

*Е.В. Харченко¹, Т.Ю. Семглазова^{1,2}, А.С. Артемьева¹, Г.С. Киреева¹, И.Л. Полякин¹
И.С. Зюзгин¹, Л.В. Филатова¹, Ю.А. Чудиновских¹, М.С. Моталкина¹, Ю.А. Олейник¹*

Прогностическая значимость иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Цель: Определение частоты встречаемости и влияния на прогноз заболевания экспрессии различных ИГХ и молекулярно-генетических маркеров ДВККЛ.

Методы: Проанализировано 215 пациентов с диагнозом ДВККЛ, проходивших лечение в период с 2008 по 2016 гг. Была выполнена оценка ряда ИГХ маркеров, разделение на подтипы GCB, nonGCB при помощи Hans-алгоритма, а также анализ FISH с определением транслокаций в генах MYC, BCL2 и BCL6 для оценки влияния на прогноз заболевания.

Результаты: Медиана времени наблюдения за пациентами составила 29 месяцев. Non-GCB подтип ДВККЛ был установлен в 44 случаях (62,9%), GCB-подтип в 26 случаях (37,1%). Медиана ВВП у non-GCB ДВККЛ составила 46,0 мес., в группе GCB ДВККЛ медиана ВВП и 75% квартиль не были достигнуты ($p=0,171$). Посредством FISH-анализа у 10/48 (20,8%) пациентов выявлены транслокации в генах MYC или BCL2 или BCL6. Экспрессия c-myc и bcl-2 наблюдалась у 21/71 пациентов (29,6%). Экспрессия CD5 была обнаружена у 19/55 (34,5%), CD30 — у 24/66 пациентов (36,4%). В группе без экспрессии CD 10 ВВП составил 6,0 мес., в группе с экспрессией медиана не была достигнута ($p=0,122$). Пациенты с экспрессией CD 10 имели меньший риск рецидива в сравнении с больными без экспрессии ($p=0,049$). При мультивариантном анализе независимым предиктором, негативно влияющими на ВВП оказалось отсутствие экспрессия CD10 ($p=0,015$).

Заключение: Пациенты с ДВККЛ NOS, GCB-подтипом имеют тенденцию к благоприятному прогнозу за счет более высоких показателей ВВП и к низкому риску рецидива в сравнении с non-GCB-подтипом ДВККЛ NOS. Определение типов ДВККЛ в зависимости от происхождения опухолевой клетки (GCB или non-GCB), а также идентификация других ИГХ маркеров помогает выделить группу пациентов с ДВККЛ неблагоприятного прогноза.

Ключевые слова: Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, GCB, non-GCB, c-myc, bcl-2

Введение

Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДВККЛ) – это самая часто встречающаяся неходжкинская лимфома (НХЛ), на долю которой приходится около 30-58% всех случаев НХЛ [1]. Несмотря на успехи в лечении ДВККЛ после внедрения в практику моноклонального антитела ритуксимаб, у половины больных развивается рецидив заболевания, а в трети случаев — летальный исход [2]. Эти данные делают очевидным тот факт, что ДВККЛ — это разнородная группа заболеваний с различными иммуногистохимическими [ИГХ], молекулярно-генетическими характеристиками, клиническим течением и ответом на терапию. Необходимость комплексной оценки ИГХ и молекулярно-генетических параметров опухоли, определение прогностических маркеров и разделение ДВККЛ на подтипы согласно новой классификации Всемирной организации здравоохранения 2016 г. (ВОЗ), должно войти в рутинную клиническую практику [3]. Это поможет не только определить прогноз заболевания, но и с учетом биологических особенностей применить новые персонализированные подходы в лечении.

В новой классификации лимфопролиферативных заболеваний ВОЗ, вышедшей в 2016 году, подчеркивается необходимость проведения ИГХ анализа и молекулярно-генетических исследований для полноценной диагностики опухоли. Например, на основании анализа профиля экспрессии генов ДВККЛ без дополнительного уточнения (not otherwise specified-NOS) была разделена на 2 подтипа в зависимости от происхождения опухолевой клетки: лимфома с фенотипом клеток герминального центра (GCB) и активированных В-клеток (ABC) [3].

В ежедневной клинической практике разделение ДВККЛ на ABC и GCB подтипы посред-

ством анализа профиля экспрессии генов мало-доступен и, поэтому, в новой классификации ВОЗ 2016 рекомендовано разделение на GCB и non-GCB подтипы ДВККЛ с помощью ИГХ-Hans-алгоритма.

Суррогатная модель оценки происхождения клетки (Hans-алгоритм) включает в себя определение экспрессии белков CD10, bcl-6, mum-1. Non-GCB подтип включает в себя «неклассифицируемые» случаи и ABC-подтипы ДВККЛ. В мировых исследованиях non-GCB подтип ДВККЛ продемонстрировал худшие показатели выживаемости в сравнении с GCB-подтипом ДВККЛ [4] и согласно имеющимся данным, в 79% случаев результаты разделения на группы при помощи ИГХ Hans-алгоритма сопоставимы с анализом профиля экспрессии генов [5].

Помимо разделения ДВККЛ NOS на GCB и ABC подтипы, новая классификация ВОЗ выделила редкую группу В клеточных лимфом высокой степени злокачественности, встречающуюся менее, чем в 3% случаев: лимфома с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6, или Double-hit (DH) и Triple-hit (TH) лимфомы [3].

Наличие перестроек в вышеупомянутых генах определяет агрессивность течения болезни, резистентность к стандартной терапии и неблагоприятный прогноз. Клиническими особенностями DH и TH лимфом являются: высокая частота выявления болезни в III-IV стадиях, тяжелое общее состояние больных (ECOG 2-4) в период манифестации болезни, поражение костного мозга, повышение уровня ЛДГ [6]. Флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) позволяет определить наличие перестройки в генах MYC, BCL2 и BCL6. Однако, в связи с низкой доступностью в условиях современной лаборатории нередко исследование ограничивается ИГХ-анализом, что является недостаточным для полноценной диагностики ДВККЛ. В нашей работе был предложен алгоритм дифференциальной диагностики ДВККЛ NOS от В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с транслокацией генов MYC, BCL-2 и/или BCL-6 с использованием ИГХ маркеров и FISH (см. ниже).

Не только молекулярно-генетические характеристики опухоли могут влиять на прогноз заболевания, но и различные ИГХ маркеры опухоли. Помимо ИГХ маркеров, входящих в Hans-алгоритм (CD10, bcl-6, and IRF4/MUM1), потенциальную прогностическую значимость могут также иметь с-тус, bcl-2, CD 5, p53, CD 30 [7].

Все вышеуказанное демонстрирует необходимость оценки ИГХ и молекулярно-генетиче-

ских маркеров не только с целью улучшения диагностики и оценки прогноза заболевания у больных ДВККЛ, но и разработки персонализированных подходов в терапии с учетом биологических особенностей опухоли. Это определяет актуальность данного исследования, направленного на разрешение имеющихся вопросов. Целью настоящего исследования является анализ прогностической значимости ИГХ и молекулярно-генетических характеристик ДВККЛ и их влияния на клиническое течение заболевания, ответ на терапию и показатели ВВП.

Материалы и методы

В исследование было включено 215 пациентов. Гистологическое исследование проводилось на архивном материале фрагмента опухоли или лимфатического узла.

Средний возраст в исследуемой группе составил $51,29 \pm 14,55$ лет. Количество мужчин несколько превалировало над количеством женщин (54,9% vs 45,1%, соответственно). В подавляющем большинстве случаев (порядка 90%) в первой линии полихимиотерапии пациенты получали СНОР-подобные схемы с ритуксимабом (R-CHOP, R-EPOCH). Пациенты с ДВККЛ, которым ранее установили диагноз с использованием классификации ВОЗ 2008 были реклассифицированы по новым требованиям ВОЗ 2016. Перед началом лечения пациентам проводилось полное обследование, согласно действующими рекомендациям по лечению и диагностике ДВККЛ [8].

ИГХ анализ был также выполнен для оценки экспрессии ряда потенциальных прогностических маркеров, таких как с-тус, bcl-2, CD 5, CD 30, p53, а также маркеров, входящих в Hans-алгоритм (CD 10, bcl-6, MUM1), для разделения на GCB и non-GCB подтипы ДВККЛ.

ИГХ анализ был выполнен 123 пациентам. Оценка экспрессии белков с-тус и bcl-2 осуществлялась с учетом опубликованных рекомендаций для данных маркеров. Применялись те же пороговые значения: с-тус > 40 % и bcl-2 > 50 %. Пороговыми значениями для p-53 считались > 75 %, bcl-6 и CD 10 > 30 % позитивных клеток [3]. Ряду пациентов (n=48) был выполнен анализ FISH с целью оценки наличия транслокаций MYC, BCL-2, BCL-6.

Результаты

Экспрессия CD20 выявлена в подавляющем большинстве случаев (96,7%). После выполнения Hans-алгоритма, non-GCB подтип ДВККЛ был установлен в 44 случаях, (62,9%). Высокая пролиферативная активность с уровнем Ki-67 > 89% была обнаружена у 51 пациента (48,6%). Экспрессия маркера CD10 была выявлена у 19/61 пациентов (31,1%), экспрессия bcl-2 — у 73/108 пациентов (67,6%). У большинства пациентов наблюдалась экспрессия bcl-6- в 78 из 118 случаев (66,1%) и экспрессия маркера MUM-1 отсутствовала у 41/60 (68,3%). Экспрессия с-тус была обнаружена у 21/74 пациентов (28,4%). 21/71 пациентов (29,6%) имели двойную экспрессию с-тус и bcl-2 (DE лимфома). Экспрессия CD5 наблюдалась у 19/55 (34,5%),

CD30 — у 24/66 пациентов (36,4%), p53 обнаружена у 8/47 (17%) пациентов. Частота встречаемости различных ИГХ маркеров у проанализированной группы пациентов представлена в табл. 1.

Медиана ВБП в группе non-GCB ДВККЛ составила 46,0 мес. (95% ДИ 30,1-59,3), в группе GCB ДВККЛ медиана и 75% квартиль не были достигнуты (p=0,171), ОР=0,505, 95% ДИ [0,183-1,393], p=0,107 (рис. 1).

При сравнении ВБП в группах пациентов в зависимости от наличия экспрессии CD10 (рис. 2, 3) медиана не была достигнута в обеих группах. 75% квартиль в группе отсутствия экспрессии CD10 составил 6,0±1,3 мес., в группе с наличием экспрессии 75% квартиль достигнут не был (p=0,122) (рис. 4). При сопоставлении рисков рецидива в подгруппах обнаружены статистически значимые различия в ВБП между группами — пациенты с экспрессией CD 10 имели меньший риск рецидива в сравнении с пациентами без экспрессии, ОР=0,397, 95% ДИ [0,115-0,983], p=0,049.

При анализе ВБП пациентов в группах в зависимости от наличия двойной экспрессии белков c-тус, bcl2 или их отсутствия, медиана не была достигнута. 75% квартиль в группе пациентов с отсутствием двойной экспрессии составил 7,0±2,5 мес., в группе с наличием двойной экспрессии c-тус, bcl-2 75% квартиль достигнут не был. Статистически значимых различий между группами обнаружено не было (p=0,605). При сопоставлении рисков рецидива в группах: ОР=0,750, 95% ДИ [0,249-2,262], p=0,610 (рис. 5).

При сравнении ВБП в зависимости от наличия экспрессии CD 5 (рис. 6, 7) медиана ВБП не была достигнута в обеих группах. 75% процентиль в группе без экспрессии CD 5+ составил 46,0±30,2 мес. против 11,0±3,9 мес. в группе с наличием экспрессии (p=0,189); при сравнении рисков рецидива в группах ОР=1,978, 95% ДИ [0,692-5,649], p=0,203 (рис. 8)

При унивариантном анализе ВБП в группах наличия/отсутствия экспрессии CD30 (рис. 9, 10) выявлено, что медиана не была достигнута в обеих группах. 75% квартиль в группе без экспрессии CD30 составил 15,0±12,2 мес. vs 32±23,4 мес. в группе с наличием экспрессии (p=0,798). При сравнении рисков в группах ОР=1,113, 95% ДИ [0,430-2,983], p=0,801 (рис. 11).

При мультивариантном анализе независимыми предикторами, негативно влияющими на выживаемость, оказалось отсутствие экспрессии CD10. Экспрессия CD 10 является независимым предиктором благоприятного прогноза (ОР=0,397, 95% ДИ [0,115-0,983], p=0,015).

Таблица 1. ИГХ анализ ДВККЛ у пациентов, включенных в исследование, номинативные параметры

		Частоты	% по столбцу
Экспрессия CD20	есть	2	3,3%
	нет	59	96,7%
	Всего	61	100,0%
Подтип ДЛБКЛ GCB vs non-GCB	non-GCB подтип	44	62,9%
	GCB-подтип	26	37,1%
	Всего	70	100,0%
Ki-67 0-89 vs 91-100	0-89	62	50,4%
	90-100	61	49,6%
	Всего	123	100,0%
Экспрессия CD10	нет	42	68,9%
	есть	19	31,1%
	Всего	61	100,0%
Экспрессия bcl-6	нет	40	33,9%
	есть	78	66,1%
	Всего	118	100,0%
Экспрессия MUM-1	нет	41	68,3%
	есть	19	31,7%
	Всего	60	100,0%
Экспрессия C-MYC	нет	53	71,6%
	есть	21	28,4%
	Всего	74	100,0%
Двойная экспрессия c-тус и bcl-2	нет	50	70,4%
	есть	21	29,6%
	Всего	71	100,0%
Экспрессия CD5	нет	36	65,5%
	есть	19	34,5%
	Всего	55	100,0%
Экспрессия CD30	нет	42	63,6%
	есть	24	36,4%
	Всего	66	100,0%

Таблица 2. FISH-характеристики ДВККЛ пациентов, включенных в исследование

Параметр	N=48	%
Реаранжировка в гене BCL2	2	4,1%
Реаранжировка в гене BCL6	6	12,5%
Реаранжировка в гене MYC	2	4,1%
Single-hit лимфомы	2	18,7%
Double-hit лимфомы	0	0%

Функции дожития

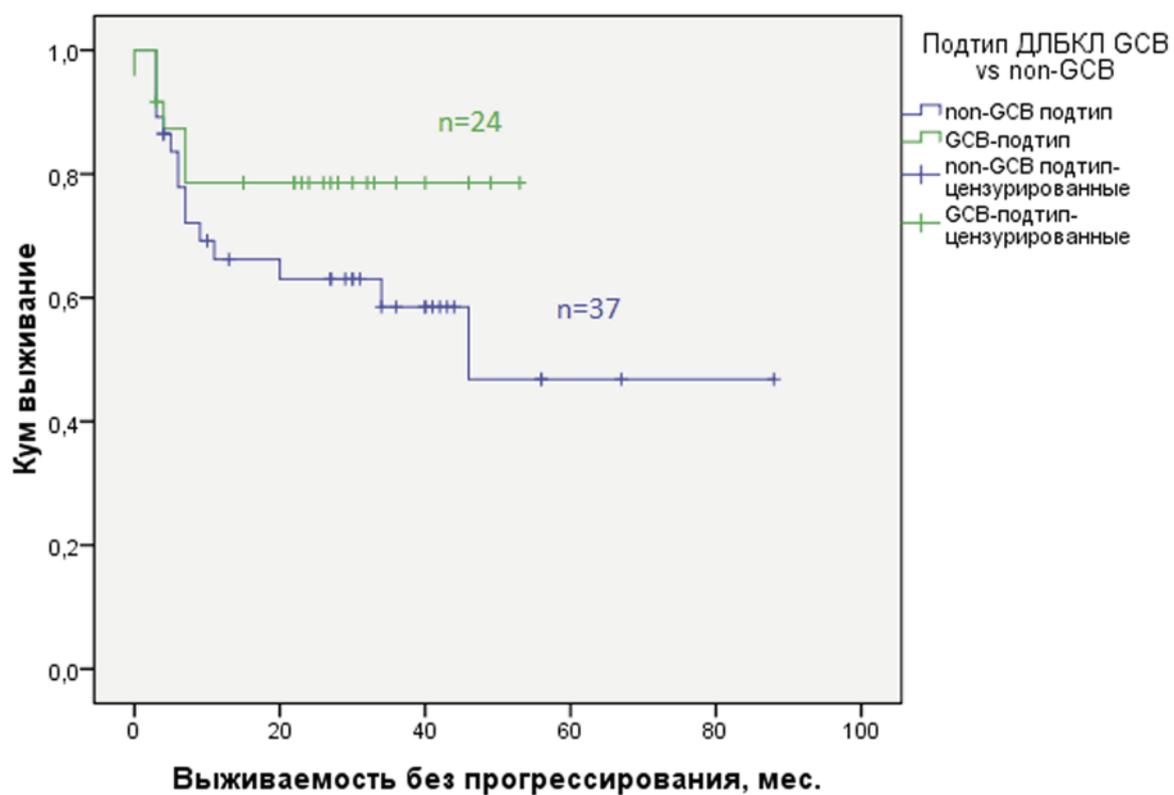


Рис. 1. ВБП в зависимости от подтипа ДВККЛ

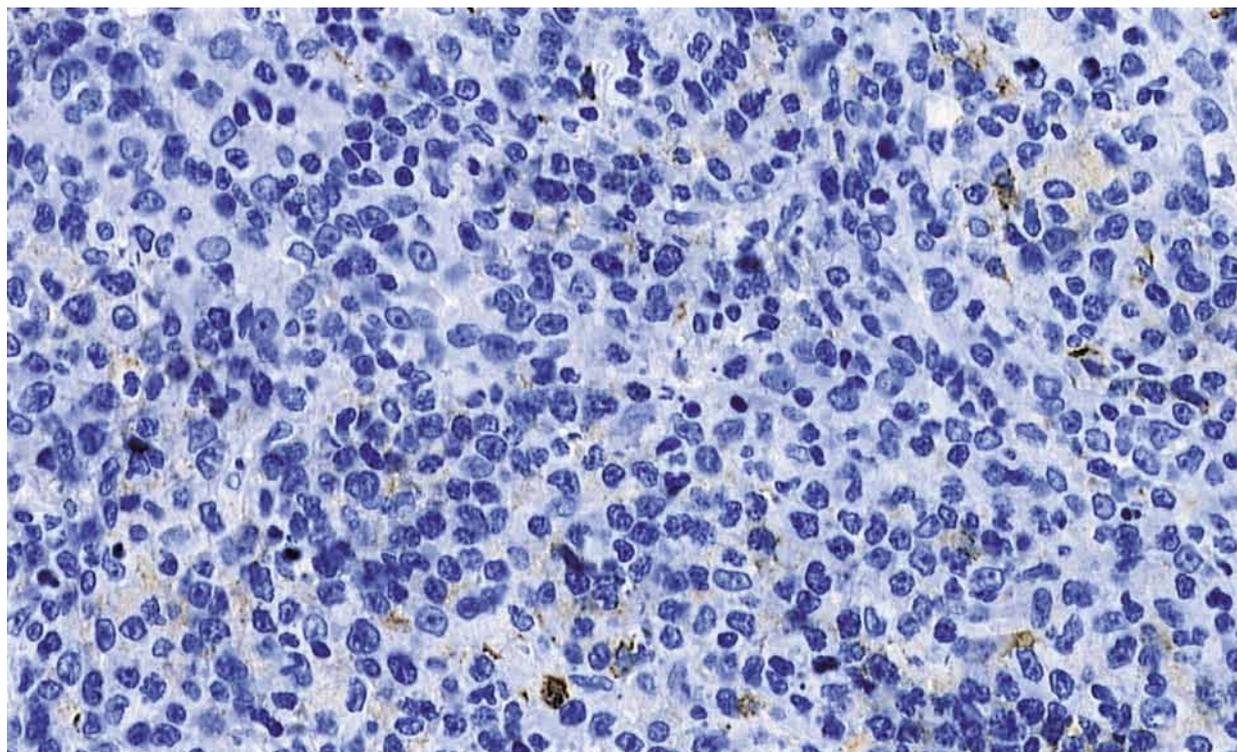


Рис. 2. ДВККЛ без экспрессии CD 10. Увеличение x 40

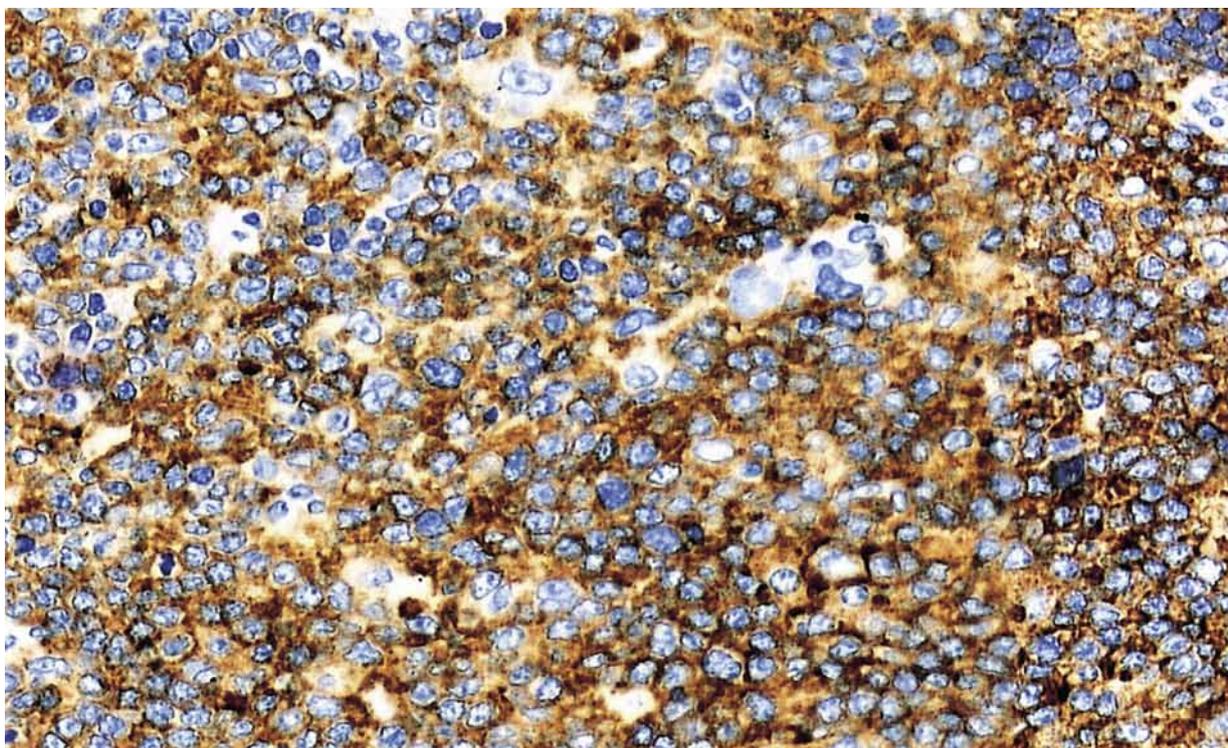


Рис. 3. ДВККЛ с экспрессией CD 10. Увеличение x 40

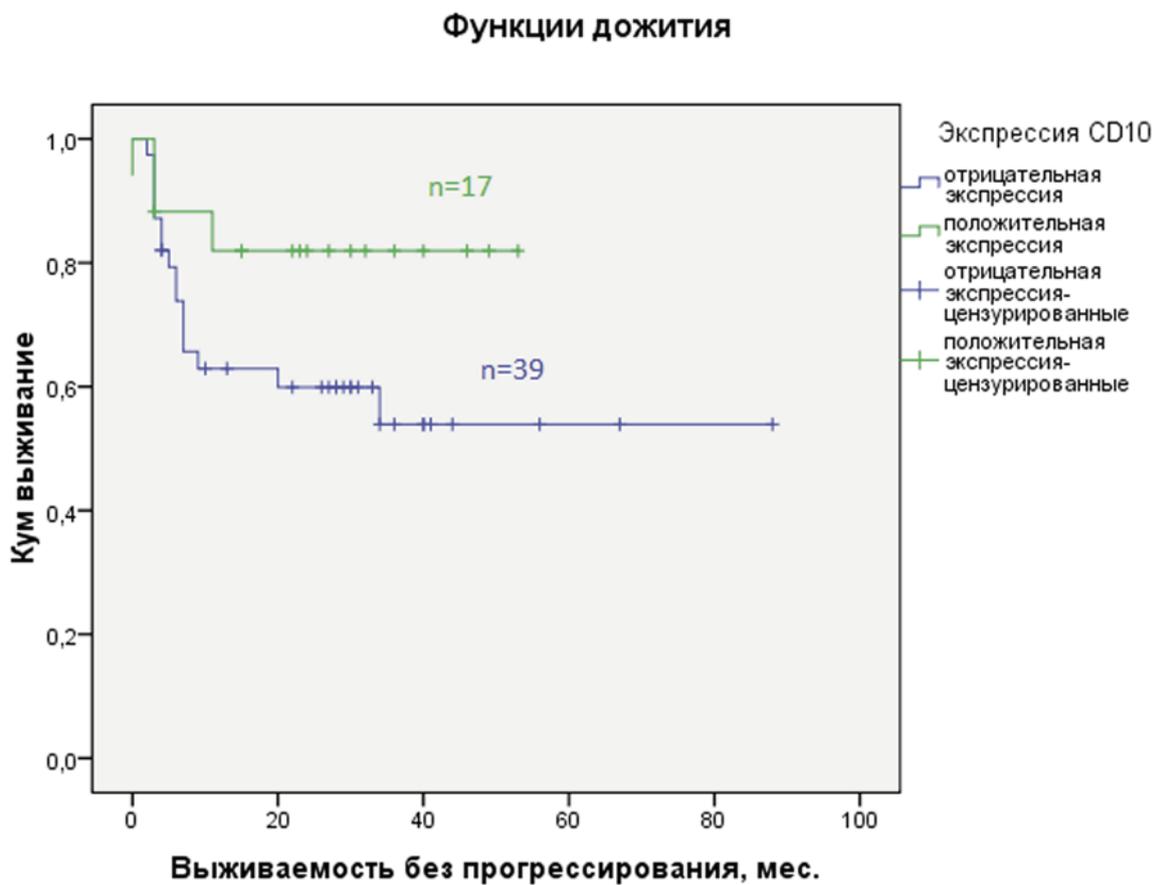


Рис. 4. ВБП в зависимости от наличия/отсутствия экспрессии CD10 у пациентов с ДВККЛ

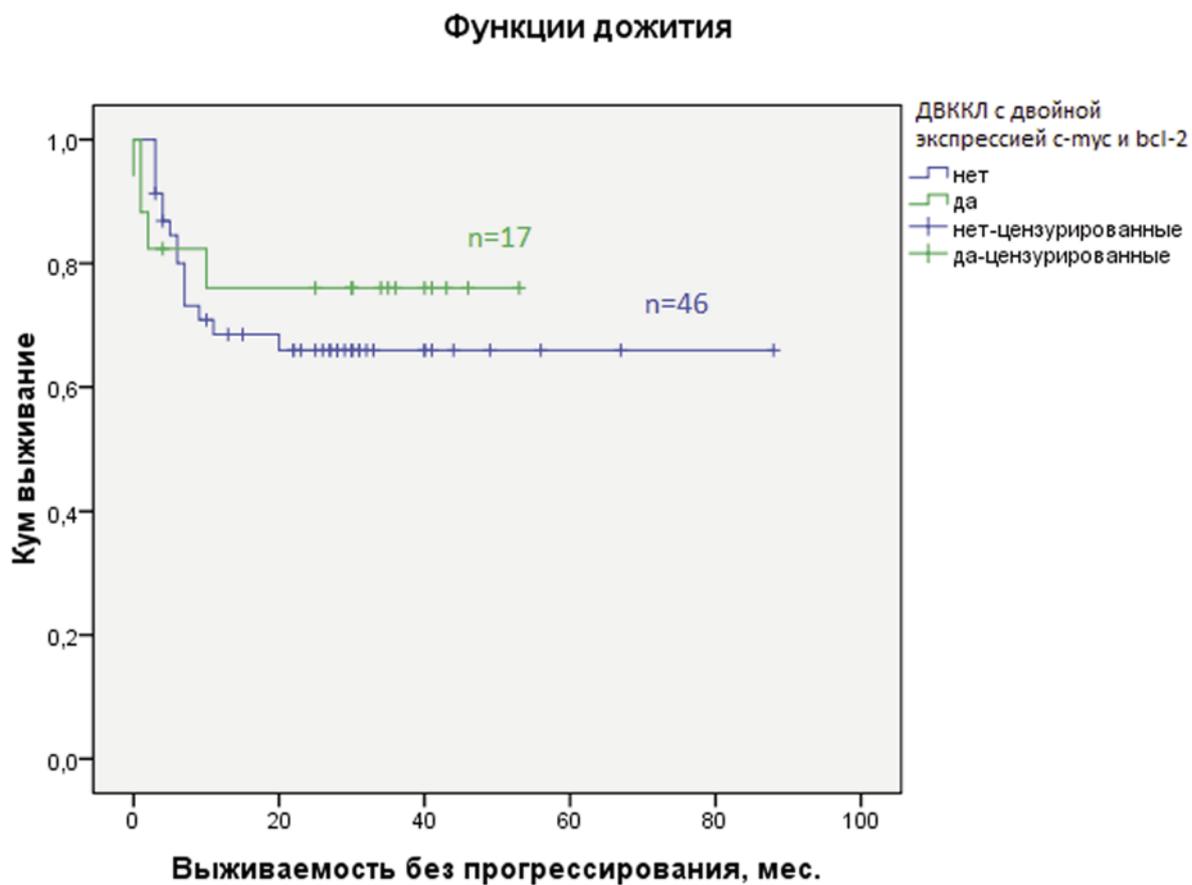


Рис. 5. График ВБП в зависимости от наличия/отсутствия экспрессии с-мус и bcl-2 у пациентов с ДВККЛ

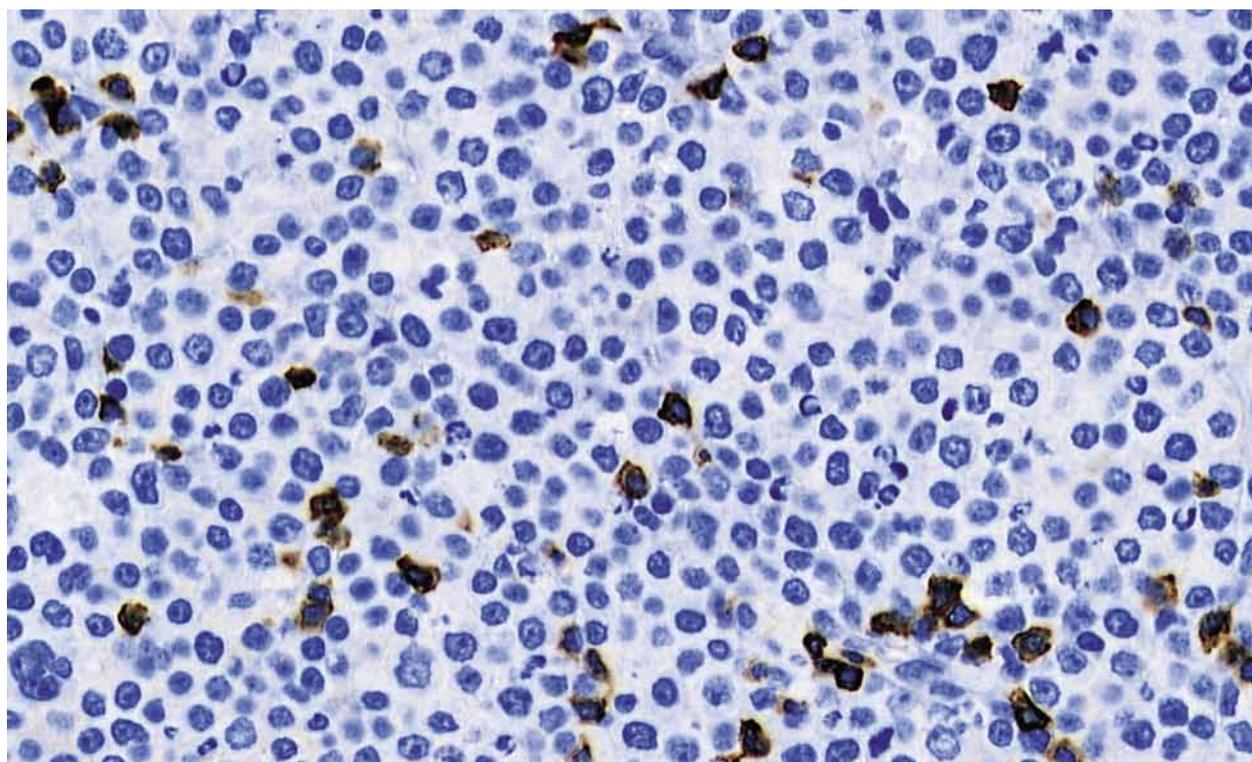


Рис. 6. ДВККЛ без экспрессии CD 5. Увеличение X40

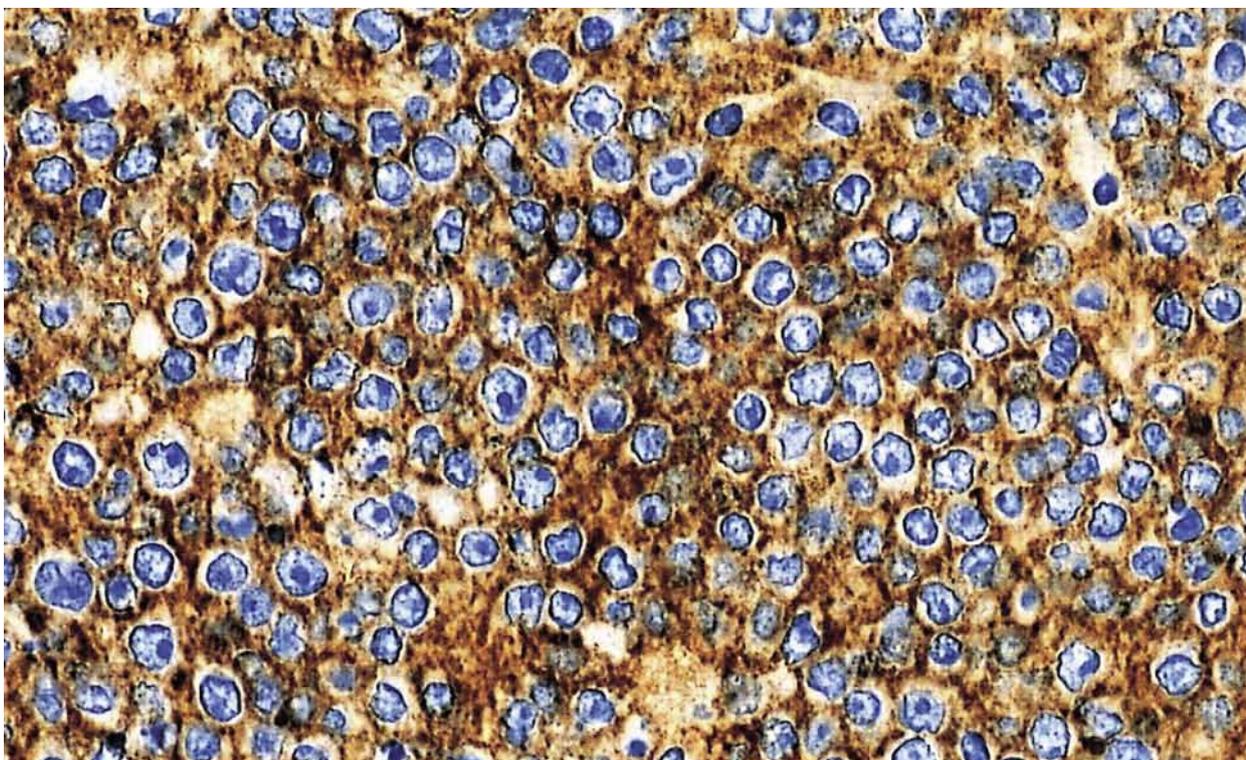


Рис. 7. ДВККЛ с экспрессией CD 5. Увеличение X 50

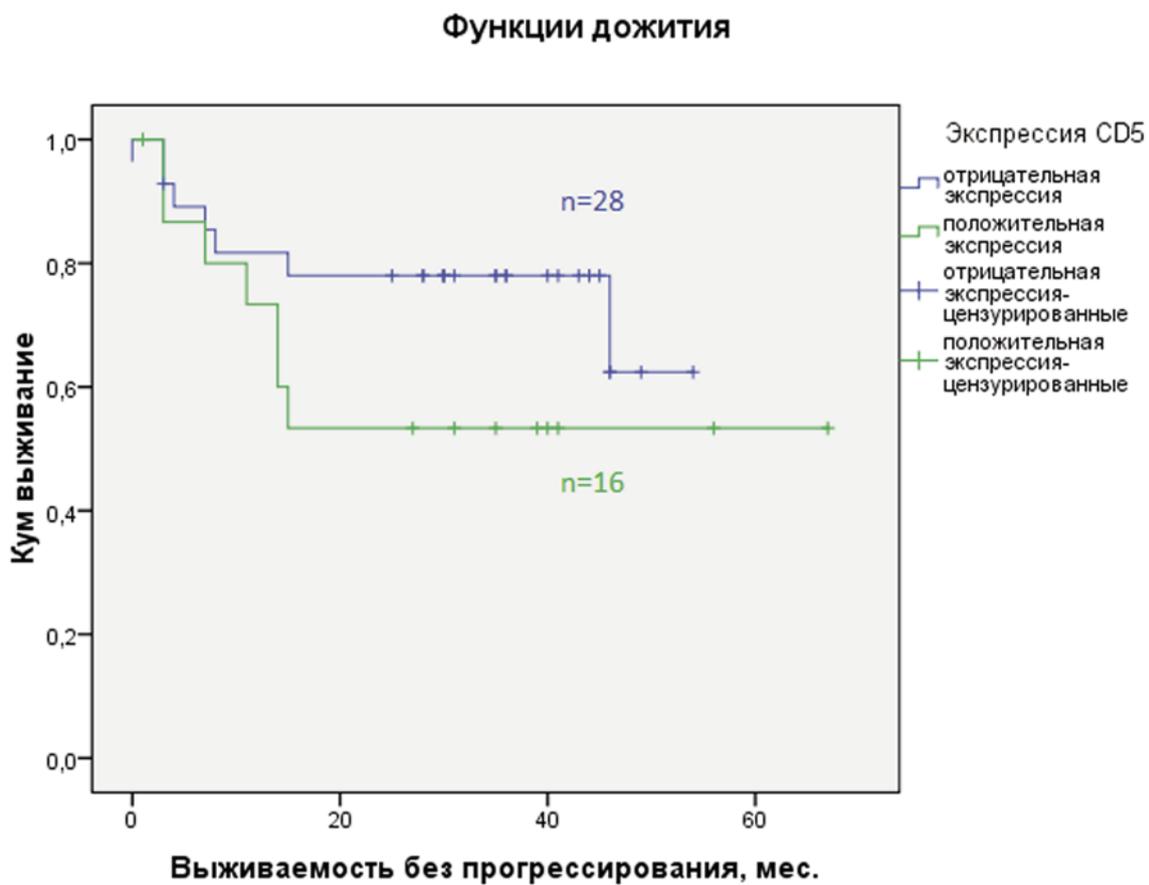


Рис. 8. График ВБП в зависимости от наличия/отсутствия экспрессии CD5 у пациентов с ДВККЛ

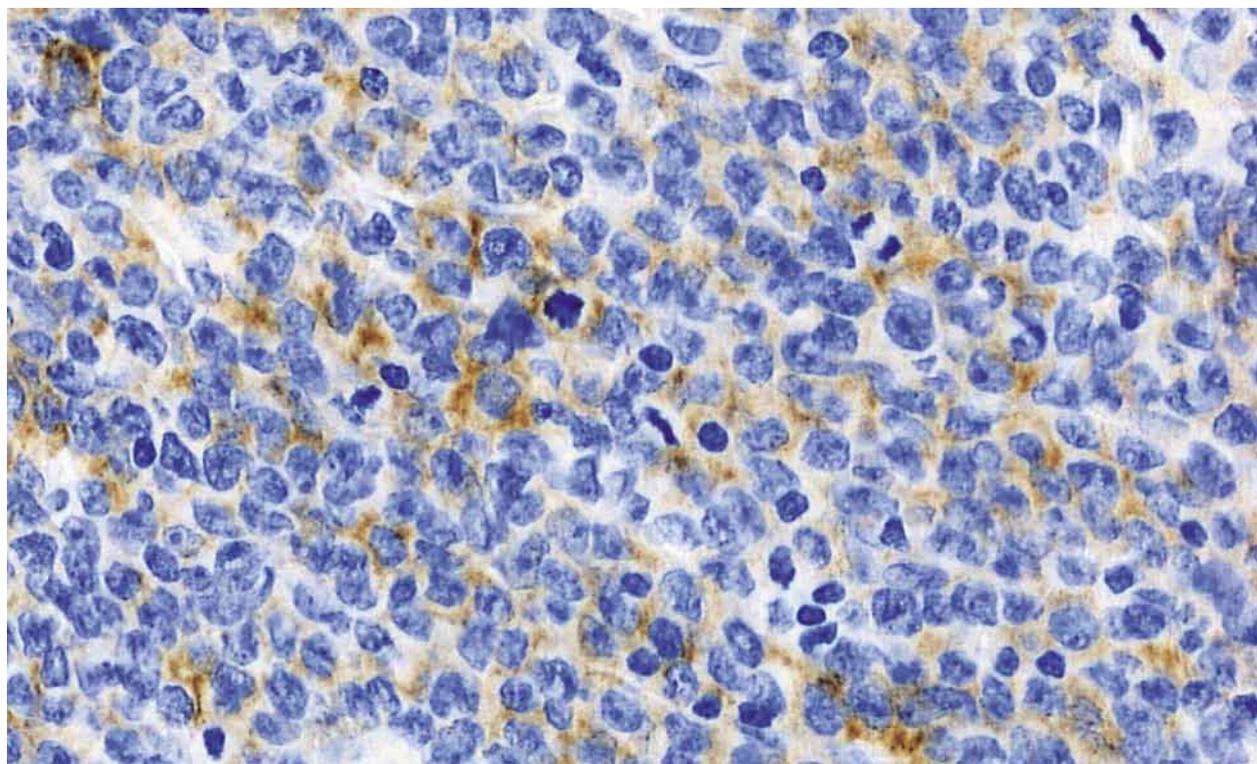


Рис. 9. ДВККЛ без экспрессии CD 30. Увеличение X 50

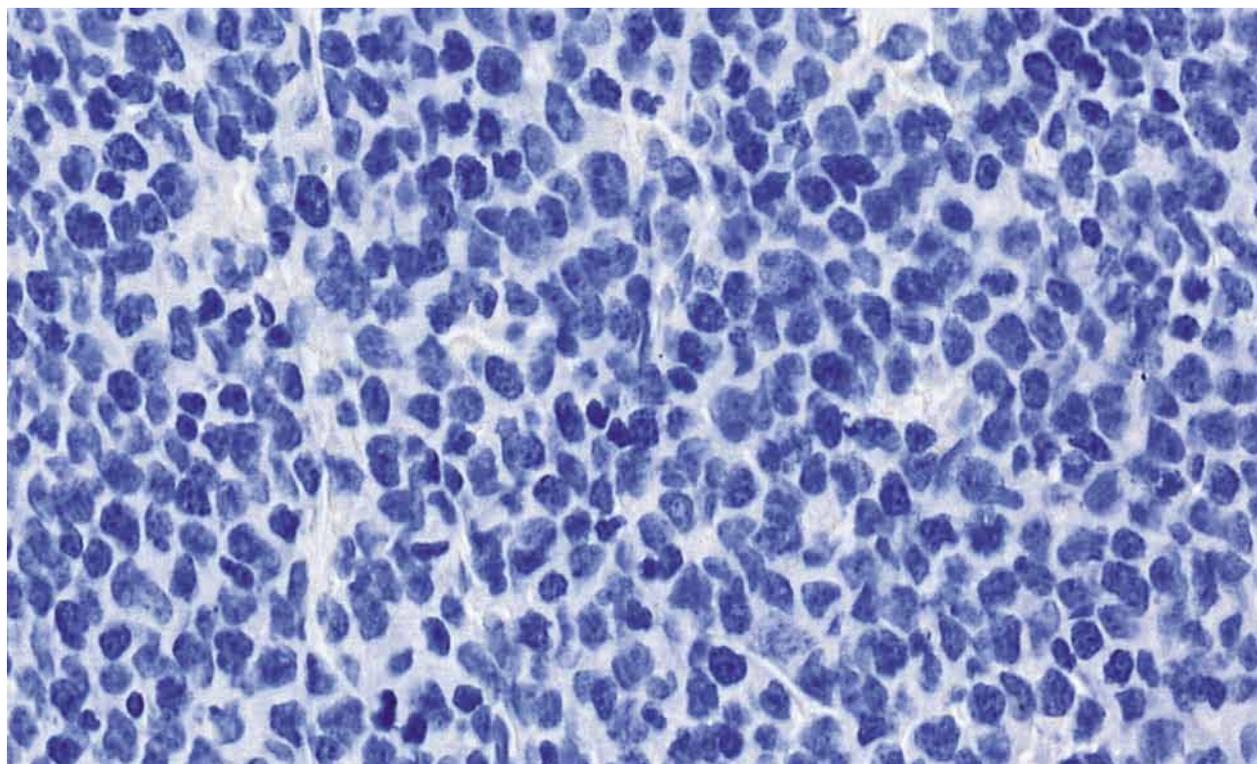


Рис. 10. ДВККЛ с экспрессией CD 30. Увеличение X 50

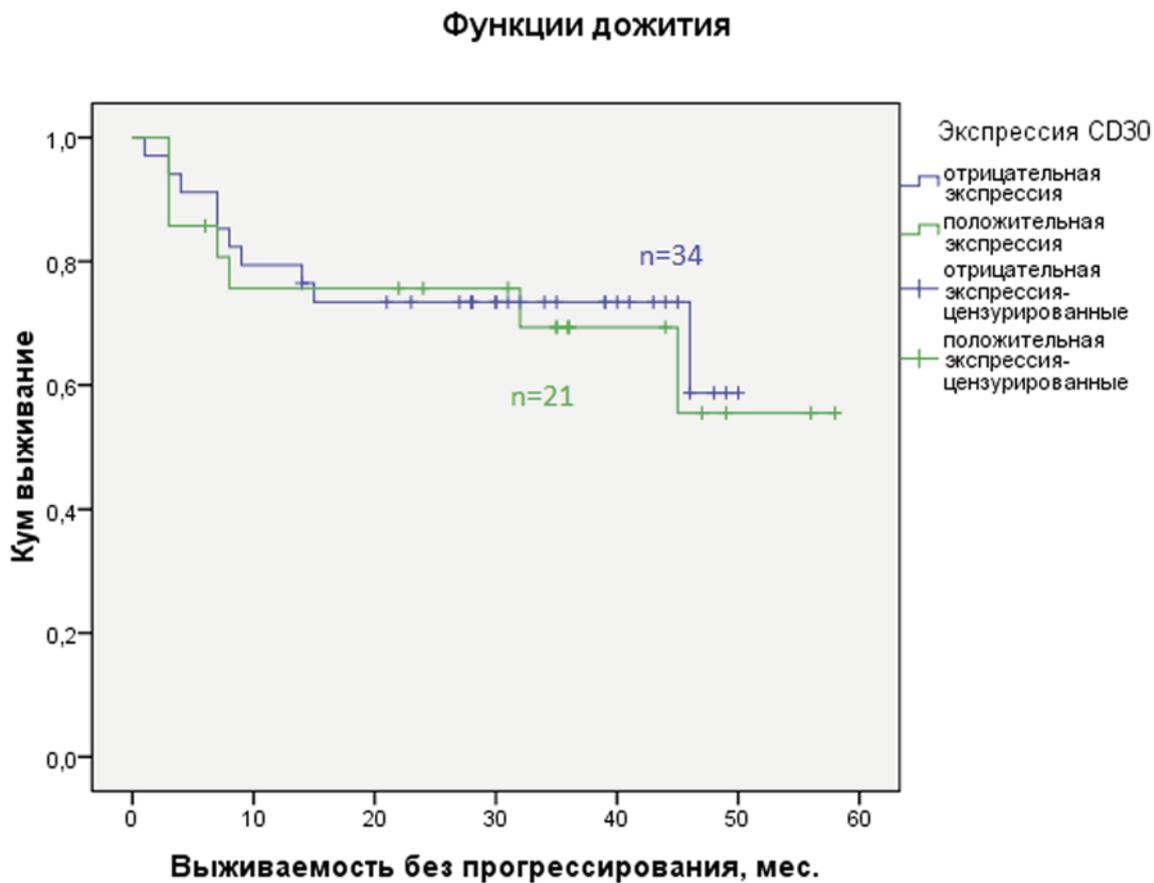


Рис. 11. График ВБП в зависимости от наличия/отсутствия экспрессии CD30 у пациентов с ДВККЛ

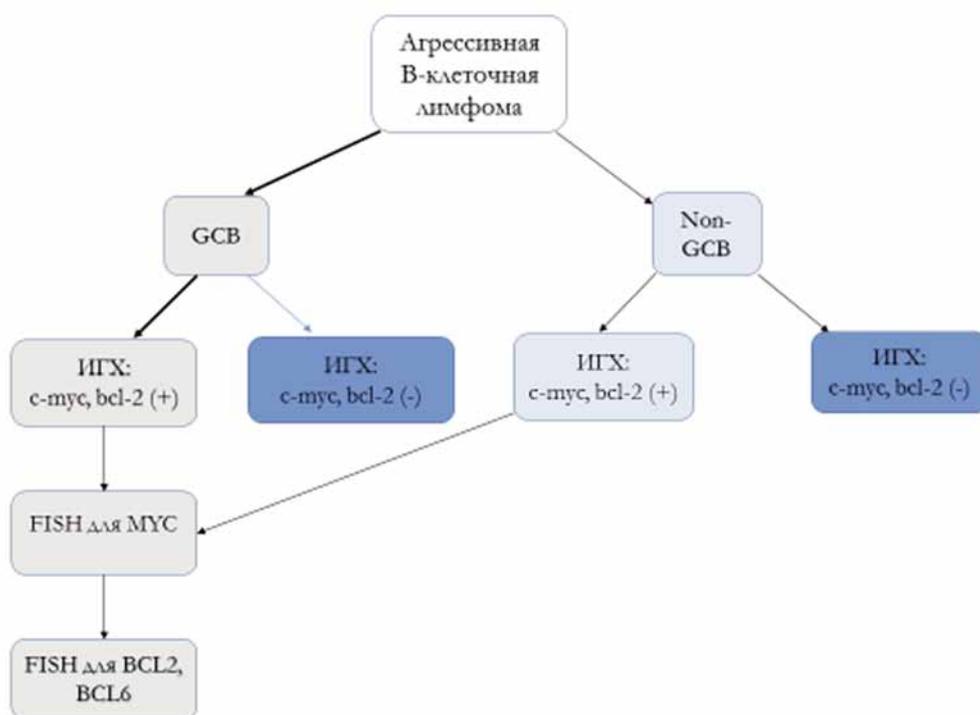


Рис. 12. Алгоритм для диагностики ДН-лимфом при отсутствии возможности рутинного использования FISH

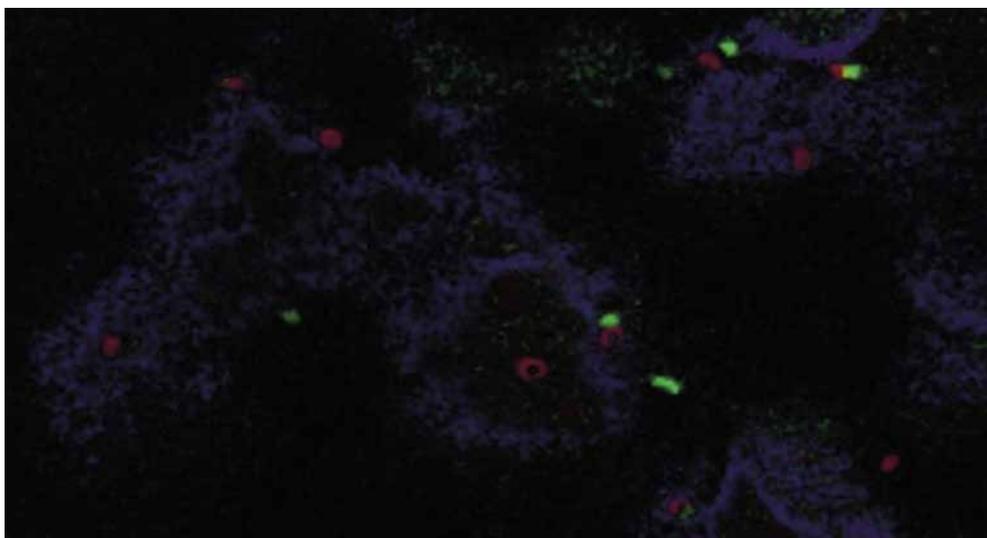


Рис. 13. Транслокация MYC, FISH

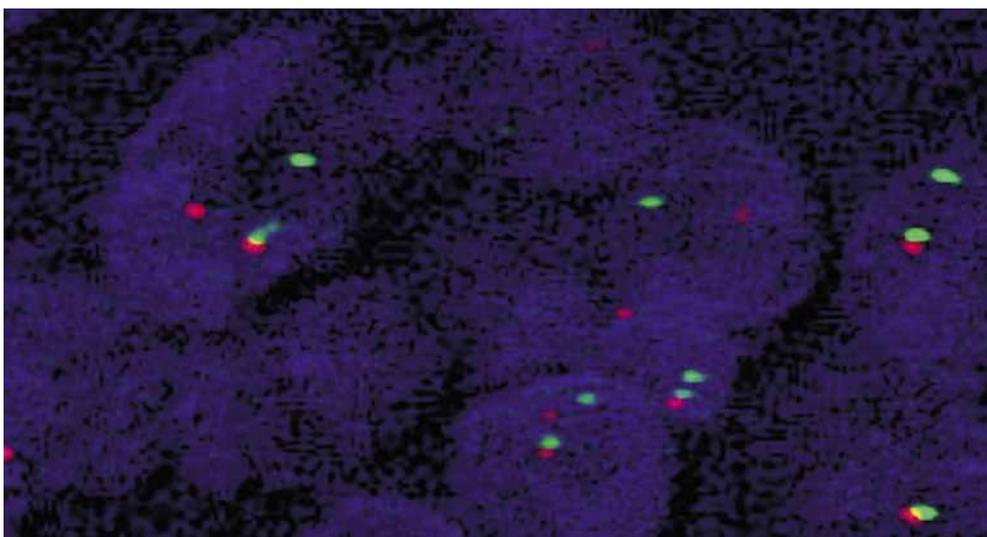


Рис. 14. Транслокация BCL-6, FISH

Рутинное проведение анализа FISH всем пациентам с ДВККЛ достаточно трудоемкий и дорогостоящий процесс, в связи с чем в настоящей работе был предложен алгоритм диагностики ДН и ТН лимфом посредством поэтапного выполнения ИГХ анализа с последующим выполнением FISH (рис. 12). Первым этапом в данном алгоритме является морфологическая оценка опухоли, затем разделение ДВККЛ на подтипы GCB и non-GCB. Следующий шаг — определение экспрессии *c-myc* и *bcl-2*, при подтверждении коэкспрессии — анализ FISH на транслокацию в гене MYC. При положительном тесте необходимо оценить наличие или отсутствие транслокации в генах BCL2, BCL6. Предложенный алгоритм в условиях невозможности выполнения FISH всем пациентам с ДВККЛ может помочь выделить прогностически неблагоприятную группу больных, которым потенциально необходим более агрессивный подход в терапии.

В нашем анализе низкая встречаемость в популяции лимфомы с перестройками в генах

MYC, BCL-2 и/или BCL- была подтверждена — мы не обнаружили двойные транслокации, но обнаружили 10 лимфом с транслокацией в генах или MYC или BCL2 или BCL6 (табл. 2)

Были обнаружены 2 реанжировки в гене BCL-2, 6 реанжировок в гене BCL-6 (рис 14), 2 в гене MYC (рис. 13).

Возможно, недостаточная выраженность некоторых тенденций в показателях выживаемости отчасти связана с тем, что по отношению к различным пациентам, включенным в выборку, практиковался несколько различающийся подход в зависимости от прогноза заболевания — пациенты с более агрессивными лимфомами получали интенсивные схемы лечения — EPOCH-R либо ВДХТ с аутоТКМ в 1 линии терапии. Для назначения того или иного лечения учитывались принадлежность к GCB/non-GCB подтипам, наличие/отсутствие экспрессии *c-myc* и *bcl-2*, уровень Ki-67, степень распространенности заболевания. Этот факт мог несколько нивелировать

потенциальные межгрупповые различия в исследованной нами когорте пациентов.

Обсуждение

ДВККЛ — потенциально излечимое заболевание и, несмотря на то что большинство пациентов достигают полной ремиссии, у 50% больных развивается рецидив. Эти данные подтверждают, что ДВККЛ является неоднородной группой заболеваний с различным ответом на терапию и прогнозом. Это диктует необходимость внедрения комплексной оценки различных морфологических, ИГХ и молекулярно-генетических параметров [9] при постановке диагноза для определения не только прогноза, но и тактики лечения, в том числе с применением ранней интенсификации, таргетной терапии или возможности включения в клинические исследования.

Выводы

1. Экспрессия CD 20 наблюдалась в 96,7% случаев, Ki-67 > 89% у 48,6%. Экспрессия маркера CD10 была выявлена в 31,1% случаев, bcl-2 – 67,6%, c-myc у 28,4% пациентов, в 29,6% наблюдалась двойная экспрессия c-myc и bcl-2. Non-GCB подтип ДВККЛ был установлен в 63% случаев, GCB в 37% соответственно.

2. Пациенты с экспрессией CD 10 имеют меньший риск развития рецидива в сравнении с пациентами без экспрессии CD 10 ($p=0,049$). Пациенты с ДВККЛ и GCB-подтипом ДВККЛ имеют тенденцию к благоприятному прогнозу за счет более высоких показателей ВБП и низкому риску рецидива в сравнении с non-GCB-подтипом ДВККЛ ($p=0,107$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tilly H., Gomes da Silva M., Vitolo U. et al. Diffuse Large B-Cell Lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines // *Ann Oncol.* — 2015. — Vol. 26 (suppl 5). — P. v116-v125.
2. Cohen J.B. Novel therapies for relapsed/refractory aggressive lymphomas // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* — 2018. — Vol. 2018(1). — P. 75-82.
3. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. — Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2016.
4. Schmidt-Hansen M., Berendse S., Marafioti T., McNamara C. Does cell-of-origin or MYC, BCL2 or PCL6 translocation status provide prognostic information beyond the International Prognostic Index score in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and chemotherapy? A systematic review // *Leuk Lymphoma.* — 2017. — Vol. 58. — P. 2403-2418.
5. Battle-Lopez A., Gonzalez de Villambrosia S., Francisco M. et al. Stratifying diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemoimmunotherapy: GCB/non-GCB by

immunohistochemistry is still a robust and feasible marker // *Oncotarget.* — 2016. — Vol. 7 (14). — pp. 18036-18049.

6. Oki Y., Noorani M., Lin P. et al. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience // *Br. J. Haematol.* — 2014. — Vol. 166. — P. 891-901.
7. Shimin Hu., Zijun Y. Xu-Monette, Alexander Tzankov et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program // *Blood.* — 2013. — Vol. 121(20). — P. 4021-4031.
8. Поддубная И.В., Савченко В.Т. и соавт. Российские Клинические Рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний // *Современная Онкология.* — 2014. — С. 9-10.
9. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека 4-е изд., доп. и перераб. / Под ред. С.В. Петрова, Т.Н. Райхлина-Казань, 2012. — С. 312-338.

Поступила в редакцию 17.09.2019 г.

E.V. Kharchenko¹, T.Y. Semiglazova^{1,2}, A.S. Artemyeva¹, G.S. Kireeva¹, I.L. Polatskin¹, I.S. Zuzgin¹, L.V. Filatova¹, Y.A. Chudinovskikh¹, M.S. Motalkina¹, Y.A. Oleynik¹

Prognostic impact of immunohistochemical and molecular genetic markers in diffuse Large B-cell lymphoma

¹FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of oncology»,
²North-Western State Medical University
na I.I. Mechnikov, St.Petersburg

Aim: To identify incidence and prognostic impact of different IHC and molecular genetic markers in Diffuse Large B-cell lymphoma.

Methods: We analyzed 215 patients with DLBCL who received treatment from 2008 to 2016. We assess expression of different IHC markers, defined DLBCL to GCB and non-GCB subtypes by Hans-algorithm and performed FISH to evaluate MYC, BCL2 and BCL6 translocations.

Results: Median follow-up was 29 months. Non-GCB DLBCL were identified in 44 pts (62,9%), GCB-subtype in 26 pts (37,1%). Median PFS in non-GCB DLBCL was 46,0 months, in GCB DLBCL median PFS and 75% quartile was not reached ($p=0,171$). Translocations of MYC, BCL2 and BCL6 were found in 10/48 pts (20,8%). Double expression of c-myc and bcl-2 was identified in 21 of 71 patients (29,6%). CD5-expression were determined in 19/55 (34,5%), CD30+ DLBCL – in 24/66 pts (36,4%). In pts with DLBCL without CD-10 expression PFS was 6,0 months, in group with CD 10 expression median of PFS was not reached ($p=0,122$). Pts with CD 10 expression had lower risk of relapse compared to those without expression ($p=0,049$). Absence of CD 10 expression was negative prognostic factor for PFS in multivariate analysis ($p=0,015$).

Conclusion: Patients with DLBCL and GCB subtype have tendency to better prognosis in PFS rates and lower risk of relapse compared to non-GCB subtype. Dividing to GCB or non-GCB subtypes in DLBCL and assessment of different IHC markers can potentially determine DLBCL with worse prognosis.

Key words: Diffuse Large B-cell lymphoma, GCB, non-GCB, c-myc, bcl-2