanja CD20 pri 30000 MESF pa z rdečo črto.

Pri 6 bolnikih, ki so bili zdravljeni z imunokemoterapijo, je bil antigen CD20 izražen zelo različno. Pri 3 bolnikih se vrednost antigena CD20 praktično ni spreminjala (bolniki 10, 11 in 12). Ob prejemanju imunokemoterapije ali med njo se je izražanje antigena CD20 zmanjšala pri 3 bolnikih (bolniki 7, 8 in 9) (Slika 26 A–D). Pri dveh bolnikih je bil površinski antigen CD20 ves čas izražen nad mejno vrednostjo (bolnika 7 in 8), pri dveh pod mejno vrednostjo (bolnika 11 in 12), pri dveh pa so bile nekatere meritve nad, druge pa pod mejno vrednostjo (bolnika 9 in 10).



Slika 26: Vpliv imunokemoterapije na izražanje antigena CD20. Razpon izražanja CD20 je označen s sivo barvo, mejna vrednost izražanja CD20 pri 30000 MESF pa z rdečo črto.

5 RAZPRAVA

Površinski antigen CD20 je od uvedbe R v klinično prakso leta 1997 pomembna tarča za zdravljenje FL in drugih limfomov B. Učinkovitost R v zdravljenju NHL, predvsem FL in DVCLB, so potrdile številne raziskave. Dodatek tega h konvencionalnemu zdravljenju tako dokazano izboljša odgovor na zdravljenje, podaljša trajanje remisij in celokupno preživetje. Vzdrževalno zdravljenje z R pa trajanje remisij dodatno podaljša, nekatere raziskave so pokazale tudi daljše celokupno preživetje (Jezeršek Novakovič in Benigar, 2008).

Uspeha zdravljenja z R do danes ni mogoče natančno napovedati. Vemo, da je zdravljenje učinkovito le pri tistih bolnikih, pri katerih limfomske celice izražajo antigen CD20, predvideva pa se, da na to vpliva tudi stopnja izraženosti CD20. Predlagana je bila povezava med intenziteto izraženosti antigena CD20 in odzivnostjo bolnikov z limfomom B na zdravljenje z R ter celokupnim preživetjem (Horvat, Kloboves Prevodnik, 2010; Rezvani in sod., 2011; Suzuki in sod., 2012; Johnson in sod., 2013). Prav tako pa tudi, da je antigen CD20 napovedni dejavnik, na osnovi katerega lahko predvidimo, katerim bolnikom bo zdravljenje koristilo in katerim ne (Horvat in Kloboves Prevodnik, 2010; Johnson in sod., 2013; Fang in sod., 2013). Slednje ugotovitve temeljijo na raziskavah, narejenih na različnih histoloških tipih limfomov B, ki pa se razlikujejo tako glede na stopnjo izraženosti CD20 kot tudi glede na spreminjanje stopnje izraženosti po zdravljenju z R (Hiraga in sod., 2009; Terui in sod., 2009; Miyoshi in sod., 2012). Zaradi teh razlik v intenziteti CD20 med različnimi histološkimi tipi limfomov B je ključno razumevanje, kakšno je izražanje antigena CD20 pri posameznem tipu limfoma in kakšno je njegovo izražanje med zdravljenjem. V sklopu magistrske naloge smo želeli le-to raziskati pri bolnikih s FL.

Preveriti smo želeli, ali izraženost CD20 variira znotraj posameznega tipa limfoma, v našem primeru FL. V ta namen smo ugotavljali, ali klinično patološki dejavniki, kot so starost, gradus in stadij bolezni, število ponovitev bolezni ter način prvega zdravljenja, vplivajo na stopnjo izraženosti CD20 pred začetkom zdravljenja pri 74 bolnikih s FL, ki smo jih vključili v prvi del naloge. Naši rezultati so pokazali, da je razpon izražanja antigena CD20 pri bolnikih s FL velik, in sicer od 208 MESF do 132582 MESF, kar je ugotovila tudi Horvatova v svoji raziskavi (2011). Ugotovili smo, da navedeni klinično patološki dejavniki na stopnjo izraženosti površinskega antigena niso vplivali, kar je v skladu z rezultati Suzukija in sodelavcev (2012), ki so ugotavljali povezavo med starostjo, spolom, stadijem, simptomi B in IPI z izražanjem CD20 pri bolnikih z DVCLB. Našim ugotovitvam delno nasprotuje ugotovitev Olejniczaka in sodelavcev (2006), ki so dokazali povezavo med izražanjem CD20 in razširjenostjo bolezni pri bolnikih s FL. Bolniki z bolj razširjeno boleznijo (stadij III) so imeli močnejše izražen antigen kot bolniki z manj razširjeno boleznijo (stadij I). Z njihovimi ugotovitvami se delno skladajo tudi rezultati

raziskave Horvatove (2011), vendar jasne povezave med bolezenskim stadijem ter intenziteto izraženosti CD20 v slednji niso dokazali. Na podlagi naših rezultatov, ki se skladajo z rezultati Suzukija in sodelavcev (2012), lahko zaključimo, da je za našo študijsko skupino izražanje antigena CD20 pred začetkom zdravljenja neodvisno od klinično patoloških dejavnikov, kot so starost, gradus in stadij bolezni, število ponovitev bolezni ter način prvega zdravljenja. Razlike v rezultatih omenjenih raziskav so lahko posledica različnih kriterijev za vključitev bolnikov v raziskavo, majhno število preučevanih bolnikov in sorazmerno kratko opazovalno obdobje, saj je FL kronična, indolentna bolezen z dolgim preživetjem bolnikov. Predvideva se, da do neskladnosti v rezultatih med raziskavami prihaja tudi zaradi različnih metod, ki so jih avtorji uporabili za merjenje izraženosti antigena CD20 (Olejniczk, 2006).

V nadaljevanju smo preučevali klinično patološke dejavnike, ki vplivajo na uspešnost zdravljenja. Eden od načinov ocene tega je tudi preživetje bolnikov. Ugotovili smo, da je bilo celokupno preživetje 74 bolnikov, vključenih v prvi del naloge, 86,5-odstotno in da na to vplivata le starost in število linij zdravljenja, medtem ko gradus, stadij in vrsta začetnega zdravljenja na preživetje ne vplivajo. Vpliv starosti na celokupno preživetje bolnikov s FL so raziskovali številni drugi in prišli do ugotovitev, ki so skladne z rezultati naše raziskave (Decaudin in sod., 1999; Duarte in sod., 2013; Maartense in sod., 2002). Naši rezultati se ujemajo z ugotovitvami Decaudina in sodelavcev, ki so pokazali, da je starost nad 60 let napovedni dejavnik, ki napoveduje slabše celokupno preživetje. Nekoliko se razlikujejo rezultati Maartensa in sodelavcev (2002), ki so v svoji raziskavi prav tako primerjali celokupno preživetje pri različnih starostnih skupinah bolnikov (< 60 , $60-69$, ≥ 70) in ugotovili, da starost ≥ 70 pomembno vpliva na preživetje v njihovi skupini bolnikov. Zaključimo lahko, da je starost > 60 let v naši skupini bolnikov s FL statistično pomemben napovedni dejavnik, ki napoveduje slabše celokupno preživetje. Izhod bolezni lahko ocenimo s pomočjo prognostičnih indeksov, v primeru FL je to FLIPI, ki vključuje poleg stadija bolezni, števila bezgavčnih lokacij, serumske koncentracije laktatne dehidrogenaze in koncentracije hemoglobina tudi starost. Starost nad 60 let se je namreč izkazala za pomemben dejavnik tveganja, ki napoveduje neugoden potek bolezni, in je zato vključena v FLIPI, ki je danes temelj za načrtovanje specifičnega onkološkega zdravljenja pri bolnikih s FL (Freedman, 2014; Jezeršek Novaković, 2013).

Nadalje bi na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepali, da na preživetje vpliva tudi število linij zdravljenja. Vendarle je to posledica neugodnega poteka bolezni, ki posredno kaže na agresivni potek oziroma na rezistenco na zdravljenje in zato na preživetje dejansko nima vpliva. Zato v literaturi raziskav, ki bi preučevale vpliv števila linij zdravljenj na celokupno preživetje, nismo zasledili. Prav tako tudi nismo zasledili raziskav, ki bi preučevale vpliv števila ponovitev bolezni na celokupno preživetje. Veliko pa je bilo narejenega glede preostalih klinično patoloških dejavnikov, za katere smo ugotovili, da na celokupno preživetje ne vplivajo (gradus, stadij bolezni, vrsta začetnega zdravljenja).

Gradus v naši raziskavi ni vplival na celokupno preživetje bolnikov. Kljub nasprotujočim podatkom v najnovejši literaturi gradus v vskodnevem kliničnem delu pomembno vpliva na odločitev, kako bomo zdravili bolnika s FL. Za določanje gradusa je v uporabi sistem po SZO, ki temelji na Mannovi in Berardovi metodi določanja števila centroblastov. Ker so raziskave pokazale, da imajo bolniki z gradusoma 1 in 2 enako preživetje, so v zadnji klasifikaciji SZO (Swerdlow in sod., 2008) gradusa 1 in 2 združili v nizki gradus, gradus 3 pa so poimenovali visoki gradus. Pomen gradusa ni povsem pojasnjen, saj številne zadnje raziskave kažejo, da nima pomembnega vpliva na preživetje. Wahlin in sodelavci (2012) so preučevali vpliv gradusa na preživetje in pokazali, da se celokupno preživetje ne razlikuje med bolniki z gradusi 1, 2 in 3A, medtem ko imajo bolniki z gradusom 3B statistično značilno slabše preživetje. Nedavno je Duarte s sodelavci (2013) slednje potrdil pri skupini bolnikov, starih do 40 let. Te ugotovitve nakazujejo, da je za graduse 1, 2 in 3A značilen indolenten potek bolezni, za gradus 3B pa agresiven in podoben DVCLB. Klinični pomen delitve gradusa 3 na podskupini 3A in 3B je ugotavljala Hansova s sodelavci že leta 2003 in ugotovila, da ta delitev klinično ni pomembna, saj ni bilo ugotovljenih značilnih razlik v celokupnem preživetju med skupinama kot tudi ne v kliničnih značilnostih. Vendarle pa je bilo preživetje značilno slabše in primerljivo z DVCLB pri primerih s prevladujočimi difuznimi območji (> 50 %). Naši rezultati ugotovitev Wahlina in Duarta niso v celoti potrdili, saj v svoji raziskavi bolnike z visokim gradusom nismo razdelili na podskupini 3A in 3B. Gradusa 1 in 2 smo združili ter upoštevali kot indolenten FL, gradus 3 pa v celoti kot agresiven, kar je v skladu z zadnjimi priporočili SZO in z uveljavljenimi smernicami zdravljenja malignih limfomov v Sloveniji, po katerih zdravimo skupini 3A in 3B enako. Delna neskladnost v rezultatih bi bila lahko tako posledica drugačnih kriterijev, na podlagi katerih smo oblikovali skupine bolnikov.

Rezultati naše raziskave nakazujejo, da tudi izbor začetnega zdravljenja nima vpliva na celokupno preživetje. V drugih raziskavah smo zasledili, da je vpliv tega na celokupno preživetje pogojen z razširjenostjo bolezni. Advani in sodelavci (2004) ter Wahlin in sodelavci (2012) so tako ugotovili, da pri bolnikih z indolentnim FL (stadija I, II, gradusi 1–2 oz. 3A) izbor začetnega zdravljenja ne vpliva na preživetje bolnikov in da se to ne razlikuje med bolniki, pri katerih je zdravljenje bilo inducirano, in bolnikih, ki so bili na opazovanju. Medtem ko lahko pri FL z agresivnim potekom (stadij III, IV, gradus 3/3B) izbor začetnega zdravljenja vpliva na celokupno preživetje. V raziskavi Fisherja in sodelavcev (2005) ter Hiddemanna in sodelavcev (2005) so primerjali različne začetne terapije in ugotovili statistično boljše preživetje pri tistih bolnikih z visokim stadijem bolezni, ki so bili zdravljeni s kemoterapijo v kombinaciji z R. Naše rezultate bi lahko deloma pojasnila raziskava Dava in sodelavcev (2004), ki predvideva, da so molekularne značilnosti ob času diagnoze FL tiste, ki v veliki meri določajo agresivnost bolezni in čas preživetja ter ne toliko naključne onkogenske abnormalnosti, ki nastanejo pozneje, potencialno tudi zaradi zdravljenja.

Zanimalo nas je tudi, ali stopnja izražanja CD20 vpliva na odgovor na zdravljenje z R. V analizo smo vključili 47 od 74 bolnikov, vključenih v prvi del naloge, ki so bili zdravljeni z R. Najšibkeje izražen antigen CD20 je imela skupina bolnikov s progresom bolezni, najmočnejše pa skupina bolnikov, ki je na zdravljenje z R odgovorila s popolnim odgovorom, vendar razlika ni bila statistično značilna. Podobne rezultate je dobila tudi Horvatova (2011). Izraženost antigena CD20 je bila tudi v njeni skupini bolnikov, ki je vključevala različne histološke tipe limfomov B, najmočnejša pri bolnikih, ki so po zdravljenju z R dosegli popolni ali delni odgovor, šibkejša pa pri bolnikih z progresom bolezni. V nasprotju z našimi rezultati se je v njeni raziskavi izraženost CD20 med skupinami bolnikov z različno kvaliteto odgovora na zdravljenje mejno statistično razlikovala. Za natančnejšo opredelitev intenzitete izražanja antigena CD20 kot napovednega dejavnika za zdravljenje z R smo določili mejno vrednost izražanja CD20, in sicer na način, ki ga je uporabila že Horvatova (2011). Krivulji preživetja sta se statistično značilno razlikovali pri skupinah bolnikov z izraženostjo CD20 pod in nad 20000 MESF ter 30000 MESF. Za mejno vrednost, nad katero ob zdravljenju z R pričakujemo boljši odgovor, smo izbrali 30000 MESF, ker sta v skupini bolnikov z izraženim CD20 pod 20000 MESF le 2 bolnika. Rezultati naše raziskave kažejo, da obstaja tudi mejna vrednost, nad katero ob zdravljenju z R pričakujemo boljši odgovor, nad 70000 MESF ($p = 0,058$). Odgovor na zdravljenje z R je bil značilno boljši tako pri bolnikih, ki so imeli CD20 izražen nad 20000 MESF, kot pri tistih s CD20 nad 70000 MESF. Močno statistično značilna ($p < 0,0001$) je bila razlika v celokupnem odgovoru na zdravljenje z R med skupinami bolnikov z izraženim CD20 pod mejno vrednostjo in nad njo. Statistično značilno razliko v celokupnem odgovoru na zdravljenje z R med skupinama bolnikov (pod in nad 70000 MESF) smo dokazali tudi pri tej ($p = 0,044$). Podobne rezultate je dobila tudi Horvatova v svoji raziskavi, ki je prav tako potrdila povezavo med izraženostjo CD20 in odgovorom na zdravljenje pri bolnikih z različnimi histološkimi tipi limfomov B. Povezave med trajanjem odgovora na zdravljenje in izraženostjo CD20 nismo uspeli dokazati, podobno kot Horvatova.

Povezanost izraženosti antigena CD20 z učinkovitostjo terapije z R so raziskovali tudi številni drugi. Ena prvih takih raziskav je raziskava Perzove in sodelavcev. (2002), ki te povezave pri bolnikih s KLL ni potrdila. Antigen CD20 je bil namreč najšibkeje izražen pri bolniku, ki je dosegel delni odgovor na zdravljenje, medtem ko se bolnik z močnejše izraženim CD20 na zdravljenje ni odzval. Nasprotno je pokazal Olejniczak s sod. (2006), ki je primerjal odgovor na zdravljenje z R pri bolnikih s FL in bolnikih z drobnoceličnim limfocitnim limfomom (DLL). Terapija z R je bila pri bolnikih s FL, ki imajo v primerjavi z bolniki z DLL šibkeje izražen CD20, učinkovitejša. Johnsonova s sodelavci (2009) je to povezavo potrdila tudi pri bolnikih z DVCLB in nakazala na prognostični pomen antigena CD20. Leta 2012 pa je to potrdil tudi Suzuki s sodelavci (2012), ki je ugotovil, da je CD20 pomemben neodvisen napovedni dejavnik pri bolnikih z DVCLB, zdravljenih z R. Ugotovil je, da napoveduje boljše celokupno preživetje in daljši čas trajanja remisije.

Prognostični pomen izraženosti antigena CD20 je preverjala tudi Horvatova, ki je v ta namen določila mejno vrednost izražanja CD20 pri bolnikih z različnimi histološkimi tipi limfomov B, nad katero ob zdravljenju z R pričakujemo boljši odgovor na zdravljenje. Za razliko od nas je Horvatova določila mejno vrednost pri 25000 MESF. Od skupno 114 bolnikov, zdravljenih z R, je bilo 20 (17,5 %) takih, pri katerih je izraženost antigena CD20 bila pod mejno vrednostjo – od tega 6,7 % bolnikov s FL – medtem ko jih je bilo v naši raziskavi 6 (12,8 %) od skupno 47. Ti bolniki na zdravljenje z R verjetno ne bodo odgovorili.

Do danes ostaja prognostični pomen izraženosti antigena CD20 sporen in predmet razprave. Nekatere klinične raziskave namreč nasprotujejo tem ugotovitvam in pojasnjujejo, kot povzema Horvatova, da sama vezava R na antigen CD20 ni dovolj za uničenje limfomskih celic in da so v učinkovitost tega procesa vpleteni številni drugi dejavniki, kot so lokalizacija tumorja, heterogenost izražanja CD20 med različnimi anatomskimi mesti, serumska koncentracija R in mehanizem delovanja R. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, enako kot nekateri drugi raziskovalci (Olejniczak in sod., 2006; Johnson in sod., 2009; Horvat, 2011), da močnejša izraženost antigena CD20 vpliva na boljši odgovor na zdravljenje z R in da je izraženost antigena CD20 napovedni dejavnik odgovora na zdravljenje z R (Johnson in sod., 2009; Horvat, 2011; Fang in sod. 2014). Razlike v mejni vrednosti izraženosti CD20 so najverjetneje posledica dejstev, da se intenziteta CD20 med limfomi B razlikuje in da je ta največja pri FL (in DVCLB) v primerjavi s preostalimi histološkimi tipi (Jezeršek Novaković in Benigar, 2008; Horvat, 2011; Kloboves Prevodnik in sod., 2011). Potencialno mejno vrednost pri 70000 MESF bi tako lahko pojasnili prav z močnejše izraženim CD20 na celicah FL.

Na večji skupini bolnikov s FL smo želeli preveriti, ali izraženost CD20 nad in pod mejno vrednostjo 30.000 MESF vpliva na odgovor na zdravljenje bolnikov FL. Zato smo pri 74 bolnikih, ki so bili vključeni v prvi del naloge, preverili, ali mejna vrednost izražanja CD20 nad in pod 30000 MESF vpliva na preživetje bolnikov s FL. Ti bolniki so bili zdravljeni na različne načine – z imunokemoterapijo, radioterapijo – ali pa so bili le na opazovanju. Ugotovili smo, da mejna vrednost 30000 MESF razmeji bolnike glede na preživetje ($p = 0,041$). Pri analizi preživetja brez ponovitve bolezni oziroma trajanja odgovora na zdravljenje smo ugotovili, da se krivulji preživetja sicer razkleneta, vendar se statistično značilno ne razlikujeta. Podobne rezultate smo dobili tudi za potencialno mejno vrednost 70000 MESF ($p = 0,058$). Ti rezultati se skladajo z ugotovitvami Horvatove. V nasprotju z njenimi rezultati pa nismo uspeli dokazati korelacije med izražanjem CD20 in celokupnim preživetjem. Soodvisnost izraženosti antigena CD20 ter celokupnega preživetja potrjuje tudi raziskava Jonsonove in sod. (2009), s katero so pokazali, da je preživetje značilno slabše pri bolnikih z nizko izraženostjo CD20 v primerjavi z bolniki, ki imajo CD20 močno izražen.

Naši rezultati kažejo na medsebojno povezavo izraženosti površinskega antigena CD20 ter odgovora na zdravljenje in celokupnega preživetja bolnikov s FL. Močnejše izražen antigen CD20 tako napoveduje boljši celokupni odgovor in daljše celokupno preživetje bolnikov s FL, zdravljenimi z R. Mejna vrednost izraženosti antigena CD20, ki smo jo določili pri 30000 MESF, je napovedni dejavnik, ki napoveduje boljši odgovor in preživetje, ne predvideva pa boljšega trajanja odgovora bolnikov s FL na zdravljenje z R. Mejno vrednost izraženosti antigena CD20 bi bilo treba upoštevati pri načrtovanju zdravljenja s terapijami, ki vsebujejo R.

Nazadnje nas je še zanimalo, ali mejna vrednost izražanja CD20 pri 30000 MESF ohrani svojo napovedno vrednost tudi v primerjavi z drugimi znanimi napovednimi dejavniki. Rezultati univariatne analize so pokazali, da je za našo študijsko skupino preživetje odvisno od starosti, števila linij zdravljenja in tudi od izraženosti antigena CD20. V multivariatno Coxovo analizo smo vključili le starost in izraženost antigena CD20, ne pa tudi število linij zdravljenja, saj je to posledica neugodnega poteka bolezni in ne vpliva neposredno na preživetje. Preverjali smo, ali sta starost in izražanje antigena CD20 napovedna dejavnika, s katerima bi lahko ocenili celokupno preživetje. V statistični analizi smo bolnike sprva razdelili v 5 skupin glede na starost in izraženost antigena CD20, ker so naši rezultati pokazali, da je mejna vrednost izražanja CD20 pri 30000 MESF in najverjetneje tudi pri 70000 MESF ter da je preživetje bolnikov, ki so starejši ali mlajši od 60 let, značilno različno. Zaradi majhnega števila bolnikov, ki so imeli izražen CD20 pod mejno vrednostjo 30000 MESF (11; 14,9 %) in so bili hkrati mlajši (4; 5,4 %) oz. starejši (7; 9,5 %) od 60 let, se je izkazalo, da vpliva starosti v multivariatni analizi ni mogoče oceniti z uporabo takšnih dveh starostnih skupin. Starost smo zato upoštevali kot linearno spremenljivko. Ugotovili smo, da na celokupno preživetje bolnikov s FL neodvisno vplivata oba dejavnika. Pri bolnikih s FL, ki imajo izražen antigen CD20 pod mejno vrednostjo 30000 MESF, je tveganje za neugoden potek bolezni (smrt) tako večje, medtem ko se je v multivariatni analizi izkazalo, da potencialna mejna vrednost 70000 MESF nima vpliva na preživetje. Na podlagi teh rezultatov predvidevamo, da se je pri univariatni analizi mejna vrednost pri 70000 MESF nakazovala zaradi vpliva starosti bolnikov, ki pa smo ga z multivariatno analizo izločili.

Nekatere študije so pokazale, da pri bolnikih s CLL in ALL, ki niso zdravljeni z R, povišana izraženost antigena CD20 ne vpliva na celokupno preživetje oz. je to celo povezano s slabšim preživetjem (Hsi in sod., 2003; Thomas in sod., 2009). Drugi raziskovalci so dokazali nasprotno pri bolnikih z DVCLB (Johnsonova in sod., 2009; Suzuki in sod., 2012) in tudi CLL (Fang in sod., 2013). V raziskavi Johnsonove in Fanga s sod. so podobno kot mi ugotavljali, ali je antigen CD20 neodvisen napovedni dejavnik. V ta namen so analizirali skupino bolnikov, ki je prejela R, neodvisno od skupine bolnikov, ki tega ni prejela. Johnsonova je s sod. ugotovila, da nizka izraženost antigena CD20 pri bolnikih, zdravljenih s terapijami, ki ne vsebujejo R (CHOP), prav tako prispeva

k slabšemu preživetju, in predlagala, da antigen CD20 ne služi le kot tarča za R, ampak so prisotni drugi celični mehanizmi, ki vplivajo na preživetje celic B. Predlagala je mehanizem, kjer CD20, ki deluje kot kalcijev kanalček, reagira z B-celičnim receptorjem (BCR) in na ta način modulira signalno pot in usodo celice B. Prav tako je v svoji raziskavi pokazala, da je antigen CD20 v obeh skupinah bolnikov napovedni dejavnik, ki neodvisno vpliva na preživetje. Bolniki z izraženostjo antigena nad določeno mejno vrednostjo, so tako imeli boljše celokupno preživetje kot tisti z antigenom CD20, izraženim pod mejno vrednostjo. Fang in sod. so ugotovili, da je izraženost antigena CD20 tudi pri bolnikih s CLL pomemben napovedni dejavnik.

Na podlagi rezultatov svoje raziskave lahko zaključimo, da sta starost in izraženost CD20 pod 30000 MESF napovedna dejavnika, ki statistično značilno vplivata na celokupno preživetje bolnikov s FL. Izkazalo se je tudi, da je mejna vrednost le ena, in sicer pri 30000 MESF. To bi bilo treba upoštevati pri bolnikih, zdravljenih z R, in pri tistih, ki so zdravljeni s konvencionalnimi terapijami. Prav tako pa bi bilo treba določiti mejno vrednost za posamezni tip limfoma.

V drugem delu naloge smo raziskovali, kako način zdravljenja vpliva na izražanje površinskega antigena CD20 v odvisnosti od časa. V ta namen smo spremljali spreminjanje izražanja CD20 pri 12 bolnikih, vključenih v drugi del naloge. Ugotovili smo, da se izražanje CD20 med potekom bolezni najverjetneje spreminja v določenem območju (od 55321 do 94119 MESF). Na to kažejo rezultati izražanja CD20 pri bolniku, ki ni bil zdravjen. Podobno nihanje izražanja CD20 smo opazili tudi pri bolniku, ki je bil le obsevan, le da je bil razpon nihanja večji (od 51274 do 86369). Bolniki, ki so bili zdravljeni s kemoterapijo ter imunokemoterapijo v kombinaciji z radioterapijo, pa so imeli precej širše območje, v katerem se je izražanje CD20 spreminjalo skozi čas v odvisnosti od zdravljenja. Tako je pri bolnikih, zdravljenih s kemoterapijo in imunokemoterapijo, dodatna radioterapija vplivala na povečano izražanje CD20, ki je bilo pri nekaterih bolnikih večje, pri drugih pa manjše. Ti rezultati so v skladu z rezultati nekaterih drugih raziskav, ki so pokazale, da se izražanje CD20 poveča po radioterapiji (Terui, 2009; Kunala in Macklis, 2001). Slabost naše raziskave je, da smo v študijo lahko vključili le 12 bolnikov, ker bolnikov z večkratnimi meritvami CD20 med potekom bolezni v arhivu oddelka za citopatologijo nimo našli. Težava je, da izražanja CD20 med potekom bolezni in zdravljenjem ne spremljamo sistematično, ampak le naključno glede na klinično sliko in odločitev lečečega onkologa. Ker rezultati nekaterih avtorjev nakazujejo, da je izražanje CD20 odvisno od načina zdravljenja, bi bilo smiselno naša opažanja preveriti na večji skupini bolnikov, v kateri bi izražanje CD20 spremljali sistematično, in sicer pred začetkom prvega zdravljenja, pred zdravljenjem vsake ponovitve bolezni ali če bi se med zdravljenjem odločili za spremembo terapije.

Pri bolnikih, ki so bili zdravljeni z imunokemoterapijo, smo ugotovili, da sta imela 2 bolnika ves čas zdravljenja izražen antigen CD20 pod mejno vrednostjo. Po podatkih v

literaturi ta dva bolnika najverjetneje sodita med tiste, ki na zdravljenje z R sploh ne odgovorijo in pri katerih je zdravljenje nesmiselno (Gaur in sod., 2013; Suzuki in sod., 2012). Pri treh bolnikih se je izražanje CD20 med terapijo spreminjalo, vendar v večjem območju kot pri bolniku, ki je bil le na opazovanju. Dva od teh bolnikov sta imela CD20 ves čas izražen nad mejno vrednostjo, zato predvidevamo, da sodita med tiste, pri katerih se antigen CD20 med zdravljenjem ne spreminja v tolikšni meri, da bi vplival na odgovor na zdravljenje z R. Pri tretjem bolniku je izražanje antigena CD20 med terapijo padlo pod mejno vrednost, zato predpostavljamo, da sodi med tiste bolnike, pri katerih je prišlo do klinično pomembnega zmanjšanja izražanja antigena CD20, bodisi zaradi prostih anti-CD20 protiteles ali zmanjšanega izražanja CD20 (Hiraga in sod., 2009; Miyoshi in sod., 2012; Maeshima in sod., 2009). Zato pri tem bolniku po znižanju izražanja CD20 zdravljenje z R najverjetneje ni bilo več učinkovito. Ugotovili smo tudi, da se je pri vseh bolnikih, ki so pred radioterapijo dobivali kemoterapijo, izražanje CD20 močno povečalo. Povečanje smo opazili tudi pri bolnikih, ki so pred radioterapijo prejeli imunokemoterapijo, vendar je bilo manjše. Po podatkih v literaturi so tako povezavo opazili po zdravljenju z radioterapijo (Kunala in Macklis, 2001), vendar tega pri bolniku, ki je bil le obsevan, v svoji raziskavi nismo opazili.

Naša raziskava je pokazala, da se izražanje CD20 s časom spreminja v določenem območju tudi, če bolnika ne zdravimo. Pri bolnikih, ki jih zdravimo, so ta nihanja običajno večja. Če je antigen CD20 že pred prvim zdravljenjem izražen pod mejno vrednostjo, to najverjetenje pomeni, da bo imel bolnik ves čas CD20 izražen pod mejno vrednostjo. Bolniki, ki imajo CD20 izražen nad mejno vrednostjo, lahko nimajo klinično pomembnih nihanj izražanja CD20, lahko pa se izražanje klinično pomembno zmanjša pod mejno vrednost ali pa celo poveča, če kombiniramo kemoterapijo in radioterapijo. Vse naše ugotovitve temeljijo na opazanjih posameznih bolnikov, saj se izražanje antigena CD20 med zdravljenjem ne spremlja in zato tudi nimamo podatkov. Vsekakor bi bilo naša opazanja in podobna opazanja v literaturi treba preveriti z obširnejšo raziskavo, ki bi vključevala večje število bolnikov. Da bi pridobili več podatkov, bi bilo smiselno sistematično spremljati izražanje antigena CD20 s citološko preiskavo in pretočnocitometričnimi meritvami.

6 SKLEPI

Rezultate magistrske naloge smo strnili v sklepe:

- Izražanje površinskega antigena CD20 pred začetkom zdravljenja ni odvisno od starosti, gradusa, stadija, ponovitve bolezni, števila ponovitev bolezni in od načina prvega zdravljenja.
- Eden od načinov ocene uspešnosti zdravljenja je celokupno preživetje bolnikov. Pokazali smo, da na preživetje vplivata le starost in število zdravljenj, medtem ko gradus, stadij, število ponovitev bolezni in vrsta začetnega zdravljenja na preživetje ne vplivajo. Za bolnike, mlajše od 60 let, je značilno boljše preživetje kot za starejše bolnike. Prav tako je preživetje pri bolnikih z eno linijo zdravljenja boljše kot pri bolnikih, ki so bili zdravljeni tri- ali večkrat.
- Močneje izražen površinski antigen CD20 napoveduje boljši celokupni odgovor na zdravljenje z R. Mejno vrednost, ki napoveduje boljši odgovor bolnikov s FL na zdravljenje z R, smo določili pri 30000 MESF, nakazuje pa se tudi pri 70000 MESF.
- Mejna vrednost, ki smo jo določili, razmeji bolnike glede na kvaliteto odgovora na zdravljenje in celokupno preživetje, ne vpliva pa na čas odgovora na zdravljenje z R.
- Določena mejna vrednost 30000 MESF je pomembna za preživetje vseh bolnikov, tudi tistih, ki jih nismo zdravili z R. Izražanje površinskega antigena CD20 in starost sta tako pomembna napovedna dejavnika celokupnega preživetja pri bolnikih s FL.
- Izražanje antigena CD20 se s časom spreminja v določenem območju tudi, če bolnika ne zdravimo. Pri bolnikih, ki jih zdravimo, so ta nihanja običajno večja.
- Če je stopnja izraženosti antigena CD20 pri bolniku pred začetkom zdravljenja nižja od mejne vrednosti, bo ta zelo verjetno ostala nizka ves čas. Bolniki, ki imajo CD20 izražen nad mejno vrednostjo, lahko nimajo klinično pomembnih nihanj v izražanju CD20, lahko pa se izražanje klinično pomembno zmanjša pod mejno vrednost ali pa celo poveča, če kemoterapijo ali imunokemoterapijo kombiniramo z radioterapijo.
- Sistematično spremljanje antigena CD20 s citološko preiskavo in citometričnimi meritvami pri bolnikih s FL bi prispevalo k boljšemu razumevanju nihanj v izražanju antigena CD20 in vpliva zdravljenja ali izbora terapije na to.

7 POVZETEK

V sklopu raziskav za magistrsko nalogo smo želeli raziskati izražanje antigena CD20 pri bolnikih s FL. V ta namen smo si postavili tri delovne hipoteze. Najprej smo želeli preveriti, ali na izražanje CD20 vplivajo klinično patološki dejavniki, kot so starost, bolezenski gradus, stadij, ponovitev bolezni ter izbor prvotnega zdravljenja (prva hipoteza). Želeli smo tudi preveriti, ali je izražanje antigena CD20 povezano z odgovorom na zdravljenje in ali je antigen CD20 napovedni dejavnik poteka bolezni pri bolnikih s FL (druga hipoteza). Nazadnje smo želeli preveriti, ali se stopnja izražanja antigena CD20 med zdravljenjem spreminja v odvisnosti od časa in izbora zdravljenja (tretja hipoteza).

Spreminjanje izražanja antigena CD20 smo raziskovali pri 74 bolnikih s postavljeno histološko diagnozo FL, ki so bili v obdobju med 2005 in 2011 zdravljeni na OIL. Pri vseh bolnikih je bila pred začetkom zdravljenja narejena citopatološka preiskava z IFC. V drugi del naloge smo vključili 12 bolnikov s ponovitvijo bolezni, pri katerih je bila citopatološka preiskava z IFC narejena več kot trikrat. Na podlagi rezultatov meritev vzorcev, pridobljenih z ABTI, smo semikvantitativno določili intenziteto izražanja antigena CD20. Podatke o kliničnem poteku in razširjenosti bolezni ter odzivu na zdravljenje smo za vsakega bolnika pridobili iz elektronskih popisov bolezni na OIL.

Naši rezultati so pokazali, da izražanje površinskega antigena CD20 pred začetkom zdravljenja ni odvisno od starosti, gradusa, stadija, ponovitve bolezni, števila ponovitev bolezni in od načina prvega zdravljenja. Ugotovili smo tudi, da na celokupno preživetje bolnikov s FL vplivata le starost in število zdravljenj, medtem ko gradus, stadij in izbor začetnega zdravljenja na preživetje ne vplivajo. Za bolnike, mlajše od 60 let, je tako značilno boljše preživetje kot za starejše bolnike ($p < 0,028$). Prav tako je preživetje pri bolnikih z eno linijo zdravljenja boljše kot pri bolnikih, ki so bili zdravljeni tri- ali večkrat ($p < 0,0001$). Število linij zdravljenja na preživetje oziroma izhod zdravljenja pravzaprav ne vpliva, saj je posledica neugodnega poteka bolezni in tako posredno kaže na agresiven potek bolezni ali na rezistenco na zdravljenje.

V nadaljevanju smo preverjali, ali je izražanje antigena CD20 pri bolnikih s FL povezano z odgovorom na zdravljenje z R. V ta namen smo pri 47 bolnikih iz prvega dela naloge, zdravljenih s terapijami, ki vsebujejo R, določili mejno vrednost, ki napoveduje boljši odgovor bolnikov s FL na zdravljenje z R. Mejno vrednost smo določili pri 30000 MESF. Dokazali smo, da imajo bolniki z antigenom CD20, izraženim nad mejno vrednostjo, statistično boljši celokupni odgovor na zdravljenje ($p < 0,0001$) in daljše celokupno preživetje (HR = 3,922; 95-% CI = 1,122–66,731, $p = 0,041$) od bolnikov, ki imajo antigen CD20 izražen pod mejno vrednostjo. Znotraj preučevane skupine bolnikov je bilo 12,8 % bolnikov z izraženim antigenom CD20 pod mejno vrednostjo. Nakazovala pa se je tudi potencialna mejna vrednost pri 70000 MESF. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da

je močnejše izražen antigen CD20 povezan z odgovorom na zdravljenje in s celokupnim preživetjem in je tako pomemben napovedni dejavnik za odgovor na zdravljenje pri bolnikih s FL, zdravljenih z R.

Nazadnje nas je še zanimalo, ali je mejna vrednost, ki smo jo določili, pomemben dejavnik, ki vpliva na preživetje vseh bolnikov iz prvega dela naloge, torej tudi tistih, ki jih nismo zdravili z R. V multivariatno analizo smo vključili dejavnike, ki so v univariatni analizi pokazali, da statistično značilno vplivajo na preživetje. Ugotovili smo, da na celokupno preživetje bolnikov s FL, vključenih v prvi del naloge, neodvisno vplivata oba v analizo vključena dejavnika: bolnikova starost in izraženost antigena CD20. Na podlagi rezultatov lahko sklenemo, da je pri bolnikih s FL, ki imajo izražen antigen CD20 pod mejno vrednostjo 30000 MESF, tveganje za neugoden potek bolezni (smrt) večje. V multivariatni analizi se je tudi izkazalo, da je mejna vrednost ena, in sicer pri 30000 MESF, in da potencialna mejna vrednost 70000 MESF nima vpliva na preživetje.

V drugem delu naloge smo želeli preveriti, ali se stopnja izražanja antigena CD20 med zdravljenjem spreminja v odvisnosti od časa in izbora zdravljenja. V ta namen smo opazovali spreminjanje CD20 pri 12 bolnikih, vključenih v drugi del naloge. Ugotovili smo, da se izražanje antigena CD20 s časom spreminja v določenem območju, tudi če bolnika ne zdravimo, v primeru zdravljenja pa so ta nihanja večja. Iz rezultatov lahko sklepamo tudi, da če je pri bolniku antigen CD20 izražen pod mejno vrednostjo, bo izraženost tega ves čas šibka, torej pod mejno vrednostjo, ne glede na izbor zdravljenja. Pri bolnikih z antigenom CD20, izraženim nad mejno vrednostjo pred začetkom zdravljenja, pa lahko ti nimajo klinično pomembnih nihanj v izražanju CD20, lahko pa se to zmanjša pod mejno vrednost ali v primeru zdravljenja s kombinacijo kemoterapije ali imunokemoterapije in radioterapije celo poveča. Naše ugotovitve sicer temeljijo na opazovanju posameznih bolnikov, zato bi bilo treba naša opažanja preveriti na večjem vzorcu bolnikov.

Rezultati naše raziskave so potrdili dve od treh postavljenih hipotez. Kljub temu ostaja izražanje antigena CD20 precej neraziskano, prav tako tudi molekularni mehanizmi. Za boljše razumevanje sprememb v izražanju antigena CD20 bi bilo treba opraviti več podobnih kliničnih študij na večjem vzorcu bolnikov. To bi lahko pripomoglo k boljšemu načrtovanju zdravljenja bolnikov s FL in lažji ter natančnejši ocenitvi uspeha zdravljenja.

8 VIRI

- Adams GP, Weiner LM. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature biotechnology*, 2, 39: 1147–1157
- Advani R, Rosenberg SA, Horning SJ. 2004. Stage I and II follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of no initial therapy. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22, 8: 1454–1459
- Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. 2006. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *Journal of immunology*, 176, 4: 2600–2609
- Bonavida B. 2007. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene*, 26, 25: 3629–3636
- Bonavida B. 2014. Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance. *Seminars in oncology*, 41, 5: 667–677
- Cheson BD. 2008a. New response criteria for lymphomas in clinical trials. *Annals of oncology*, 19, Suppl 4: iv35–38
- Cheson BD. 2008b. New staging and response criteria for non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Radiologic clinics of North America*, 46, 2: 213–223
- Cheson BD, Leonard JP. 2008. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine*, 359, 6: 613–626
- Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. 2005. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Current directions in autoimmunity*, 8: 140–174
- Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM and others. 2004. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *The New England journal of medicine*, 351, 21: 2159–2169
- DeVita V., Hellman S., Rosenberg S. 2009. *Cancer principles & Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins: 3151 str.

- Decaudin D, Lepage E, Brousse N, Brice P, Harousseau JL, Belhadj K, Tilly H, Michaux L, Cheze S, Coiffier B and others. 1999. Low-grade stage III-IV follicular lymphoma: multivariate analysis of prognostic factors in 484 patients--a study of the groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte. *Journal of clinical oncology*, 17, 8: 2499–2505
- Dragoš M., Germovnik T., Abazović M. 2013. O pravilni in varni uporabi zdravil: Biološka zdravila. Slovensko farmacevtsko društvo, Sekcija farmacevtov javnih lekarn.
<http://www.sfd.si/modules/catalog/products/prodfile/knjizica2013www.pdf> (januar 2015)
- Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, Huo S, Guo Y, Ding J. 2007. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *The Journal of biological chemistry*, 282, 20: 15073–15080
- Duarte IX, Domyeny-Duarte P, Wludarski SC, Natkunam Y, Bacchi CE. 2013. Follicular lymphoma in young adults: a clinicopathological and molecular study of 200 patients. *Modern pathology*, 26, 9: 1183–1196
- Fang C, Zhuang Y, Wang L, Fan L, Wu YJ, Zhang R, Zou ZJ, Zhang LN, Yang S, Xu W and others. 2013. High levels of CD20 expression predict good prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer science*, 104, 8: 996–1001
- Fisher RI, LeBlanc M, Press OW, Maloney DG, Unger JM, Miller TP. 2005. New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology*, 23, 33: 8447–8452
- Freedman A. 2014. Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management. *American journal of hematology*, 89, 4: 429–436
- Gaur S, Padilla O, Nahleh Z. 2013. Clinical Features and Prognosis of CD20 Negative Aggressive B-Cell Non-Hodgkins Lymphoma. *Lymphoma*, 2013: 5
- Hans CP, Weisenburger DD, Vose JM, Hock LM, Lynch JC, Aoun P, Greiner TC, Chan WC, Bociak RG, Bierman PJ and others. 2003. A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. *Blood*, 101, 6: 2363–2367
- Hiddemann W, Cheson BD. 2014. How we manage follicular lymphoma. *Leukemia*, 28, 7: 1388–1395
- Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, Reiser M, Metzner B, Harder H, Hegewisch-Becker S and others. 2005. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine,

and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*, 106, 12: 3725–3732

Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, Kiyoi H, Kinoshita T, Naoe T. 2009. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood*, 113, 20: 4885–4893

Horvat M, Kloboves Prevodnik V, Lavrencak J, Jezersek Novakovic B. 2010. Predictive significance of the cut-off value of CD20 expression in patients with B-cell lymphoma. *Oncology reports*, 24, 4: 1101-1107

Horvat M., 2011. Povezanost izražanja površinskih antigenov CD20 in CD52 pri limfoproliferativnih boleznih z razširjenostjo bolezni in uspešnostjo zdravljenja. Doktorska dizertacija, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 91 str.

Hsi ED, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Boldt D, Frey T, Loftus M, Hussein MA. 2003. Prognostic significance of CD38 and CD20 expression as assessed by quantitative flow cytometry in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*, 120, 6: 1017–1025

Jaffe E. S., Harris N. L, Vardiman J. W., Campo E., Arber D. A. 2011. *Hematopathology*. Missouri, Elsevier Inc.: 1072 str.

Jezeršek Novaković B., Kotnik V., Južnič Šetina T., Vovk M., Novaković S. 2007. Testing of mechanisms of action of rituximab and clinical results in high-risk patients with aggressive CD20+ lymphoma. *Radiology and Oncology*, 41, 1: 23–32

Jezeršek Novaković B., Benigar A. 2008. Zdravljenje Nehodgkinovih limfomov z rituksimabom. *Onkologija*, 1: 17–25

Jezeršek Novaković B. 2011. Smernice za obravnavo bolnikov z malignimi limfomi. Onkološki inštitut Ljubljana. http://www.onko-i.si/uploads/media/Doktrina_2011.pdf (20. marec 2014)

Jezeršek Novaković B. 2013. Maligni limfomi: Knjižica za bolnike in svoje. Onkološki inštitut Ljubljana http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/Publikacije/maligni_limfom-koncna_verzija_01.pdf (januar 2015)

Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, Leach S, Brooks-Wilson A, Sehn LH, Chhanabhai M, Brinkman RR, Connors JM, Weng AP and others. 2009. Diffuse large B-cell

lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood*, 113, 16: 3773–3780

Juweid ME, Wiseman GA, Vose JM, Ritchie JM, Menda Y, Wooldridge JE, Mottaghy FM, Rohren EM, Blumstein NM, Stolpen A and others. 2005. Response assessment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma by integrated International Workshop Criteria and fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Journal of clinical oncology*, 23, 21: 4652–4661

Kloboves-Prevodnik V, Fležar M, Pohar-Marinšek Ž. 2004. Improved method for flow cytometric immunophenotyping of FNAB samples (abstract). XXII ISAC International congress. Montpellier: International society for analytical cytology, 14 str.

Kloboves Prevodnik V. 2010. Citopatološka diagnostika limfomov iz vzorca bezgavk. *Onkologija*, 2: 139–143

Kunala S, Macklis RM. 2001. Ionizing radiation induces CD20 surface expression on human B cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 96, 3: 178–181

Maartense E, Le Cessie S, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM, Snijder S, Wijermans PW, Noordijk EM. 2002. Age-related differences among patients with follicular lymphoma and the importance of prognostic scoring systems: analysis from a population-based non-Hodgkin's lymphoma registry. *Annals of oncology*, 13, 8: 1275–1284

Maeshima AM, Taniguchi H, Nomoto J, Maruyama D, Kim SW, Watanabe T, Kobayashi Y, Tobinai K, Matsuno Y. 2009. Histological and immunophenotypic changes in 59 cases of B-cell non-Hodgkin's lymphoma after rituximab therapy. *Cancer science*, 100, 1: 54–61

Maloney DG, Smith B, Rose A. 2002. Rituximab: mechanism of action and resistance. *Seminars in oncology*, 29, 1 Suppl 2: 2–9

Mann RB, Berard CW. 1983. Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematological oncology*, 1, 2: 187–192

Miyoshi H, Arakawa F, Sato K, Kimura Y, Kiyasu J, Takeuchi M, Yoshida M, Ichikawa A, Ishibashi Y, Nakamura Y and others. 2012. Comparison of CD20 expression in B-cell lymphoma between newly diagnosed, untreated cases and those after rituximab treatment. *Cancer science*, 103, 8: 1567–1573

- Novaković S., Hočevar M., Jezeršek Novaković B., Strojan P., Žgajnar J. 2009. Maligni limfomi. V: *Onkologija: Raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Ljubljana, Mladinska knjiga: 374–380
- Olejniczak SH, Stewart CC, Donohue K, Czuczman MS. 2006. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunological investigations*, 35, 1: 93–114
- Pedersen AE, Jungersen MB, Pedersen CD. 2011. Monocytes mediate shaving of B-cell-bound anti-CD20 antibodies. *Immunology*, 133, 2: 239–245
- Perz J, Topaly J, Fruehauf S, Hensel M, Ho AD. 2002. Level of CD 20-expression and efficacy of rituximab treatment in patients with resistant or relapsing B-cell prolymphocytic leukemia and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 43, 1: 149–151
- PMTLinearity C Record software. Spherotech, Illinois, USA.
<http://www.spherotech.com/Updated%20STN%208-21-07/STN-9%20Rev%20D.pdf> (november 2014)
- Rak v Sloveniji 2011. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2015.
http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2011.pdf (januar 2015)
- Rezvani AR, Maloney DG. 2011. Rituximab resistance. *Best practice & research Clinical haematology*, 24, 2: 203–216
- Schwartz A, Gaigalas AK, Wang LL, Marti GE, Vogt RF, Fernandez-Repollet E. 2004. Formalization of the MESF unit of fluorescence intensity. *Cytom Part B-Clin Cy*, 57B, 1: 1–6
- Smith MR. 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 22, 47: 7359–7368
- Sun T. 2008. *Flow cytometry and immunohistochemistry for hematologic neoplasms*. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins: 335 str.
- Suzuki Y, Yoshida T, Wang G, Togano T, Miyamoto S, Miyazaki K, Iwabuchi K, Nakayama M, Horie R, Niitsu N and others. 2012. Association of CD20 levels with clinicopathological parameters and its prognostic significance for patients with DLBCL. *Annals of hematology*, 91, 7: 997-1005

- Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L., Jaffe E. S., Pileri S. A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. 2008. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. WHO
- Štrukelj B. 2007. Razvoj, delitev in vloga bioloških zdravil. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (eds). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 7–23
- Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sakurai T, Mishima Y, Kuniyoshi R, Taniyama A, Yokoyama M, Sakajiri S and others. 2009. Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical cancer research*, 15, 7: 2523–2530
- Thomas DA, O'Brien S, Jorgensen JL, Cortes J, Faderl S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Koller C, Pierce S, Huh Y and others. 2009. Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113, 25: 6330–6337
- Vitolo U, Ferreri AJ, Montoto S. 2008. Follicular lymphomas. *Critical reviews in oncology/hematology*, 66, 3: 248–261
- Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, Holte H, Delabie J, Smeland EB, Sundstrom C, Christensson B, Sander B. 2012. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *British journal of haematology*, 156, 2: 225–233
- Winiarska M, Glodkowska-Mrowka E, Bil J, Golab J. 2011. Molecular mechanisms of the antitumor effects of anti-CD20 antibodies. *Frontiers in bioscience*, 16: 277–306
- Zola H. 2001. Human leukocyte differentiation antigens as therapeutic targets: the CD molecules and CD antibodies. *Expert opinion on biological therapy*, 1, 3: 375–383

Mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko

Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko je 2. 7. 2014 načrt raziskave odobrila kot etično sprejemljiv (št. 70/06/14).

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se zahvalila somentorici doc. dr. Veroniki Kloboves-Prevodnik. Hvala Vam za strokovno pomoč, nasvete in usmeritve pri izdelavi magistrskega dela. Zahvaljujem se tudi preostalim zaposlenim na Oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani, predvsem enoti za pretočno citometrijo. Iskrena hvala mentorici prof. dr. Maji Čemažar za podporo, razumevanje in hiter pregled magistrskega dela. Hvala tudi članoma komisije prof. dr. Roku Kostanjšku za hiter pregled magistrskega dela in doc. dr. Jasni Dolenc Koče.

Za veliko mero spodbude, podpore, razumevanja, kot tudi smeha in zabave tekom študija, se zahvaljujem vsem prijateljem, ki so mi ves čas stali ob strani. Hvala, da ste verjeli vame.

Veliko zahvalo dolgujem svojim staršem za njihovo neomajno podporo tekom študija in potrpežljivost ob nastajanju magistrskega dela. Nenazadnje se zahvaljujem tudi bratu, ki me je prvi seznanil z znanostjo in navdušil nad študijem biologije.

Posebej se zahvaljujem tebi, dragi Rihard in ti posvečam to magistrsko delo.