

Л.В. Филатова, М.Л. Гершанович, А.А. Плотникова, Е.А. Туркевич, А.О. Иванцов,
В.Ф. Климашевский

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА ПЕРВИЧНО-РЕФРАКТЕРНОЙ ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

С целью выявления иммуногистохимических маркеров, ассоциированных с первично-рефрактерным течением лимфомы Ходжкина, у 20 пациентов с первично-рефрактерной формой с ПАВ стадиями, находящихся в полной ремиссии, проведено гистологическое исследование и иммуногистохимическое определение Vcl-6, Vcl-2, c-kit (CD117), CD15, CD30, P-53, Ki-67. В группе с первично-рефрактерным течением лимфомы Ходжкина с ПАВ стадиями (n=20) экспрессия Vcl-6 выявлена в 2 случаях (10%), Vcl-2 в 14 случаях (70%), c-kit (CD117) в 16 случаях (80%), CD15 в 9 случаях (45%). Экспрессия CD30 и P-53 отмечена у всех пациентов этой группы (100%). Экспрессия Ki-67 колебалась от 20% до 100%, 80-100% у 16 пациентов (80%). В результате проведения многофакторного анализа не выявлено иммуногистохимических маркеров первично-рефрактерного течения лимфомы Ходжкина.

При однофакторном и многофакторном анализе в группе первично-рефрактерной ЛХ высокий уровень экспрессии P-53 (80-100%) статистически значимо ассоциирован со снижением показателей общей выживаемости ($p=0,005$; $p=0,036$). 5-летняя общая выживаемость в группе пациентов лимфомой Ходжкина с уровнем экспрессии P-53 <80% составила 78%, с уровнем экспрессии P-53 80-100% — 22%. Показатели 5-летней общей выживаемости первичных больных лимфомой Ходжкина, находящихся в полной ремиссии, статистически значимо превышали показатели пациентов с первично-рефрактерным течением — 100% против 52%, $p<0,001$.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, иммуногистохимические маркеры, факторы прогноза, первично-рефрактерная форма

В настоящее время предпринимается дальнейшие попытки усовершенствования подходов к ведению пациентов с лимфомой Ходжкина (ЛХ). Большое значение придается определению неблагоприятных факторов прогноза (ФП) для разделения пациентов на прогностические группы. Стадия, симптомы интоксикации как

ФП были заложены в классификации, принятой в Ann-Arbor (1971). В дополнениях клинической классификации (1989) к ФП отнесены так же количество пораженных регионов, массивное опухольное поражение.

Кроме клинических факторов риска, ныне изучаются иммуногистохимические маркеры, которые экспрессируются клетками Березовского-Штенберга-Рида (БШР) или микроокружением опухоли и коррелируют с результатами лечения ЛХ. По данным различных исследований, к таким иммуногистохимическим маркерам относятся Ki-67, bcl-2, bcl-6, P-53, c-kit (CD 117), CD15, CD30.

Ki-67 — ядерный белок, связанный с пролиферацией клетки, относится к семейству перихромонуклеиновых протеинов, окружающих хромосомы в фазу митоза. Ki-67 впервые описан на клеточной линии, полученной из ЛХ [8]. Так как Ki-67 выявлялся только в делящихся клетках, он стал широко применяться как маркер пролиферации [7]. В исследовании [10] проанализированы данные 140 пациентов ЛХ и показано, что высокий уровень экспрессии Ki-67 сочетается со снижением показателей общей выживаемости (ОВ), в силу чего он рассматривается как маркер более медленного достижения полной ремиссии (ПР) [10].

Vcl-2 принадлежит к классу онкогенов, которые без стимуляции клеточной пролиферации блокируют клеточную гибель. По данным разных исследований, высокий уровень экспрессии Vcl-2 коррелирует с неудачей лечения и сочетается со снижением ОВ пациентов ЛХ [1, 6, 12, 14]. В исследовании D.J. van Spronsen с соавт. (2000) показано, что высокий уровень экспрессии Vcl-2 клетками БШР в сочетании с низким уровнем экспрессии Т-клетками ассоциируется с неблагоприятным прогнозом ЛХ [15].

Белок P-53 жизненно необходим для поддержания целостности генома и контроля клеточного роста [4]. Утрата или подавление функции белка P-53 приводит к неконтролируемому опухолевому росту. Прогностическая роль P-53 активно изучается при ЛХ. В ряде исследований высокий уровень экспрессии P-53 негатив-

но влияет на результаты лечения ЛХ [14]. В то же время, по данным С. Nieder с соавт. (2001), не выявлено прогностической значимости экспрессии P-53 [11].

CD30— трансмембранный белок, член семейства рецепторов фактора некроза опухолей–альфа, который представлен преимущественно на клетках БШР, крупноклеточной анапластической лимфомы и на клетках, пораженных вирусом Эпштейн-Барр. Он практически не экспрессируется в нормальных тканях [9]. В различных исследованиях показана прогностическая значимость CD30 для ответа на лечение и ОВ [3]. В исследовании А.Н. Sarris с соавт. (2001) представлены данные 307 пациентов ЛХ, которые еще раз подчеркивают независимую прогностическую роль этого маркера [13].

CD15— антиген гранулоцитов, в норме лимфоцитами не экспрессируется; является диагностическим маркером клеток БШР, кроме них экспрессируется в некоторых В- и Т-клеточных лимфомах. По имеющимся данным, высокий уровень экспрессии CD15 является независимым неблагоприятным ФП для рецидивов ЛХ (p=0,022) и ОВ (p=0,0035). В работе А.М. Ковригиной (2006) показано, что снижение уровня экспрессии опухолевыми клетками CD15 более чем в два раза по сравнению с CD30 является иммунологическим фактором плохого прогноза при нодулярном склерозе и смешанно-клеточном варианте [1].

Протоонкоген c-kit (CD117) кодирует трансмембранную рецепторную тирозинкиназу типа III для колонистимулирующего фактора роста. В исследовании D. Molin с соавт. показано, что высокий уровень экспрессии c-kit взаимосвязан с ответом на ЛХ терапию и ассоциирован с низкой безрецидивной выживаемостью (БРВ) [10]. D. Canioni с соавт. показали, что высокая экспрессия c-kit статистически значимо чаще встречается в группах пациентов с первично-рефрактерным течением ЛХ и ранними рецидивами [6].

Наконец, Vcl-6— это супрессор транскрипции. В настоящее время изучается прогностическая роль Vcl-6, коррелирующая с ответом на лечение и высоким риском рецидивирования и рефрактерным течением ЛХ [2].

Изучение экспрессии иммуногистохимических маркеров клетками БШР или микроокружением с возможным выявлением новых ФП может способствовать улучшению результатов терапии ЛХ за счёт выделения наиболее неблагоприятной группы пациентов для интенсификации терапии, что послужило основанием для проведения настоящей работы.

Материал и методика

С целью выявления иммуногистохимических маркеров, ассоциированных с первично-рефрактерным течением ЛХ, 20 пациентам с первично-рефрактерной формой ЛХ и 20 первичным пациентам ЛХ с ПАВ стадиями, находящимся в ПР, проведено гистологическое исследование и иммуногистохимическое определение Vcl-6, Vcl-2, c-kit (CD117), CD15, CD30, P-53, Ki-67.

Уровень пролиферации Ki-67 и уровень экспрессии P-53, Vcl-6 оценивался при помощи подсчета позитивно окрашенных ядер в 100 опухолевых клетках. Ядерная реакция любой интенсивности фиксировалась как позитивная. Экспрессия Vcl-2 расценивалась как позитивная, если более 5% опухолевых клеток имели цитоплазматическое окрашивание любой степени интенсивности. Уровень экспрессии c-kit (CD 117) оценивался при помощи подсчёта количества клеток в одном большом поле зрения (увеличение микроскопа 40), цитоплазматического мембранного окрашивания. Уровень экспрессии CD15 и CD30 оценивался на основании изучения мембранно-цитоплазматического окрашивания и окрашивания комплекса Гольджи в 100 опухолевых клетках.

Проведено гистологическое исследование и иммуногистохимическое определение Vcl-6, Vcl-2, c-kit (CD117), CD15, CD30, P-53, Ki-67 у 20 пациентов с первично-рефрактерной формой ЛХ и 20 первичных пациентов ЛХ с ПАВ стадиями, находящихся в ПР, с целью выявления иммуногистохимических маркеров, ассоциированных с первично-рефрактерным течением ЛХ.

В исследуемой группе с первично-рефрактерной ЛХ с ПАВ стадиями женщин было 13 человек (65%), мужчин—7 (35%). Соотношение по полу составило 1,9:1. Средний возраст пациентов составил 35 лет (19-74 лет). Диагноз ЛХ у всех пациентов подтвержден гистологическим исследованием. Нодулярный склероз наблюдался в 80% случаев (16 пациентов), смешанно-клеточный тип—в 10% случаев (2 пациента), лимфоцитарное истощение—в 10% случаев (2 пациента).

При проведении анализа в группе первичных пациентов ЛХ с ПАВ стадиями, находящихся в ПР, женщин было 13 человек (65%), мужчин—7 человек (35%). Соотношение по полу составило 1,9:1. Средний возраст первичных пациентов ЛХ составил 27 лет (18-65 лет). У всех пациентов имелось гистологическое подтверждение ЛХ. В 90% случаев (18 пациентов) выявлен нодулярный склероз, в 10% случаев (2 пациента) смешанно-клеточный тип.

Результаты и обсуждение

В группе с первично-рефрактерным течением ЛХ с ПАВ стадиями (n=20) экспрессия Vcl-6 выявлена в 2 случаях (10%), Vcl-2 в 14 случаях (70%), c-kit (CD117) в 16 случаях (80%), CD15 в 9 случаях (45%). Экспрессия CD30 и P-53 отмечена у всех пациентов этой группы (100%). Экспрессия Ki-67 колебалась от 20% до 100% (табл. 1).

В группе первичных пациентов ЛХ с ПАВ стадиями, находящихся в ПР (n=20) экспрессия Vcl-6 выявлена в 2 случаях (10%), Vcl-2 в 14 случаях (70%), c-kit (CD117) в 18 случаях (90%), CD15 в 7 случаях (35%), P-53 в 16 случаях (80%). Экспрессия CD30 выявлена у всех пациентов в этой группе (100%). Экспрессия Ki-67

Таблица 1. Определение экспрессии иммуногистохимических маркеров у пациентов с первично-рефрактерной лимфомой Ходжкина (n=20) и первичных пациентов лимфомой Ходжкина с IIAB стадиями, находящихся в полной ремиссии (n=20)

Иммуногистохимические маркеры	Первично-рефрактерная лимфома Ходжкина (n=20)		Первичная лимфома Ходжкина. Полная ремиссия (n=20)	
	n	%	n	%
Bcl-6	2	10	2	10
Bcl-2	14	70	14	70
c-kit (CD117)	16	80	18	90
CD15	9	45	7	35
CD30	20	100	20	100
P-53	20	100	16	80
Ki-67 10-20%	1	5	2	10
Ki-67 40-60%	3	15	3	15
Ki-67 80-100%	16	80	15	75

Таблица 2. Многофакторный анализ (модель Кокса 1) иммуногистохимических маркеров рефрактерного течения лимфомы Ходжкина среди первичных пациентов лимфомой Ходжкина с IIAB стадиями (n=20) и первично-рефрактерной лимфомой Ходжкина с IIAB стадиями (n=20)

Иммуногистохимические маркеры	BETA	P
P-53	0,315452	0,090
c-kit (CD117)	0,131883	0,421
CD15	-0,107704	0,514
Ki-67	-0,003661	0,984

Таблица 3. Неблагоприятные факторы прогноза первично-рефрактерного течения лимфомы Ходжкина (модель Кокса 1)

Иммуногистохимические маркеры	Выживаемость, свободная от неудач лечения второй линии (ВСНЛ)		Общая выживаемость (ОВ)	
	Однофакторный анализ	Многофакторный анализ	Однофакторный анализ	Многофакторный анализ
	p	p	p	p
Bcl-6	0,645	0,004	0,141	0,005
Bcl-2	0,771	0,631	0,982	0,735
c-kit (CD117)	0,267	0,433	0,153	0,147
CD15	0,289	0,104	0,485	0,333
P-53 80-100%	0,032	0,399	0,005	0,036

колебалась от 10% до 100% , 80-100% у 16 пациентов (80%) (табл. 1).

В результате проведения многофакторного анализа не найдено иммуногистохимических маркеров первично-рефратерного течения ЛХ (табл. 2). Многофакторным анализом не обрабатывались данные Bcl-6, учитывая незначительную экспрессию в обеих группах (у 2 пациентов в группе с первично-рефрактерной ЛХ и у 2 пациентов с первичной ЛХ, находящихся в ПР). Не определялись данные Bcl-2, так как экспрессия отмечена у одинакового количества пациентов в обеих группах (у 14 пациентов в группе с первично-рефрактерной ЛХ и у 14 пациентов с первичной ЛХ, находящихся в ПР), и CD30, учитывая экспрессию в 100% случаях в обеих группах.

Проведен однофакторный и многофакторный анализ влияния иммуногистохимических маркеров (Bcl-6, Bcl-2, c-kit (CD117), CD15, CD30, P-53, Ki-67) в группе с первично-рефрактерной ЛХ с IIAB стадиями (n=20) на показатели выживаемости, свободной от неудач лечения второй линии (ВСНЛ) и ОВ (табл. 3).

Не обрабатывались данные CD30 и Ki-67, учитывая экспрессию в 100% случаев. При однофакторном и многофакторном анализе в группе первично-рефрактерной ЛХ высокий уровень экспрессии P-53 (80-100%) статистически значимо ассоциирован с низкими показателями ОВ (p=0,005; p=0,036). 5-летняя ОВ в группе пациентов ЛХ с уровнем экспрессии P-53 <80% составила 78%, с уровнем экспрессии P53 80-100% — 22% (рис. 1).

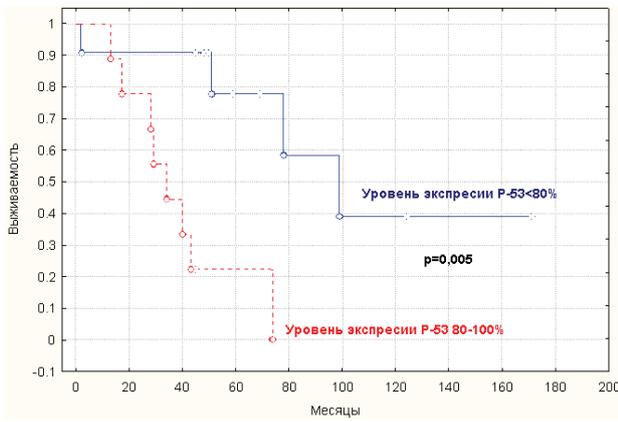


Рис. 1. Общая выживаемость (ОВ) пациентов с первично-рефрактерной формой лимфомы Ходжкина (n=20) в зависимости от уровня экспрессии P-53.

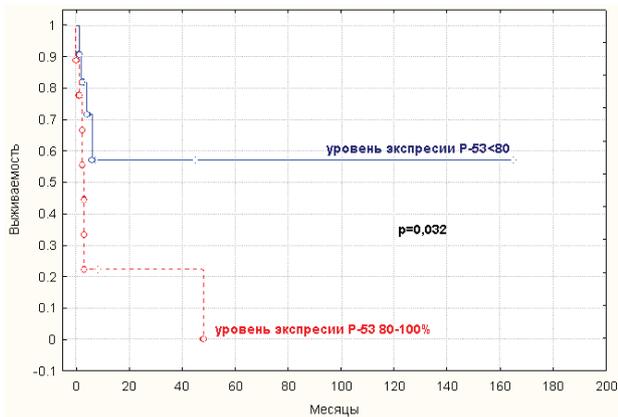


Рис. 2. Выживаемость, свободная от неудач лечения второй линии (ВСНЛ) пациентов с первично-рефрактерной формой лимфомы Ходжкина (n=20) в зависимости от уровня экспрессии P-53.

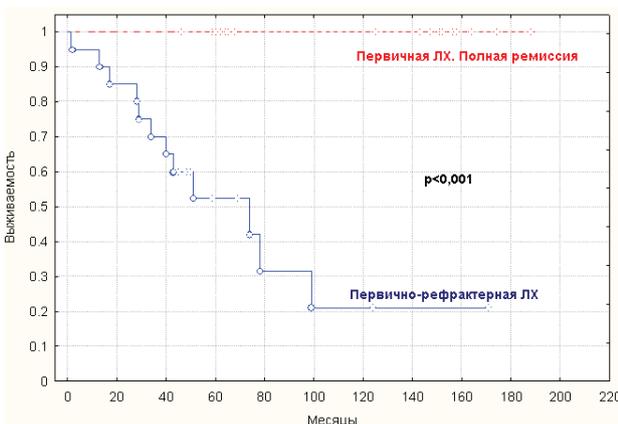


Рис. 3. Общая выживаемость (ОВ) пациентов с первично-рефрактерной формой лимфомы Ходжкина (n=20) и первичных пациентов лимфомой Ходжкина с IIAB стадиями, находящихся в полной ремиссии (n=20).

Статистически значимое неблагоприятное влияние на ВСНЛ при однофакторном анализе в группе с первично-рефрактерной ЛХ оказывал высокий уровень экспрессии

P-53 (80-100%): 3-летняя ВСНЛ с уровнем экспрессии P-53 <80% составила 58%, с уровнем экспрессии P-53 80-100%—22% (p=0,03; рис. 2). Многофакторный анализ по сравнению с однофакторным анализом не выявил статистически значимого влияния высокого уровня экспрессии P-53 (80-100%) на ВСНЛ (p=0,4).

В то же время, многофакторный анализ в отличие от однофакторного выявил статистически значимую связь экспрессии Vcl-6 с показателями ВСНЛ и ОВ (табл. 2) в группе пациентов с первично-рефрактерным течением ЛХ. Однако, эти данные не учитывались в обобщении результатов в связи с экспрессией Vcl-6 только у двух пациентов в этой группе.

Показатели 5-летней ОВ первичных пациентов ЛХ, находящихся в ПР (n=20), статистически значимо превышали показатели пациентов с первично-рефрактерным течением ЛХ (n=20) (100% против 52%) p<0,001 (рис. 3).

При однофакторном и многофакторном анализе у пациентов с первично-рефрактерным течением ЛХ (n=20) высокий уровень экспрессии P-53 (80-100%) статистически значимо связан со снижением показателей ОВ (p=0,005; p=0,036). 5-летняя ОВ у пациентов с первично-рефрактерной ЛХ и уровнем экспрессии P-53 <80% составила 78%, с уровнем экспрессии P-53 80-100%—только 22% (p=0,005). Прогностическая роль иммуногистохимического маркера P-53 активно изучается у пациентов ЛХ.

Проведенное исследование иммуногистохимических маркеров у пациентов с первично-рефрактерным течением ЛХ с II/IVAB стадиями с неблагоприятным прогнозом можно расценивать с клинических позиций как промежуточное. Для определения прогностической значимости Vcl-6, Vcl-2, c-kit, CD15, CD30, P-53, Ki-67 необходимо дальнейшее изучение иммуногистохимических маркеров у пациентов с ЛХ.

Новые подходы в лечении рефрактерных форм и рецидивов ЛХ включают моноклональные антитела (МАК) к CD30, CD20 и малые молекулы. CD30 относится к семейству рецепторов фактора некроза опухолей и экспрессируется клетками БШР. Передача сигналов через этот рецептор влияет на выживание и пролиферацию клеток БШР. Наибольшая активность из изучаемых моноклональных антител к CD30 выявлена у конъюгированных антител с токсином монометиларистатином Е (ММАЕ) (синтетический ингибитор тубулина)—SGN-35, Brentuximab Vedotin. По результатам исследований I-II фазы, при использовании SGN-35 был достигнут кли-

нический ответ у 47-75% ранее леченных пациентов ЛХ [5]. В настоящее время Brentuximab Vedotin активно изучается при резидуальных изменениях ЛХ после аутоТСК (III фаза), при повторном применении, если был ответ на предыдущее лечение (II фаза), в комбинации с ABVD в первой линии терапии ЛХ (I фаза).

Неблагоприятные факторы прогноза важно учитывать при выборе оптимального лечения с целью улучшения долговременной выживаемости и прогнозирования успеха планируемой терапии. Очевидно, индивидуальный подход может улучшить результаты лечения ЛХ. Дальнейшее изучение прогностических факторов, молекулярно-генетических, иммуногистохимических маркеров позволит стратифицировать терапию ЛХ, согласно индивидуальному профилю риска. Современная терапия ЛХ должна быть направлена на излечение в первой линии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковригина А.М. Морфологическая и иммуногистохимическая дифференциальная диагностика лимфомы Ходжкина и крупноклеточных лимфом // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М. — 2006. — 50 с.
2. Antic D., Tomin D., Cemerikic V., Boskovic D. The correlation between the immunostains for P53, Ki67, PRB, BCL-6, EBV-LMP expression and classical prognostic factors in Hodgkin lymphoma // Haematologica. — 2007. — Vol. 92 (s5). — P. 46 (Abstr. P045).
3. Axedorph U., Sjoberg J., Grimfors G. et al. Biological markers may add to prediction of outcome achieved by the International Prognostic Score in Hodgkin's disease // Ann. Oncol. — 2000. — Vol. 11. — P. 1405-1411.
4. Bargonetti J. Manfredi J.J. Multiple roles of the tumor suppressor p53 // Curr. Opin. Oncol. — 2002. — Vol. 14 — № 1. — P. 86-91.
5. Bartlett N.L., Forero-Torres A., Rosenblatt J. et al. Complete remissions with weekly dosing of SGN-35, a novel antibody-drug conjugate (ADC) targeting CD30, in a phase I dose-escalation study in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma (HL) or systemic anaplastic large cell lymphoma (sALCL) // J. Clin. Oncol. — 2009. — Vol. 27. — P. 15s (Abstr. 8500).
6. Canioni D., Deau-Fischer B., Taupin P. et al. Prognostic Significance of new immunohistochemical markers in Refractory classical Hodgkin lymphoma: a study of 59 cases // PLoS ONE. — 2009. Vol. 4. — № 7. — P. e6341.
7. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies // Semin Cancer Biol. — 1990. — Vol. 1. — № 3. — P. 99-206.
8. Gerdes J., Schwab U., Lemke H. Stein Producing of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation // Int. J. Cancer. — 1983. — Vol. 31. — № 1. — P. 13-20.
9. Mendler J.H., Friedberg J.W. Salvage therapy in Hodgkin's lymphoma // Oncologist. — 2009. — Vol. 14. — № 4. — P. 425-432.
10. Molin D., Edstrom A., Glimelius I. et al. Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma // Br. J. Hematol. — 2002. — Vol. 119. — P. 122-124.
11. Nieder C., Petersen S., Petersen C., Thames H.D. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma // Ann. Hematol. — 2001. — Vol. 80. — P. 2-8.
12. Rassidakis G.Z., Medeiros L.J., Vassilakopoulos T.P. et al. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens // Blood. — 2002. — Vol. 100. — P. 3935-3941.
13. Sarris A.H., Kliche K.O., Nadali G. Biologic factors in Hodgkin's disease: a window into prognosis and a guide for investigational therapy // Leuk. Lymphoma. — 2001. — Vol. 42 (suppl. 2). — P. 10.
14. Smolewski P., Niewiadomska H., Los E., Robak T. Spontaneous apoptosis of Reed-Sternberg and Hodgkin cells; clinical and pathological implications in patients with Hodgkin's disease // Int. J. Oncol. — 2000. — Vol. 17. — P. 603-609.
15. van Sprosen D.J., Peh S.C., Vrints L.W. et al. Clinical drug-resistant nodular sclerosing Hodgkin's lymphoma is associated with decreased bcl-2 expression in the surrounding lymphocytes and with increased bcl-2 expression in the Reed-Sternberg cells // Histopathology. — 2000. — Vol. 37. — № 5. — P. 420-426.

Поступила в редакцию 15.08.2014 г.

L.V. Filatova, M.L. Gershanovich, A.A. Plotnikova, E.A. Turkevich, A.O. Ivantsov, V.F. Klimashevsky

Immunohistochemical prognostic factors of primary refractory Hodgkin's lymphoma

N.N.Petrov Research Institute of Oncology
St. Petersburg

In order to identify immunohistochemical markers associated with primary refractory Hodgkin's lymphoma, 20 patients with primary refractory form at stage IIAB in complete remission underwent histological examination and immunohistochemical determination of Bcl-6, Bcl-2, c-kit (CD117), CD15, CD30, P-53, Ki-67. In the group with primary refractory Hodgkin's lymphoma at stage IIAB Bcl-6 expression was found in 2 patients (10%), Bcl-2 in 14 patients (70%), c-kit (CD117) in 16 patients (80%), CD15 in 9 patients (45%). The expression of CD30 and P-53 was observed in all patients in this group (100%). The expression of Ki-67 ranged from 20% to 100%, 80-100% in 16 patients (80%). As a result, multivariate analysis revealed no immunohistochemical markers of primary refractory Hodgkin's lymphoma. In univariate and multivariate analyzes in a group of primary refractory Hodgkin's lymphoma a high level P-53 expression (80-100%) was significantly associated with decreased overall survival. A 5-year overall survival in patients with Hodgkin's lymphoma with the expression level of P-53 <80% was 78%, with the expression level of P-53 80-100% — 22%. A 5-year overall survival of Hodgkin's lymphoma primary patients in complete remission significantly exceeded the rates of patients with primary refractory Hodgkin's lymphoma — 100% vs. 52%.

Key words: Hodgkin's lymphoma, immunohistochemical markers, prognostic factors, primary refractory form