

VILNIUS UNIVERSITY
INSTITUTE OF ONCOLOGY

Viktoras Sidorovas

**STUDY OF PROGNOSTIC AND PREDICTIVE FACTORS IN
CUTANEOUS MELANOMA**

Doctoral Dissertation Summary

Biomedical Sciences, Medicine (07 B, cytology, oncology, cancerology - B200)

Vilnius, 2009

Dissertation was prepared at Institute of Oncology, Vilnius University over the period of
2004 - 2008.

Scientific Supervisor:

dr. Dainius Characiejus (Institute of Immunology, Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 07 B, cytology, oncology, cancerology - B200)

Dissertation will be defended at the Medical Science Council of Vilnius University:

Chairman:

prof. dr. habil. Vytas Tamošiūnas (Institute of Immunology, Vilnius University, biomedical sciences, biology - 01B, immunology, serology, transplantation - B500)

Members:

prof. dr. habil. Laima Liudvika Griciūtė (Institute of Oncology, Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 07 B, cytology, oncology, cancerology - B200)

prof. dr. Vida Kirvelienė (Vilnius University, biology - 01B, cytology, oncology, cancerology - B200)

doc. dr. Skaidra Valiukevičienė (Kaunas University of Medicine, biomedical sciences, medicine – 07 B, cytology, oncology, cancerology - B200)

prof. dr. habil. Alvydas-Pranas Laiškonis (Kaunas University of Medicine, biomedical sciences, medicine – 07 B, infectology - B510)

Opponents:

doc. dr. Rimantas Žalinkevičius (Kaunas University of Medicine, biomedical sciences, medicine – 07 B, endocrinology - B480)

doc. dr. Matilda Bylaitė (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 07B, cytology, oncology, cancerology - B200)

The public defence of the dissertation will be held at Medical Science Council of Vilnius University, at the Great Hall of the Research centre of Institute of Oncology, Vilnius University, at 3.00 p.m. on 2 of June 2009.

Address: P. Baublio g 3b., Vilnius, Lithuania

The summary of the doctoral dissertation was sent on 30 of april 2009.

The dissertation is available at the library of Vilnius University and Institute of Oncology, Vilnius University

VILNIAUS UNIVERSITETAS
ONKOLOGIJOS INSTITUTAS

Viktoras Sidorovas

**ODOS MELANOMOS PROGNOZINIŲ IR PREDIKTYVINIŲ FAKTORIŲ
TYRIMAS**

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, medicina (07 B, citologija, onkologija, kancerologija – B200)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2004-2008 metais Vilniaus universiteto Onkologijos institute.

Mokslinis vadovas:

dr. Dainius Characiejus (Vilniaus universiteto Imunologijos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, citologija, onkologija, kancerologija – B200)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

prof. habil. dr. Vytas Tamošiūnas (Vilniaus universiteto Imunologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija - 01B, imunologija, serologija, transplantologija – B500)

Nariai:

prof. habil. dr. Laima Liudvika Gričiūtė (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, citologija, onkologija, kancerologija – B200)

prof. dr. Vida Kirvelienė (Vilniaus Universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, citologija, onkologija, kancerologija – B200)

doc. dr. Skaidra Valiukevičienė (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B, citologija, onkologija, kancerologija – B200)

prof. habil. dr. Alvydas-Pranas Laiškonis (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B, infektologija - B510)

Oponentai:

Doc. dr. Rimantas Žalinkevičius (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B, endokrinologija - B480)

Doc. dr. Matilda Bylaitė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B, citologija, onkologija, kancerologija – B200)

Disertacija bus ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2009 m. birželio mėn. 2 d. 15.00 val. Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Mokslinių tyrimų centre I aukšto Didžiojoje salėje.

Adresas: P. Baublio g 3b., Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2009 m. balandžio mėn. 30 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Vilniaus universiteto Onkologijos instituto bibliotekose.

INTRODUCTION

Adjuvant treatment with interferon-alpha (INF- α) of melanoma patients with resected regional lymph node metastases prolongs the progression-free survival, whereas evidence concerning the overall survival remains controversial (1).

Ten-year survival of patients with of cutaneous non-metastatic melanoma (stage I-II) is from 33% to 88%. Therefore, adjuvant treatment is necessary for these patients (2,3). Initial results have shown that adjuvant immunotherapy may prolong progression-free and overall survival of non-metastatic melanoma patients. However, these findings were not confirmed by other authors (1, 4, 5, 6).

The survival of melanoma patients treated with INF- α may depend on prognostic factors, one of them being proliferative index Ki-67. Ki-67 is the protein found in cell nucleus and detectable in all cell cycle phases except G0. Ki-67 shows the proliferative activity and so-called growth fraction of a tumour (7). The tumour growth fraction (proportion of actively proliferating cells in the whole cell population) has a prognostic significance in many types of cancer. Some evidence suggests the prognostic importance of Ki-67 index in melanoma (8,9). The association between Ki-67 index and disease progression in patients with deep infiltration of primary melanoma has been reported (10)

Melanoma is regarded as a malignant tumour that depends on the immune system. The risk of developing this form of cancer increases with suppressed immune system. Immunotherapy (cytokines) is used for treatment of melanoma patients. However, despite numerous immunologic studies have been performed with melanoma patients, no reliable immunologic parameters predicting the course of the disease and the efficacy of immunotherapy have yet been determined.

THE AIM OF THE STUDY

The aim of the study was to explore the prognostic and predictive significance of the proliferative index Ki-67 and changes of T lymphocyte subsets in non-metastatic melanoma patients.

OBJECTIVES

1. To explore the significance of proliferative index Ki-67 of the primary tumour for patient survival and for the efficacy of treatment with IFN- α .
2. To explore changes of peripheral blood T lymphocyte subsets characteristic for patients with non-metastatic melanoma.
3. To examine the relationship between the growth fraction of primary melanoma tumour (Ki-67 index) and the peripheral blood T lymphocyte subsets.

DEFENDED STATEMENTS

1. Proliferative index Ki-67 has no prognostic significance for survival of non-metastatic melanoma patients with tumour thickness of ≥ 1.5 mm.
2. Treatment with IFN- α does not prolong survival of unselected non-metastatic melanoma patients.
3. Survival of IFN- α treated non-metastatic melanoma patients depends on proliferative index Ki-67 of the primary tumour.
4. In patients with non-metastatic melanoma, changes in levels of peripheral blood T lymphocyte subsets can be determined.

SCIENTIFIC NOVELTY

For the first time, the relationship between proliferative potential of primary melanoma tumors and survival of IFN- α treated patients has been studied. It was shown that primary melanoma patients whose tumours had Ki-67 index $< 16\%$ survived significantly longer after IFN- α treatment than patients whose tumours had Ki-67 index $\geq 16\%$. For the first time, levels of peripheral blood T lymphocyte subsets in primary melanoma patients were studied in more detail. In particular, statistically significant differences in CD8^{high}CD57⁻ and CD8^{low} lymphocytes between patients and control subjects were determined. It was observed for the first time, that peripheral blood levels of these lymphocyte subsets undergo unidirectional changes after removal of tumours

with Ki-67 index $\geq 16\%$.

MATERIALS AND METHODS

To investigate the significance of the proliferative index Ki-67, a retrospective analysis was performed with 80 patients, in whom primary non-metastatic melanoma was diagnosed at the Institute of Oncology, Vilnius University during 2000-2002. The patients were examined according to guidelines, approved at the Institute of Oncology, Vilnius University. The permission of Lithuanian Committee of Bioethics was obtained to perform this study. The inclusion criteria were as follows: primary histologically confirmed skin melanoma, tumour thickness of $\geq 1,5$ mm, no regional or distant metastases, absence of any other tumour in other localisations. Adjuvant treatment with IFN- α was administered to 33 of these patients. IFN- α was injected intra-muscularly from 3 MIU to 18 MIU three times per week, starting within two months after surgical treatment. The duration of IFN- α treatment was from 23 to 1124 days, median 269 days. The reasons for treatment discontinuation included disease progression, poor tolerance, or patient's refusal of such treatment. The survival data of the patients were obtained from the Lithuanian Cancer Registry. The treated patients group (n=33) was compared to that of the non-treated patients (n=47). The main characteristics of the patients are presented in Table 1.

Table 1.

Characteristics of patients with non-metastatic melanoma, treated and not treated with IFN- α

<i>Characteristics</i>	<i>Treated with IFN-α</i> <i>(n=33)</i>	<i>Not treated with IFN-α</i> <i>(n=47)</i>
Age: median, range	60, 17-81	61, 34-89
Sex (males/females)	15/18	9/38
Localisation:		
Head – neck	1	9
Waist	16	12

Extremities	16	26
Tumour thickness (<i>Breslow</i>)		
1,5-4 mm	18	33
> 4 mm	15	14
Tumour infiltration (<i>Clark</i>)		
III	9	21
IV	22	20
V	2	6

A prospective study was performed to explore the immunological parameters. The immunological parameters were analysed in 27 patients who had been diagnosed with non-metastatic melanoma at the Institute of Oncology, Vilnius University during the period of 2006 – 2007. The permission of Lithuanian Bioethics Committee was obtained to perform the study. The inclusion criteria were the following: primary histologically confirmed skin melanoma (pTis- pT4N0M0) without any regional or distant metastases, absence of other malignant tumour in other localisations. Main characteristics of these patients are presented in Table 2.

Table 2.

Characteristics of the prospective patient group

<i>Characteristics</i>	<i>Number</i>
Number of patients	27
Sex	
Males	5
Females	22
Age (in years)	
Median	52
Range	24-85

Tumour thickness (<i>Breslow</i>)	
≤1 mm	10
>1≤2 mm	7
>2<4 mm	6
≥4 mm	4

The immunologic parameter values of patients were compared with those of the control group. The control group consisted of 39 subjects without any known oncological or autoimmune diseases. Table 3 shows the main characteristics of subjects of the control group.

Table 3.

Characteristics of subjects of the control group

<i>Characteristics</i>	<i>Number</i>
Number	39
Sex	
Males	19
Females	20
Age (in years)	
Median	58,5
males	59,5
females	52
Range	37-84
males	41-84
females	37-82
Healthy blood donors	11
Suffering from inactive forms of cardiovascular diseases	17
Suffering from calcuosis	4

Patients with vertebral and joint pathology*	3
Others**	5

* 1 patient with periarthritis, 1 with arthrosis and 1 complaining of vertebral pain;

** 2 female patients with benign ovarian cysts, 1 male patient with a benign prostate adenoma and 1 female patient with anemia

Ki-67 protein expression was determined using immunohistochemical method. The analysis of peripheral blood lymphocytes was performed using flow cytometry. Statistical analysis of the data was performed using STATISTICA programme, version 7.

The survival of patients was calculated from the date of the diagnosis to the patient's death or the last date with the evidence available that the patient is alive. The follow-up of patients was carried out with the help of Lithuanian Cancer Registry. The survival of the groups was analysed using Kaplan-Meier method. The differences between the survival curves were evaluated by Log-rank test. The impact of other factors on the survival duration was assessed by means of Cox's model. The immunologic parameters of patients were compared with the corresponding parameters of the control group individuals. The statistic significance was estimated by Student t-criterion.

RESULTS AND DISCUSSION

The survival was analysed in 80 patients with non-metastatic melanoma. No significant difference was observed between the survival of patients treated with IFN- α and non-treated with IFN- α (Figure 1). The median survival in both groups of patients was not reached at the time of analysis.

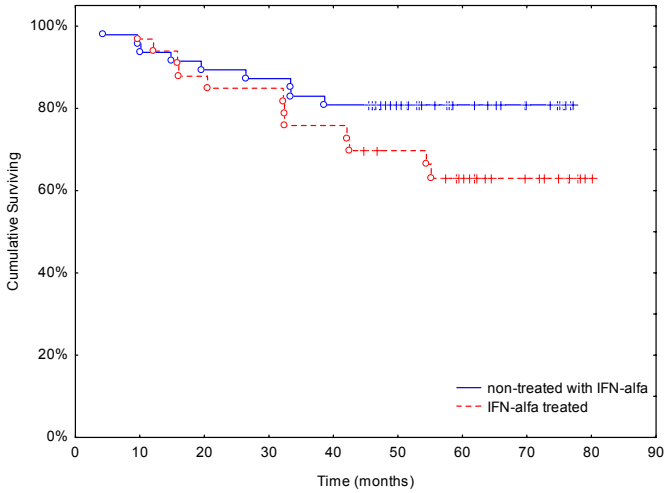


Figure 1. Kaplan-Meier survival curves of patients with non-metastatic melanoma treated with IFN- α ($n=33$) and non-treated with IFN- α ($n=47$) ($p=0.14$).

Proliferative index Ki-67 in primary tumours had no significant prognostic value in melanoma patients non-treated with IFN- α , tumour thickness ≥ 1.5 mm (Figure. 2)

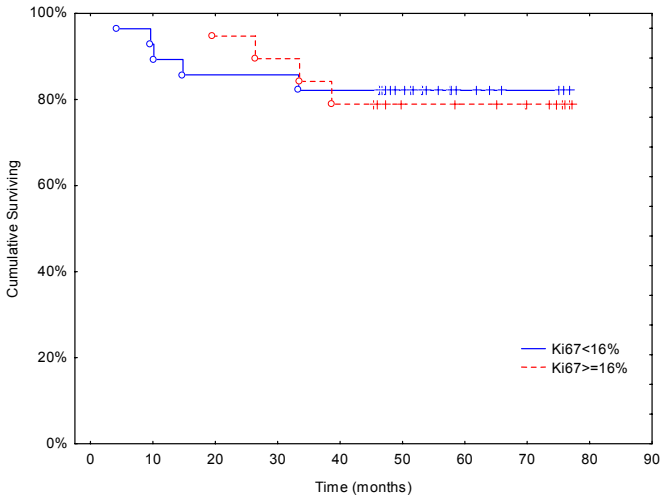


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves of non-metastatic melanoma patients non-

treated with IFN- α and with tumour proliferative marker Ki-67 expressed in $<$ or $\geq 16\%$ tumour cells ($p=0.89$).

The survival of IFN- α non-treated non-metastatic melanoma patients with Ki-67 expressed in $<16\%$ tumour cells showed no significant difference from those patients with the tumour proliferative index Ki-67 $\geq 16\%$. The survival median in both groups of patients was not reached, whereas the median follow-up was 26.7 months for patients whose Ki-67 was expressed in $<16\%$ cells and 20.2 months for those patients whose proliferative marker Ki-67 was expressed in $\geq 16\%$ malignant cells. However, survival of IFN- α treated non-metastatic melanoma patients with Ki-67 expressed in $<16\%$ cells was longer than that of patients with Ki-67 expressed in $\geq 16\%$ cells (Figure 3).

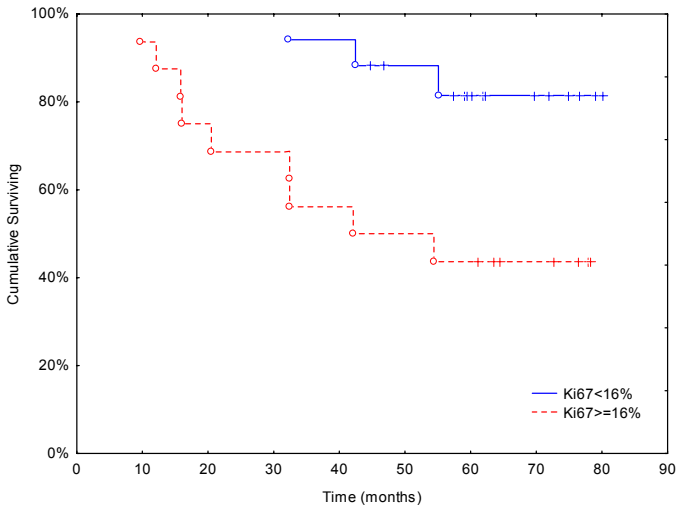


Figure 3. Kaplan-Meier survival curves of IFN- α treated patients with non-metastatic melanoma, with tumour proliferation index Ki-67 $<$ or $\geq 16\%$ ($p=0.016$).

The survival median was not reached in IFN- α treated patients with non-metastatic melanoma whose proliferation index Ki-67 in tumours was $<16\%$ (median follow-up – 41.2 months), whereas in patients, whose tumours showed proliferation index Ki-67 $\geq 16\%$ the survival median was 48.2 months.

The patients' follow-up time was too short to determine the survival differences

between the IFN- α treated patients and those not treated with IFN- α with tumour thickness < 4 mm. Nevertheless, IFN- α treated patients with tumour thickness ≥ 4 mm and proliferative index Ki-67<16% showed a trend for prolonged survival, compared to non-treated patients (data not shown in the summary, p=0.27). In contrast, IFN- α treated patients with tumour thickness < 4mm and proliferative index Ki-67 $\geq 16\%$ survived a shorter period than non-treated patients (Figure 4).

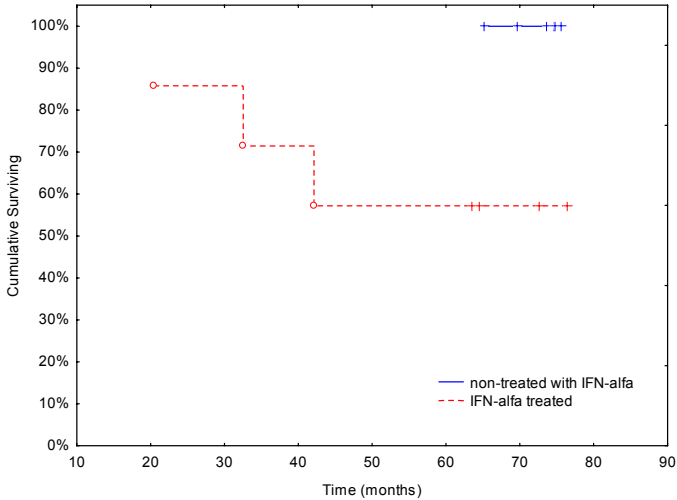


Figure 4. Kaplan-Meier survival curves of IFN- α treated (n=7) and non-treated with IFN- α (n=5) patients with melanoma whose tumour proliferative index Ki-67 was $\geq 16\%$ (p=0.08). Tumour thickness < 4 mm.

The investigation of immunological parameters showed that the peripheral blood of melanoma patients contained a lower levels of monocytes (p=0.0002) as well as of cytotoxic T lymphocytes CD8^{high}CD57⁻ compared to healthy controls (p=0.009). Patients had significantly higher counts of CD4⁺ (p=0.02) and CD8^{low} (p=0.04) lymphocytes compared to healthy controls (Figures 5-7).

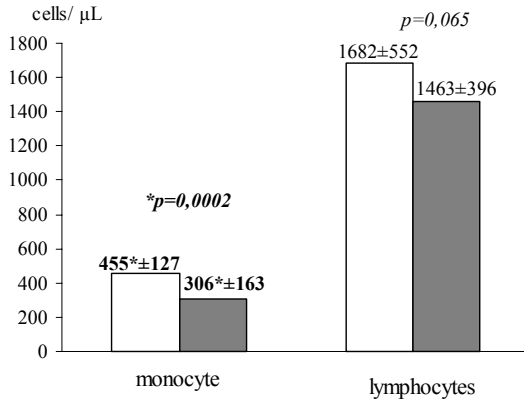


Figure 5. Counts of lymphocytes and monocytes in peripheral blood of melanoma patients (dark columns) and control group (white columns)

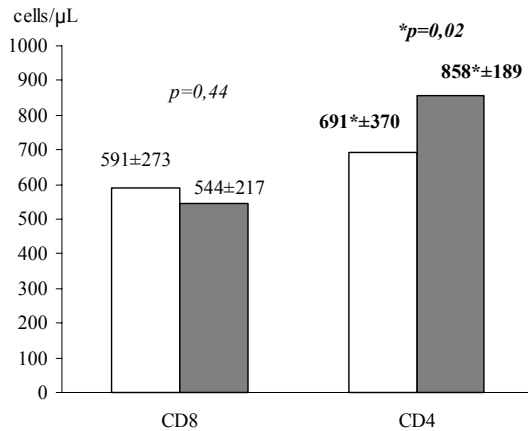


Figure 6. T lymphocyte counts in peripheral blood of melanoma patients (dark columns) and control group (white columns)

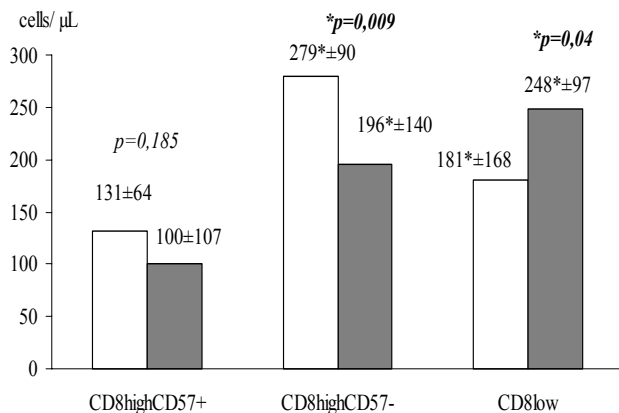


Figure 7. Subsets of CD8⁺ lymphocytes in peripheral blood of melanoma patients (dark columns) and control group (white columns)

Taking into account that the malignant tumours of our investigated patients were comparatively small, the identified alterations of the immune system are not likely to be triggered by a malignant tumour process. On the contrary, we assume that these alterations of the immune system conditioned the formation or the development of malignant tumours.

The investigation of proliferative index Ki-67 revealed its predictive significance for IFN- α -treated patients with non-metastatic melanoma. Considering the influence of IFN- α on the immune system as one of its major mechanisms of action, the relationship between the proliferative index Ki-67 in the tumour and the immune system was investigated. To this aim, the state of the immune system was investigated before and after surgical removal of the tumour. The data obtained showed that with high expression of Ki-67 in tumours ($\geq 16\%$), immune system changes before and after surgery followed one direction: percentage of CD8^{high}CD57⁺ lymphocytes in CD8⁺ lymphocyte population increased in all study patients (n=5), whereas counts of CD8^{low} lymphocytes decreased in all the patients (n= 5).

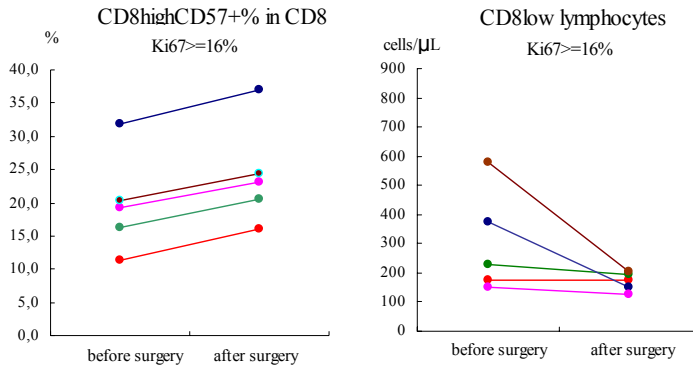


Figure 8. Changes in CD8^{high}CD57⁺ and CD8^{low} lymphocyte subsets in non-metastatic melanoma patients after surgery of primary tumour with proliferative index Ki-67 ≥ 16%

In contrast, in case of Ki-67 expression in tumours <16% the observed immune system response was not of one direction. Among lymphocyte subpopulations after the removal of melanoma tumour, both increased and decreased expressions were observed. This proves that the immune system undoubtedly responds to melanoma tumours of large proliferation (Ki-67 ≥ 16%). We assume that in case of a smaller tumour growth fraction (Ki-67 < 16%), influence on the immune system of other factors may predominate.

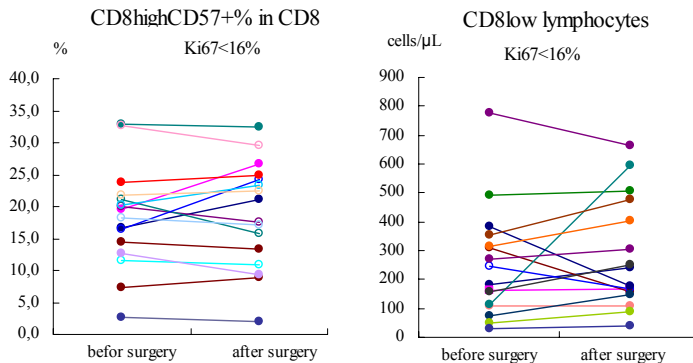


Figure 9. Changes in CD8^{high}CD57⁺ and CD8^{low} lymphocyte subsets in non-

metastatic melanoma patients after surgery of primary tumour with proliferative index Ki-67<16%

The results of our study revealed statistically significantly shorter survival of patients treated with IFN- α with Ki-67 \geq 16%. According to our findings, patients with Ki-67 \geq 16% showed increasing levels of cytotoxic CD8highCD57+ lymphocytes and decreasing levels of dysfunctional CD8low lymphocytes. We assume that after the tumour removal the enhancement of the immune system takes place. We believe that in such patients the administration of IFN- α disrupts the automatic regulation mechanisms of the immune system and may have adverse impact on the efficacy of the treatment.

CONCLUSIONS

1. Ki-67 proliferative index has no prognostic significance in non-metastatic melanoma patients with tumour thickness \geq 1.5 mm.
2. Ki-67 proliferative index has a predictive significance in IFN- α -treated non-metastatic melanoma patients.
3. In patients with non-metastatic melanoma a statistically significant decrease in monocytes and CD8highCD57- lymphocytes and increase in CD4+ and CD8low lymphocytes compared to healthy controls is observed.
4. In patients with non-metastatic melanoma the tumour growth fraction (determined by Ki-67 expression) may influence changes in T lymphocyte subsets after surgical treatment.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

Adjuvant treatment with IFN- α should not be recommended for non-metastatic melanoma patients with tumour thickness \geq 1,5 mm, and especially for patients with highly proliferating tumours (Ki-67 proliferative index \geq 16%).

PRESENTATIONS

“Predictive value of proliferative index Ki-67 in treatment of non-metastatic

melanoma patients with interferon-alfa”, 18 April 2008. The National Conference of Lithuanian Dermatovenerologists “Innovations in managing inflammatory and malignant cutaneous diseases”, Vilnius.

RERERENCES

1. Lens M. B., Dawes M. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Journal of Clinical Oncology*, 2002; 20: 1818-25.
2. Balch C. M., Buzaid A. C., Song S.-J., et al. Final version of the American joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2001; 19: 3635-48.
3. Balch C. M., Buzaid A. C., Atkins M. B., et al. A new American joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer*, 2000; 88: 1484-91.
4. Rusciani L., Petraglia S., Alotto M., et al. Postsurgical adjuvant therapy for melanoma. *Cancer*, 1997; 79: 2354-60.
5. Hancock B. W., Wheatley K., Harris S., et al. Adjuvant interferon in high-risk melanoma: The AIM HIGH study - United Kingdom coordinating committee on cancer research randomized study of adjuvant low-dose extended-duration interferon alfa-2a in high-risk resected malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2004; 22: 53-61.
6. Grob J. J., Dreno B., de la Salmoniere P., et al: Randomised trial of interferon α -2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1,5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet*, 1998; 351: 1905-10.
7. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the know and the unknown. *J. Cell Physiol.* 2000; 182: 311-22
8. Carlson J. A., Slominski A., Linette G. P., et al. Biomarkers in melanoma: predisposition, screening and diagnosis. [Expert Review of Molecular Diagnostics](#), 2003; 3: 89-110.

9. Ostmeier H., Fuchs B., Otto F., et al. Prognostic immunohistochemical markers of primary human melanomas. *Br. J Dermatol.*, 2001; 145: 203-9.
10. Boni R., Doguoglu A., Burg., et al. MIB-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanoma. *J of the American Academy of Dermatology*, 1996; 35:416-418.

IVADAS

Sergantiems melanoma pacientams, kuriems buvo pašalintos metastazės sritiniuose limfmazgiuose, adjuvantinis gydymas alfa interferonu (IFN- α) prailgina laikotarpį iki ligos progresavimo pradžios, o duomenys apie bendrojo išgyvenimo pailgėjimą yra prieštaringi (1). 10 metų išgyvena 33-88% neišplitusia melanoma (I-II ligos stadija) sergančių pacientų, todėl šiems pacientams aktualus adjuvantinio gydymo klausimas (2,3). Pirmųjų tyrimų rezultatai parodė, kad adjuvantinė imunoterapija gali pailginti tokių pacientų laiką iki ligos progresavimo pradžios ir išgyvenimo trukmę, bet kitų autorių tyrimai šių rezultatų nepatvirtino (1,4,5,6).

IFN- α gydomų pacientų išgyvenimo trukmė gali priklausyti nuo prognozių veiksnių. Vienas iš galimų prognozių veiksnių yra naviko proliferacijos žymuo Ki-67. Ki-67 – tai ląstelės branduolio baltymas, aptinkamas visose ląstelės ciklo fazėse, išskyrus G0, ir rodantis naviko proliferacinį aktyvumą bei naviko augimo frakcijos dydį (7). Naviko augimo frakcijos (aktyviai proliferuojančių navikinių ląstelių dalis visoje ląstelių populiacijoje) dydis siejamas su daugelio lokalizacijų onkologinės ligos prognoze, todėl tikėtina, kad šis rodiklis svarbus ir melanomos atveju (8,9). Yra nurodomas ryšys tarp Ki-67 rodiklio ir greitesnio ligos progresavimo esant didelei melanomos pirminio naviko infiltracijai (10).

Melanoma yra laikoma nuo imuninės sistemos priklausomu piktybiniu naviku. Rizika susirgti šiuo piktybiniu naviku padidėja, kai imuninė sistema yra susilpnėjusi, o gydoma melanoma taikant imunoterapiją (citokinus). Nors imunologinių tyrimų melanoma sergantiems pacientams atlikta daug, tačiau nėra nustatyta neabejotinų imunologinių faktorių, nuo kurių priklauso ligos eiga ir imunoterapijos efektyvumas.

DARBO TIKSLAS

Ištirti naviko proliferacijos žymens Ki-67 prognozinę ir prediktyvinę reikšmę bei T limfocitų subpopuliacijų pokyčius esant neišplitusiai melanomai.

DARBO UŽDAVINIAI

1. Ištirti melanomos pirminio naviko augimo frakcijos (Ki-67) reikšmę ligonių išgyvenimo trukmei ir gydymo IFN- α veiksmingumui, kai naviko storis $\geq 1,5$ mm.
2. Ištirti periferinio kraujo T limfocitų subpopuliacijų pokyčius esant neišplitusiai melanomai.
3. Ištirti melanomos pirminio naviko augimo frakcijos Ki-67 ryšį su periferinio kraujo T limfocitų subpopuliacijomis.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Ki-67 neturi prognozinės vertės išgyvenimo trukmei pacientų, sergančių neišplitusia melanoma, kai naviko storis yra didesnis negu 1,5 mm.
2. Neindividualizuotas neišplitusios melanomos gydymas IFN- α nepailgina pacientų išgyvenimo trukmės.
3. Gydytų IFN- α neišplitusia melanoma sergančių pacientų išgyvenimo trukmė priklauso nuo Ki-67 reikšmės.
4. Sergant neišplitusia melanoma, T limfocitų subpopuliacijų kiekiai periferiniame kraujyje yra pakitę.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Šitame darbe pirma karta buvo tirtas ryšis tarp pirminio melanomos naviko proliferacinio aktyvumo ir gydytų IFN- α pacientų išgyvenimo. Buvo nustatyta kad gydyti IFN- α pacientai, kuriems melanomos naviko Ki-67 indeksas $<16\%$ išgyveno statistiškai reikšmingai ilgiau, nei pacientai, kuriems naviko Ki-67 indeksas buvo $\geq 16\%$. Pirma karta buvo detaliam ištirta T limfocitų subpopuliacijų pokyčiai periferiniame kraujyje neišplitusia melanoma sergantiems pacientams. Buvo nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai CD8highCD57- ir CD8low limfocitų subpopuliacijų tarp melanoma sergančių pacientų ir kontrolinės grupės. Pirma karta buvo nustatyta kad pašalinus pirminį melanomos naviką kai Ki-67 raiška $\geq 16\%$, imuninės sistemos rodiklių pokyčiai yra

vienos krypties.

PACIENTAI IR METODAI

Tiriant proliferacijos žymens Ki-67 reikšmę, buvo atlikta 80 pacientų, kuriems Vilniaus universiteto Onkologijos institute (VUOI) 2000-2002 metais buvo diagnozuota neišplitusi melanoma (pacientai buvo tiriami pagal VUOI naudojamus tyrimo algoritmus), retrospektyvinė analizė. Tyrimui atlikti gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas. Įtraukimo į tyrimą kriterijai buvo: pirmą kartą nustatyta ir histologiškai patvirtinta odos melanoma, naviko storis $\geq 1,5$ mm, nėra sritinių ir tolimųjų metastazių, nėra kitos lokalizacijos piktybinio naviko. 33 šių pacientų po operacinio gydymo praėjus dviem mėnesiams, buvo paskirtas adjuvantinis gydymas IFN- α nuo 3 mln. TV iki 18 mln. TV 3 kartus per savaitę į raumenis. Gydymo IFN- α trukmė – nuo 23 iki 1124 dienų, mediana – 269 dienos. Gydymo nutraukimo priežastys buvo ligos progresavimas, blogas vaisto toleravimas, paciento atsisakymas taip gydytis. Duomenys apie išgyvenimo trukmę gauti iš Vėžio registro. Gydyti pacientai (n=33) buvo palyginti su negydytais pacientais (n=47).

Tiriant imunologinius rodiklius buvo atliktas prospektyvinis tyrimas. Išanalizuoti imunologiniai duomenys 27 pacientų, kuriems 2006-2007 metais (VUOI) buvo nustatyta neišplitusi melanoma. Tyrimui atlikti gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas. Įtraukimo kriterijai buvo: pirmą kartą nustatyta ir histologiškai patvirtinta odos melanoma (pTis-pT4N0M0), sritinių ir tolimųjų metastazių nebuvimas, kitos lokalizacijos piktybinio naviko nebuvimas. Imunologiniai pacientų rodikliai buvo palyginti su kontroline grupe. Kontrolinę grupę sudarė 39 onkologiniais ir autoimuniniais ligomis nesergantys asmenys, jų amžiaus mediana buvo 55 metai (intervalas 24-84 metai). Melanoma sergančių pacientų grupėje buvo 22 moterys ir 5 vyrai. Kontrolinės grupės duomenys surinkti 2000 metais.

Ki-67 baltymo raiška buvo nustatyta imunohistocheminiu metodu. Limfocitų analizė buvo atlikta tėkmės citometrijos metodu. Visi duomenų statistiniai skaičiavimai atlikti, naudojant kompiuterinę programą STATISTICA 7. Pacientų išgyvenamumas buvo skaičiuotas nuo diagnozės nustatymo datos iki paciento mirties arba paskutinės datos, kada buvo žinoma, kad pacientas yra gyvas. Stebėjimas buvo atliekamas padedant Vėžio registrai. Grupių išgyvenamumas buvo analizuojamas Kaplan- Meier'io metodu.

Skirtumai tarp išgyvenamumo kreivių įvertinti naudojant Log rangų testą. Kitų faktorių įtaka išgyvenimo trukmei buvo vertinta naudojant Cox'o modelį. Pacientų imunologiniai rodikliai buvo palyginti su kontrolinės grupės individų atitinkamais rodikliais. Skirtumų statistinis reikšmingumas buvo vertinamas pagal Student'o testą.

REZULTATAI IR REZULTATŲ APTARIMAS

Analizuota 80 neišplitusia melanoma sergančių ligonių išgyvenimo trukmė. Visų gydytų IFN- α pacientų išgyvenimo trukmė nesiskyrė nuo negydytų IFN- α pacientų išgyvenimo trukmės. Ki-67 žymuo neturėjo prognozinės reikšmės negydytiems IFN- α melanoma sergantiems pacientams, su naviko storiumi $\geq 1,5$ mm. Tuo tarpu gydytų IFN- α pacientų, kurių navikų proliferacijos žymuo buvo Ki-67 $<16\%$, išgyvenimas buvo ilgesnis, negu pacientų, kurių navikų proliferacijos žymuo buvo Ki-67 $\geq 16\%$. Pacientų stebėjimo laikas buvo per trumpas, kad būtų galima nustatyti gydytų ir negydytų IFN- α pacientų su < 4 mm storio navikais išgyvenimo skirtumus. Gydytiems IFN- α pacientams su ≥ 4 mm storio navikais ir Ki-67 $<16\%$ nustatyta ilgesnio išgyvenimo tendencija, lyginant su negydytais ($p=0,27$), tuo tarpu gydyti IFN- α pacientai su < 4 mm storio navikais ir Ki-67 $\geq 16\%$ išgyveno trumpiau, negu negydyti.

Tiriant imunologinius parametrus buvo nustatyta, kad melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje yra mažiau monocitų ($p=0,0002$) ir citotoksinių T limfocitų CD8^{high}CD57- ($p=0,009$). Sergančių neišplitusia melanoma pacientų periferiniame kraujyje buvo reikšmingai daugiau CD4+ ($p=0,02$) ir CD8^{low} ($p=0,04$) limfocitų.

Kadangi mūsų tirtų melanoma sergančių pacientų navikai buvo palyginti maži, mažai tikėtina, kad nustatyti imuninės sistemos pokyčiai yra sukelti navikinio proceso. Galima iškelti prielaidą, kad šie imuninės sistemos pokyčiai sudarė sąlygas atsirasti ar vystytis navikams.

Tiriant Ki-67 raišką navikuose buvo nustatyta, kad šis žymuo įgyja prediktyvinę reikšmę neišplitusia melanoma sergantiems pacientams, gydytiems IFN- α . Kadangi vienas iš pagrindinių IFN- α veikimo mechanizmų yra poveikis imuninei sistemai, buvo ištirtas Ki-67 raiškos navike ryšys su imunine sistema. Tuo tikslu buvo tirta imuninės

sistemos būklė prieš ir po operacijos. Tyrimo rezultatai rodo, kad Ki-67 raiškai navike esant $\geq 16\%$, imuninės sistemos rodiklių pokyčiai yra vienos krypties. Po operacijos padidėjo visų tirtų pacientų ($n=5$) CD8highCD57+ limfocitų subpopuliacijos ląstelių procentas CD8+ limfocitų populiacijoje, o CD8low limfocitų subpopuliacijos ląstelių kiekis visų pacientų sumažėjo.

Tuo tarpu esant Ki-67 raiškai navikuose $< 16\%$, imuninis sistemos atsakas jau nebuvo vienos krypties. Pašalinus melanomos naviką tarp limfocitų subpopuliacijų buvo tiek padidėjusių, tiek ir sumažėjusių reikšmių. Tai rodo kad imuninė sistema neabejotinai reaguoja į didelės proliferacijos (Ki-67 $\geq 16\%$) melanomos navikus. Esant mažesnei naviko augimo frakcijai (Ki-67 $< 16\%$), matyt, imuninės sistemos rodikliams didesnę įtaką gali daryti kiti faktoriai.

Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad gydant IFN- α pacientus, kurių navikų proliferacijos žymens Ki-67 raiška buvo $\geq 16\%$, statistiškai reikšmingai sumažėjo jų išgyvenimo trukmė. Kaip matome iš aprašytų duomenų, pacientams, kurių navikų proliferacijos žymens Ki-67 raiška buvo $\geq 16\%$, po naviko pašalinimo padidėjo citotoksinių ir sumažėjo disfunkcinių limfocitų. Taigi galima daryti prielaidą, kad pašalinus naviką, tokių pacientų imuninė sistema suaktyvėja. Tokiems pacientams vartojant IFN- α , gali būti sutrikdomi imuninės sistemos autoreguliaciniai mechanizmai, o tai gali turėti neigiamą poveikį gydymo efektyvumui.

IŠVADOS

1. Ki-67 proliferacijos žymuo neturi prognozinės reikšmės neišplitusia melanoma sergantiems pacientams, kai naviko storis $\geq 1,5$ mm.
2. Ki-67 proliferacijos žymuo turi prediktyvinę reikšmę gydytiems IFN- α neišplitusia melanoma sergantiems pacientams.
3. Nustatytas reikšmingas monocitų, CD8highCD57- limfocitų kiekio sumažėjimas ir CD4+ ir CD8low limfocitų kiekio padidėjimas neišplitusia melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje.
4. Neišplitusia melanoma sergančių pacientų naviko augimo frakcijos dydis (Ki-67

raiška) gali daryti įtaką T limfocitų subpopuliacijų pakitimams po operacinio gydymo.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Netikslinga skirti adjuvantinį gydymą IFN- α nesilaikant atrankos kriterijų (neindividualizuotai) pacientams, sergantiems neišplitusia melanoma, kai naviko storis \geq 1,5 mm, ypač jei navike Ki-67 žymens raiška yra \geq 16%.

LITERATŪRA

1. Lens M. B., Dawes M. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Journal of Clinical Oncology*, 2002; 20: 1818-25.
2. Balch C. M., Buzaid A. C., Song S.-J., et al. Final version of the American joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2001; 19: 3635-48.
3. Balch C. M., Buzaid A. C., Atkins M. B., et al. A new American joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer*, 2000; 88: 1484-91.
4. Rusciani L., Petraglia S., Alotto M., et al. Postsurgical adjuvant therapy for melanoma. *Cancer*, 1997; 79: 2354-60.
5. Hancock B. W., Wheatley K., Harris S., et al. Adjuvant interferon in high-risk melanoma: The AIM HIGH study - United Kingdom coordinating committee on

- cancer research randomized study of adjuvant low-dose extended-duration interferon alfa-2a in high-risk resected malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2004; 22: 53-61.
6. Grob J. J., Dreno B., de la Salmoniere P., et al: Randomised trial of interferon α -2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1,5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet*, 1998; 351: 1905-10.
 7. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the know and the unknown. *J. Cell Physiol.* 2000; 182: 311-22
 8. Carlson J. A., Slominski A., Linette G. P., et al. Biomarkers in melanoma: predisposition, screening and diagnosis. [Expert Review of Molecular Diagnostics](#), 2003; 3: 89-110.
 9. Ostmeier H., Fuchs B., Otto F., et al. Prognostic immunohistochemical markers of primary human melanomas. *Br. J Dermatol.*, 2001; 145: 203-9.
 10. Boni R., Doguoglu A., Burg., et al. MIB-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanoma. *J of the American Academy of Dermatology*, 1996; 35:416-418.

GYVENIMO APRAŠYMAS (CURRICULUM VITAE)

Viktoras Sidorovas

Gimimo diena ir vieta: 1973 kovo 12 d., Vilnius, Lietuva

Telefonas: +370 659 57932

E-mail: viktoras.sidorovas@gmail.com

Išsilavinimas

Vidurinė mokykla Vilniuje 1980-1990

Kauno medicinos akademija 1990-1996

Pirminė rezidentūra; Širvintų ligoninėje 1996-1997

Antrinė rezidentūra(terapijos); VU Santariškių klinikos 1997-1999

Tretinė rezidentūra(dermatovenerologijos); VU Santariškių klinikos, Dermatovenerologijos klinika 1999-2001

Doktorantūra; VU Onkologijos institutas 2004-2008

Darbovietės

Nuo 2001 m. dermatovenerologas, VU Onkologijos Institutas, konsultacinė poliklinika, Santariškių 1, LT-2021 Vilnius

2001-2005 m. dermatovenerologas, Odos ir lazerinės chirurgijos centras

Nuo 2005 m. dermatovenerologas, Vilniaus lazerinės dermatologijos centro vadovas

Lietuvos dermatovenerologijos draugijos narys

Lietuvos lazerinės medicinos draugijos narys

Specializacijos kryptys: odos gerybinių ir piktybinių navikų diagnostika ir gydymas, odos gerybinių darinių gydymas lazeriu.

3 publikacijos Lietuvos recenzuojamuose žurnaluose