

На правах рукописи

ХАРЧЕНКО

Евгения Владимировна

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
КЛИНИЧЕСКИХ, ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
ДИФФУЗНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ**

14.01.12 – онкология

14.03.02 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент **Семиглазова Татьяна Юрьевна**

кандидат медицинских наук **Артемьева Анна Сергеевна**

Официальные оппоненты:

Виноградова Юлия Николаевна, доктор медицинских наук, доцент кафедры радиологии, хирургии и онкологии, «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел лучевых и комбинированных методов лечения, руководитель, главный научный сотрудник

Байков Вадим Валентинович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория патоморфологии научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, заведующий

Ведущее учреждение: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___»_____2020 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.05.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, на сайте: <https://www.niioncologii.ru>.

Автореферат разослан «___»_____2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – это самая часто встречающаяся неходжкинская лимфома (НХЛ), на долю которой приходится около 25-50% всех случаев НХЛ. ДВККЛ – гетерогенная группа заболеваний, имеющая общие звенья патогенеза, но при этом различные клинические и иммуногистохимические (ИГХ) особенности, чувствительность к терапии и прогноз (Charuу В., 2018).

Новая классификация Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2017 года включает более 50 подтипов лимфом, различающиеся по подходам к диагностике и лечению (Swerdlow S.H., 2017).

Для четкого разделения ДВККЛ на молекулярно-генетические подтипы, согласно требованиям новой классификации ВОЗ 2017 года, необходимо выполнение трудоемких и дорогостоящих диагностических методов, включая анализ профиля экспрессии генов и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). Данные диагностические процедуры позволяют выделить высокоагрессивные подтипы В-клеточных лимфом: ДВККЛ NOS с коэкспрессией *c-myc*, *bcl-2*, ДВККЛ non-GCB подтип, а также лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах *MYC*, *BCL-2*, *BCL-6*. Однако в условиях большинства лабораторий рутинное выполнение молекулярно-генетического анализа невозможно.

Таким образом, наряду с необходимостью оценки в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года прогностической значимости клинических, ИГХ и молекулярно-генетических характеристик, необходима оптимизация алгоритма диагностики ДВККЛ в том числе на предмет наличия перестроек в генах *MYC*, *BCL-2*, *BCL-6* при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

Все вышесказанное и определило актуальность данного исследования, направленного на оптимизацию в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года четкого алгоритма разграничения различных подтипов ДВККЛ с использованием иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров с целью улучшения диагностики и лечения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой.

Степень разработанности темы исследования

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома – разнородная группа лимфом с различными ИГХ и молекулярно-генетическими особенностями (Петров С.В., 2012). Несмотря на успехи лечения после внедрения в практику моноклонального антитела

Ритуксимаб, 30-40% больных с ДВККЛ, по-прежнему, резистентны к проводимому лечению (Liu Y., 2019).

Разделение на новые молекулярные подтипы ДВККЛ NOS в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года не только помогает определить прогноз заболевания, но и позволяет применить персонализированный подход в лечении.

В ежедневной клинической практике разделение ДВККЛ NOS на ABC и GCB подтипы посредством анализа профиля экспрессии генов малодоступно, поэтому для данной цели используется ИГХ Hans-алгоритм. Согласно имеющимся литературным данным, в 79% случаев результаты использования Hans-алгоритма сопоставимы с профилем экспрессии генов (Batlle-Lopez A., 2016). Данные изменения в классификации нашли отражение в российских клинических рекомендациях по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний (Поддубная И.В., 2018).

В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6 – крайне редкий и агрессивный подтип зрелых В-клеточных лимфом, который выделен в отдельную нозологию из группы ДВККЛ посредством анализа FISH (Reddy A. et al., 2017).

Кроме того, ДВККЛ может экспрессировать белки c-myc и bcl-2, не имея перестройки в одноименных генах. Данный подтип, называемый Double-expressor (DE) лимфома или ДВККЛ с коэкспрессией c-myc и bcl-2, не был выделен в отдельную нозологическую группу в новой классификации ВОЗ 2017 года, однако, по данным ретроспективных исследований, обладает не только отличающимися ИГХ характеристиками, но и иным клиническим течением заболевания (Staiger A.M. et al., 2017).

Разделение ДВККЛ на молекулярно-генетические подтипы в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года важно не только для точной постановки диагноза, но и для применения индивидуального подхода в лечении. Данная подгруппа пациентов нуждается в более агрессивном подходе, так как результаты лечения с применением схемы «R-CHOP» остаются неудовлетворительными.

Цель исследования

Повышение эффективности диагностики и лечения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой путем определения клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик заболевания.

Задачи исследования

1. Оценить клинические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (в том числе с перестройками в генах MYC/BCL-2/BCL-6 и с коэкспрессией белков c-myc и bcl-2).
2. Оценить прогностическое значение клинических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических особенностей у больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой.
3. Оценить выживаемость без прогрессирования у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS с коэкспрессией белков c-myc, bcl-2 в сравнении с общей популяцией больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS.
4. Оптимизировать диагностический алгоритм для диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (в том числе с перестройками в генах MYC/BCL-2/BCL-6) при отсутствии возможности рутинного использования метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года.

Научная новизна исследования

1. С учетом новой классификации ВОЗ 2017 года определена прогностическая значимость клинических характеристик диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (в т.ч. наличие или отсутствие В-симптомов, стадии заболевания, первично-рефрактерного течения, экстранодального поражения).
2. Определена ранее не исследованная частота встречаемости ряда ИГХ (c-myc, bcl-2, bcl-6, p53, CD30, CD5, входящих в Hans-алгоритм) и, молекулярно-генетических маркеров (транслокаций в генах MYC, BCL-2, BCL-6) у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года.
3. В рамках новой классификации ВОЗ 2017 года определена ранее не исследованная прогностическая значимость ряда ИГХ (c-myc, bcl-2, bcl-6, p53, CD30, CD5, входящих в Hans-алгоритм) и, молекулярно-генетических маркеров (транслокаций в генах MYC, BCL-2, BCL-6) у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой.
4. С учетом новой классификации ВОЗ 2017 года оптимизирован алгоритм диагностики диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы, в том числе на предмет выявления перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выделение групп неблагоприятного прогноза диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы с помощью иммуногистохимического и молекулярно-генетического анализа позволит улучшить результаты лечения пациентов, благодаря ранней интенсификации терапии.

Внедрен оптимальный алгоритм диагностики диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года, в том числе на предмет наличия перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

Методология и методы исследования

Методологической основой квалификационного исследования является использование методов научного познания. Диссертационная работа выполнена в дизайне ретроспективного исследования с использованием анамнестических, клинических, лабораторных, рентгенологических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических данных о пациентах с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой и статистических методов анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наличие В-симптомов, первично-резистентное течение заболевания и распространенные стадии заболевания (III-IV стадии) ассоциированы с более низкими показателями выживаемости без прогрессирования у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS (новая классификация ВОЗ 2017 года).
2. Пациенты с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS и коэкспрессией c-myc и bcl-2 не продемонстрировали разницы в показателях выживаемости без прогрессирования в сравнении с группой без экспрессии, что может быть связано с проведением ранней интенсификации лечения в первой группе.
3. Экспрессия CD10 (GCB-подтип) у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS ассоциирована с меньшим риском рецидива в сравнении с пациентами без экспрессии.
4. Лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6 обнаружены не были, тогда как диффузные В-клеточные крупноклеточные лимфомы с перестройками в одном из генов: MYC или BCL-2 или BCL-6 встречались редко. С учетом этих данных был оптимизирован алгоритм диагностики диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы, в том числе на

предмет выявления перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

Степень достоверности и апробации результатов

Апробация диссертации состоялась на собрании научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с кафедрами онкологии ФГБОУ ВО СЗГМУ «Северо-Западного государственного медицинского университета имени академика И.И. Мечникова» Минздрава России. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на II онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2016); на конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Москва 2017); на постерной сессии ежегодного конгресса European Society of Medical Oncologists (Мюнхен, Германия 2018); на постерной сессии ежегодного конгресса European Blood and Marrow Transplantation Society (Лиссабон, Португалия 2018).

Результаты исследования отражены в научных статьях, внедрены и используются в практической и научно-исследовательской работе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 7 печатных работ, включая 5 работ в журналах, рецензируемых ВАК. Получена приоритетная справка на изобретение по заявке на патент РФ «Способ дифференциальной диагностики диффузных В-клеточный крупноклеточных лимфом» № 2020108031 от 21.02.2020.

Личный вклад автора

Автор участвовала в разработке дизайна исследования, проводила выполнение всех этапов работы: ведение и лечение пациентов, обобщение, интерпретацию статистических данных, выполнение иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований под руководством патоморфологов, обсуждение результатов исследования, формирование выводов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа «Прогностическое значение клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, соответствует специальностям 14.01.12 – онкология, согласно Пунктам 2 и 6; 14.03.02 – патологическая анатомия.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, результатов, выводов и практических рекомендаций. Работа содержит 16 таблиц, 51 рисунок. Библиографический указатель включает 10 отечественных и 119 зарубежных источников.

Материал и методы исследования

Характеристика больных

Научно-исследовательская работа была выполнена в научном отделе инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации (на базе отделения гематологии и химиотерапии с палатой реанимации и интенсивной терапии) и в научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Диссертационное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. В квалификационную работу были включены сведения о 215 пациентах с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ). У пациентов с ДВККЛ, которым ранее установили диагноз согласно классификации ВОЗ 2008 года, диагноз был реклассифицирован согласно новым требованиям классификации ВОЗ 2017 года.

Средний возраст составил $51,29 \pm 14,55$ лет. Более половины пациентов (53%) находились в старшей возрастной группе 50-69 лет. Среди включенных в исследование пациентов женщины составляли 54,9%, а мужчины - 45,1%. В-симптомы были отмечены у 74 пациентов (35,2%). Преобладали пациенты с IV стадией заболевания – 108 (50,5%). Экстранодальное вовлечение было зарегистрировано у 50 пациентов (23,6%). Первично-резистентное течение заболевания наблюдалось у 35 пациентов (17,5%).

В рамках квалификационного исследования пациенты получали режимы химиотерапии с ритуксимабом («R-CHOP», «R-EPOCH», «R-HyperCVAD»). По показаниям выполнялась «терапия спасения» в виде ВДХТ и АутоТКМ.

После окончания лекарственного лечения, при наличии показаний, согласно российским клиническим рекомендациям по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний, пациентам проводилась лучевая терапия на резидуальную опухоль (Поддубная И.В., 2016).

Морфологическое, иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследования

Морфологический вариант опухоли оценивался при окраске гематоксилином и эозином. Во время ИГХ анализа была оценена экспрессия ряда маркеров и уровень пролиферативной активности Ki-67 (%). Выполнена окраска в рамках Hans-алгоритма, включающего в себя маркеры CD10, tum1, bcl6, с использованием общепринятых критериев их оценки (> 30%, > 70%, > 30% соответственно).

Окраска препаратов ИГХ методом проводилась согласно стандартной операционной процедуре ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России К-1.2.1. Процедура ИГХ окраски осуществлялась на автоматизированном приборе – иммуногистостейнере BenchMark ULTRA Ventana с использованием реактивов и стандартных протоколов производителя.

Оценка экспрессии белков c-тус и bcl-2 осуществлялась с учетом опубликованных рекомендаций для маркеров. Применялись те же пороговые значения: c-тус>40% и bcl-2>50%. Пороговыми значениями для p-53 считались >75%, bcl-6 и CD10>30%. Клоны антител, использованные в настоящей работе, были идентичны.

Перестройки в генах MYC, BCL-2, BCL-6 определялись методом FISH с пробой на «break apart».

Статистический анализ

Для статистического анализа применялась программа IBMS PSS Statistics версии 17.0 с расширенным модулем для анализа выживаемости. Управление базой данных на преаналитическом этапе осуществлялось с помощью Microsoft Office Access.

Для подготовки описательного материала использовались базовые методы дескриптивной статистики.

Анализ переменных в финальной базе данных происходил с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Выбор статистических критериев осуществлялся с учетом типа переменных (количественные, ранговые либо номинативные) и распределения количественных переменных. Тип распределения количественных переменных определяли с помощью теста Колмогорова-Смирнова и визуальной оценки гистограммы частот.

С целью поиска межгрупповых различий для нормально распределенных переменных применяли методы параметрической статистики (t-тест Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ).

Анализ межгрупповых различий для ненормально распределенных величин осуществлялся с помощью непараметрических критериев типа Манна–Уитни.

Для анализа номинативных переменных при достаточном количестве данных в базе применялся критерий хи-квадрат. В случае недостаточного объема выборки применялся тест Фишера.

Также для статистического анализа при наличии зависимой номинативной переменной использовали метод бинарной логистической регрессии с вычислением отношения шансов (ОШ) и 95% доверительных интервалов.

Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Поиск связи между двумя количественными величинами осуществлялся с помощью корреляции Пирсона (для нормально распределенных переменных) и ранговой корреляции Спирмена (в случае ненормального распределения) с вычислением коэффициента корреляции.

Анализ выживаемости выполнялся с помощью стандартных методик событийного анализа. Графическое представление результатов анализа выживаемости Каплана–Майер с построением кривых выживаемости и вычислением медиан выживаемости. Анализ различий между группами происходил с применением тестов лог-ранк, Бреслоу, Тарона–Вэра. В случаях, когда медиана выживаемости в группах была достигнута, описание результатов проводилось с использованием медиан выживаемости. В случаях, когда медиана выживаемости в группах не была достигнута, для описания применялся 75% квартиль.

Сравнение рисков наступления событий в группах осуществлялось с помощью регрессионной модели Кокса с независимыми от времени ковариатами. Для каждой переменной было вычислено отношение рисков и 95% доверительных интервалов в унивариантном анализе. Для мультивариантного анализа отбирались взаимно независимые, не скоррелированные между собой переменные, которые оказали наиболее значимое влияние на зависимую переменную в унивариантном анализе. Для включения переменных в регрессионную модель применяли метод пошагового включения. Выбор наиболее качественной мультивариантной модели, максимально характеризующей выборку, осуществлялся на основании коэффициента псевдо- R^2 Нагелькерка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические характеристики диффузной в-клеточной крупноклеточной лимфомы (новая классификация ВОЗ 2017 года)

В диссертационное исследование были включены сведения о 215 пациентах с ДВККЛ. У пациентов с ДВККЛ, которым ранее установили диагноз согласно классификации ВОЗ 2008 года, диагноз был реклассифицирован согласно новым требованиям классификации ВОЗ 2017 года.

Среди включенных в исследование пациентов с ДВККЛ (новая классификация ВОЗ 2017 года) преобладали пациенты с IV стадией (50,5%), экстранодальное вовлечение было зарегистрировано у 23,6%, первично-резистентное течение – у 17,5%, В-симптомы – у 35,2% пациентов.

Иммуногистохимический анализ был выполнен 123 пациентам. Пациентам определялись как стандартные диагностические ИГХ маркеры (CD20, CD5, CD19, CD79a, PAX5) в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года, так и потенциально прогностические маркеры, входящие в Hans-алгоритм (CD10, bcl-6, tum-1), а также c-тус и bcl-2, CD30, p53.

При анализе распределения уровня экспрессии различных ИГХ маркеров (методом Холмогорова-Смирнова и при помощи визуальной оценки гистограмм) выявлено, что во всех случаях распределение является ненормальным, в связи с чем для дальнейшего анализа будут применяться методы непараметрической статистики. Выборку в данном случае лучше характеризуют медианы и квартили, однако среднее и стандартное отклонение также было рассчитано.

После выполнения Hans-алгоритма, non-GCB подтип ДВККЛ был установлен в 44 случаях (63%). Высокая пролиферативная активность с уровнем Ki-67 > 89% была обнаружена у 35 пациентов (48,6%). Экспрессия маркера CD10 была у 19/61 пациентов (31,1%), экспрессия bcl-2 – у 73/108 пациентов (67,6%). Большинство пациентов имели экспрессию bcl-6 – в 78 из 118 случаев (66,1%), и экспрессию tum-1 – 19/60 (31,7%). Экспрессия c-тус была обнаружена у 21/74 пациентов (28,4%). У 21 из 71 пациентов (29,6%) наблюдалась коэкспрессия c-тус и bcl-2 (DE лимфома), 14/39 – имели одновременную экспрессию c-тус, bcl-2, bcl-6 (35,9%). Положительная реакция с cyclin D1

наблюдалась у 4/24 пациентов (16,7%), CD5 – у 19/55 (34,5%), CD30 – у 24/66 пациентов (36,4%) (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты ИГХ анализа ДВККЛ у пациентов, включенных в исследование

ИГХ маркеры	Результат, %
Экспрессия CD20, n=61	96,7%
Экспрессия CD10, n=61	31,1%
Экспрессия bcl-6, n=118	66,1%
Экспрессия bcl-2, n=108	67,6%
Экспрессия tum-1, n=60	31,7%
Экспрессия с-мус, n=74	28,4%
Уровень Ki-67% более 89%, n=79	48,6%
Двойная экспрессия с-мус и bcl-2, n=71	29,6%
Тройная экспрессия с-мус, bcl-2 и bcl-6, n=39	35,9%
Экспрессия Cyclin D1, n=24	16,7%
Экспрессия CD5, n=55	34,5%
Экспрессия CD30, n=66	34,5%
Экспрессия p53, n=47	17%
Примечание – n – количество пациентов.	

Данные о наличии транслокаций в генах BCL-2, BCL-6 и MYC у пациентов с ДВККЛ представлены в таблице 2. В проведенном исследовании двойные транслокации обнаружены не были. Монотранслокации ДВККЛ в генах или MYC или BCL-2 или BCL-6 были выявлены у 10 (20,8%) пациентов. Это подтверждает низкую встречаемость лимфом с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6 в общей популяции больных ДВККЛ.

Таблица 2 – FISH-характеристика ДВККЛ пациентов, включенных в исследование (n=48)

Параметр	Результат, %
Транслокация в гене BCL-2	4,1%
Транслокация в гене BCL-6	12,5%
Транслокация в гене MYC	4,1%
Всего моно-транслокаций	20,8%

Оценка выживаемости без прогрессирования (ВБП) у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой

В анализ ВБП были включены сведения о 187 пациентах. Медиана времени наблюдения за пациентами составила 29 месяцев. Медиана ВБП в исследуемой выборке не была достигнута, 75% квартиль составил $32,0 \pm 11,3$ месяцев. За время наблюдения среди 187 пациентов было зарегистрировано 49 случаев рецидива заболевания (в случае достижения ремиссии) либо прогрессирования (в случае первично-рефрактерного течения).

При сравнении выживаемости пациентов в зависимости от В-симптомов медиана выживаемости не достигнута для обоих случаев. В группе наличия В-симптомов 75% квартиль составил $12 \pm 3,7$ месяцев против $56 \pm 5,2$ месяцев в группе отсутствия В-симптомов (рисунок 1), p -value при сравнении тестом Бреслоу = 0,034, Тарона-Вэра=0,043. При сравнении рисков рецидива в группах ОР=1,712, 95% ДИ [1,053-3,025], $p=0,034$.

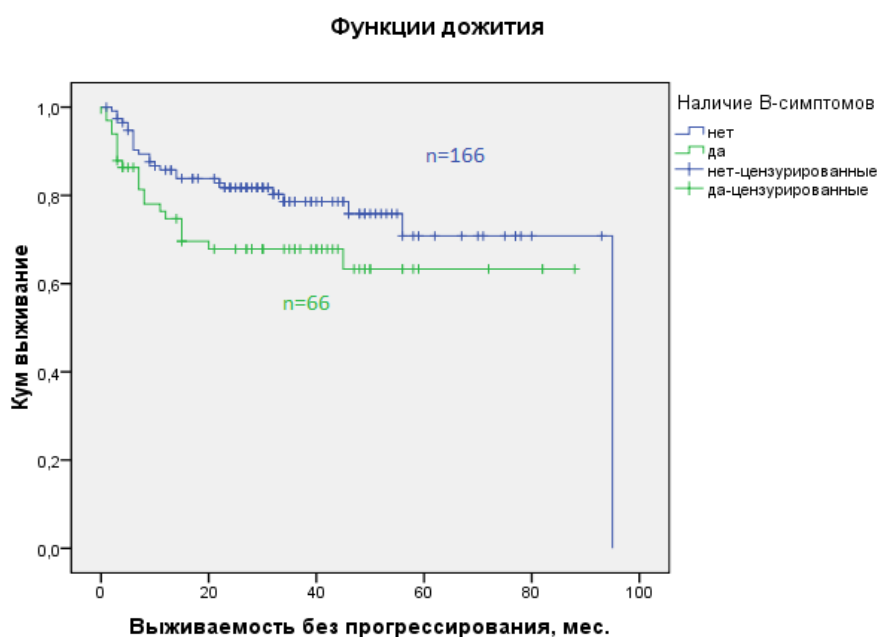


Рисунок 1 – График ВБП в зависимости от В-симптомов у пациентов с ДВККЛ.

При сравнении выживаемости в группах I-II и III-IV стадий медиана ВБП не была достигнута в обеих группах. В группе III-IV стадий 75% квартиль составил $14 \pm 7,7$ месяцев,

в группе I-II стадий – не достигнут ($p=0,016$). При сравнении рисков рецидива в группах $OR=2,241$, 95% ДИ [1,140-4,403], $p=0,016$. (рисунок 2).

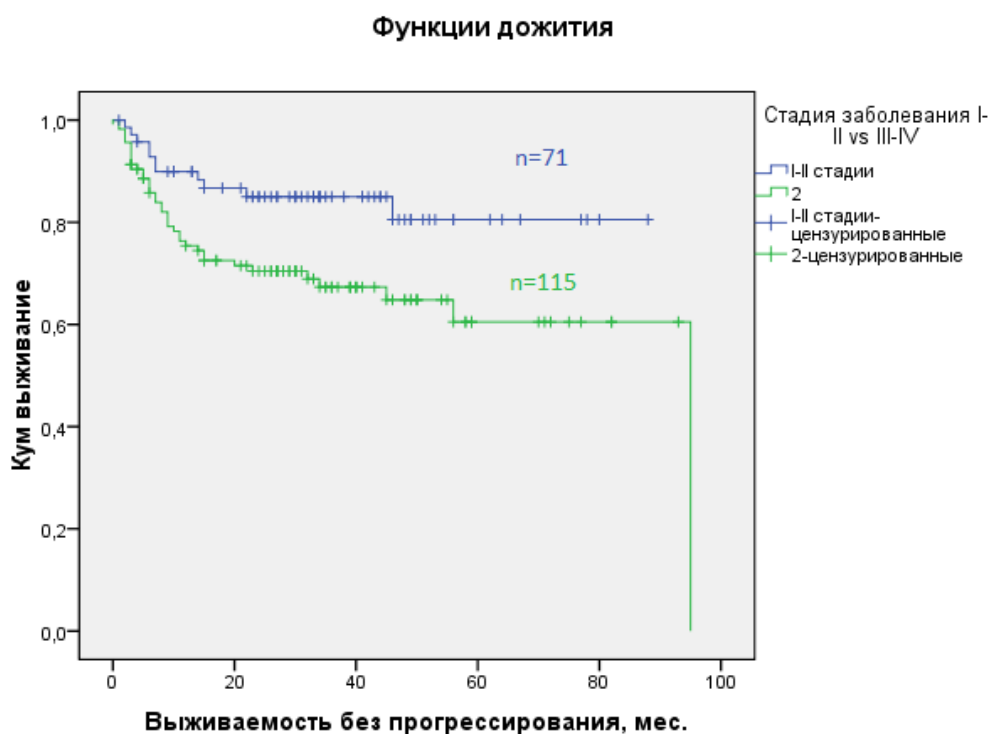


Рисунок 2 – График ВБП пациентов с ДВККЛ в зависимости от стадии.

Медиана ВБП в группе первично-рефрактерного течения ДВККЛ составила 5,0 месяцев (95% ДИ 0,00-11,2), в группе отсутствия первично-рефрактерного течения медиана и 75% квартиль не были достигнуты ($p<0,001$): $OR=36,678$, 95% ДИ [17,594-76,463], $p<0,001$ (рисунок 3).

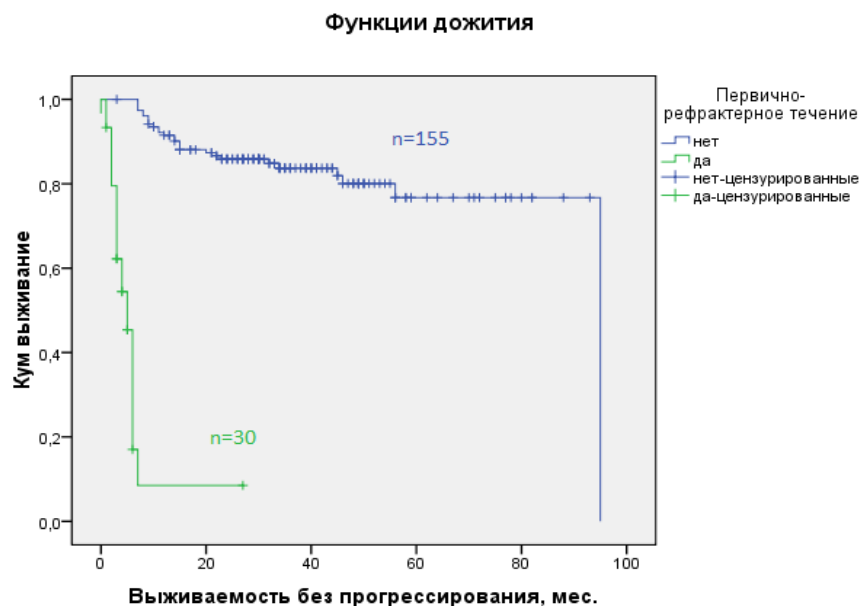


Рисунок 3 – ВВП в зависимости от первично-рефрактерного течения у пациентов с ДВККЛ.

Медиана выживаемости в группе пациентов с non-GCB ДВККЛ составила 46,0 месяцев (95% ДИ 30,1-59,3), тогда как в группе с GCB ДВККЛ медиана и 75% квартиль не были достигнуты ($p=0,171$), ОР=0,505, 95% ДИ [0,183-1,393], $p=0,107$ (рисунок 4).

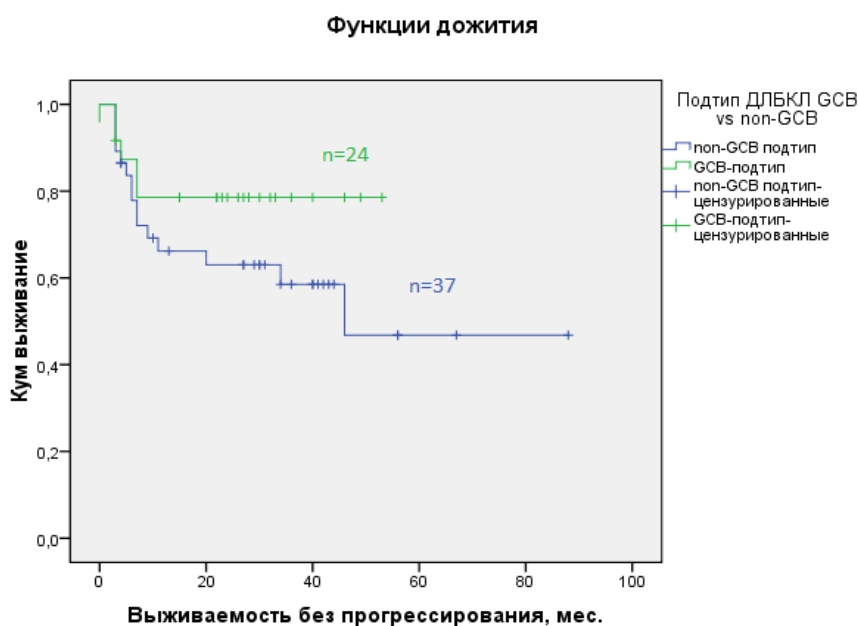


Рисунок 4 – ВВП в зависимости от подтипа ДВККЛ.

При сравнении ВБП в группах пациентов в зависимости от экспрессии CD10 медиана выживаемости не была достигнута в обеих группах. В группе отсутствия экспрессии CD10 75% квартиль составил $6,0 \pm 1,3$ месяца, в группе экспрессии CD10 75% квартиль достигнут не был ($p=0,122$) (рисунок 5).

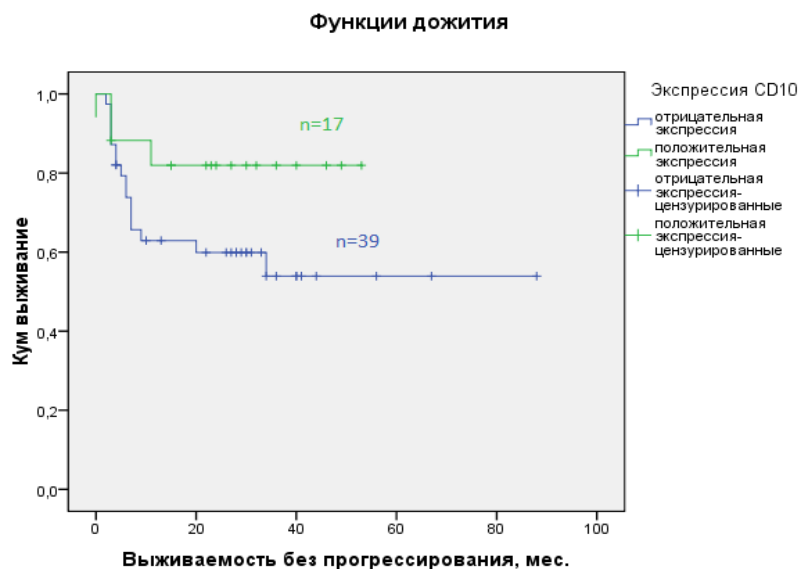


Рисунок 5 – ВБП в зависимости от экспрессии CD10 у пациентов с ДВККЛ.

При сопоставлении рисков рецидива в подгруппах обнаружены статистически значимые различия в ВБП – пациенты с экспрессией CD10 имели меньший риск рецидива в сравнении с пациентами без экспрессии, ОР=0,397,95% ДИ [0,115-0,983], $p=0,049$.

Достоверных отличий в показатели ВБП в группах с коэкспрессией и без коэкспрессии и c-тус и bcl-2 у пациентов с ДВККЛ NOS не выявлено (медиана не достигнута против $7,0 \pm 2,5$ месяцев, $p=0,605$, ОР=0,750, 95% ДИ [0,249-2,262]), что может быть связано с проведением ранней интенсификации лечения в первой группе.

Достоверных различий в выживаемости пациентов при анализе некоторых ИГХ маркеров не было обнаружено в связи применением более интенсивного подхода в терапии первой линии, включающем ВДХТ с АутоТКМ, при котором учитывалась принадлежность к GCB/нон-GCB подтипам, экспрессия c-тус и bcl-2, CD5 и уровень Ki-67, степень распространенности заболевания.

Таким образом, при унивариантном анализе на ВБП у пациентов с ДВККЛ достоверно влияли наличие у пациента В-симптомов, (ОР=1,712, 95% ДИ [1,053-3,025], $p=0,034$), распространенная стадия заболевания (ОР=2,241, 95% ДИ [1,140-4,403], $p=0,016$), первично-резистентное течение заболевания (ОР=36,678, 95% ДИ [17,594-76,463], $p<0,001$).

Мультивариантный анализ выживаемости без прогрессирования пациентов с ДВККЛ

В мультивариантный анализ были включены взаимно нескоррелированные переменные. Включение переменных осуществлялось прямым пошаговым методом. Выбор наиболее адекватной модели базировался на показателях коэффициентов Кокса-Шнель и Нагелькерке. Получившаяся прогностическая мультивариантная модель обладала достаточным качеством.

При мультивариантном анализе (таблица 3) независимыми предикторами, негативно влияющими на выживаемость, оказались первично-резистентное течение заболевания (OR=28,123, 95% ДИ [22,494-32,736], $p<0,001$), III-IV стадия заболевания (OR=4,315, 95% ДИ [1,911-5,389], $p<0,001$), наличие у пациента В-симптомов (OR=1,927, 95% ДИ [1,387-2,564], $p=0,003$) и отсутствие экспрессии CD10. Экспрессия данного маркера являлась независимым предиктором благоприятного прогноза (OR=0,397, 95% ДИ [0,115-0,983], $p=0,015$).

Таблица 3 – Результаты унивариантного и мультивариантного анализа факторов, влияющих на выживаемость без прогрессирования

Параметр	Унивариантный анализ		Мультивариантный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p-value	ОР (95% ДИ)	p-value
Пол				
Женщины	1,000	0,112*	–	–
Мужчины	1,422 [0,792-2,511]			
Возраст				
18-49 лет	1,000	0,050*	–	–
50-89 лет	1,889 [1,002-2,776]			
МПИ				
Низкий+низкий	1,000	0,869	–	–
промежуточный				
Высокий	1,075 [0,459-2,514]			
промежуточный+высокий				
Наличие В-симптомов				
Нет	1,000	0,034*	1,000	0,003
Да	1,712 [1,053-3,025]			
Стадия заболевания				
I-II	1,000	0,016*	1,000	<0,001
III-IV	2,241 [1,140-4,403]			
Наличие экстранодального вовлечения				
Да	1,000	0,661	–	–
Нет	0,850 [0,410-1,761]			

Продолжение таблицы 3

Параметр	Унивариантный анализ		Мультивариантный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p-value	ОР (95% ДИ)	p-value
Наличие вовлечения селезенки				
Да	1,000	0,866	–	–
Нет	1,105 [0,343-3,561]			
ВДХТ + аутоТКМ в 1 линии				
Нет	1,000	0,202	–	–
Да	0,466 [0,145-1,504]			
Первично-резистентное течение				
Нет	1,000	<0,001*	1,000	<0,001
Да	36,678 [17,594-76,463]		28,123 [22,494-32,736]	
Экспрессия CD10				
Нет	1,000	0,049*	1,000	0,015
Да	0,397 [0,115-0,983]		0,411 [0,101-0,914]	
Экспрессия tum-1				
Нет	1,000	0,422	–	–
Да	1,467 [0,576-3,739]			
Экспрессия bcl6				
Нет	1,000	0,207	–	–
Да	0,627 [0,304-1,295]			
Экспрессия bcl2				
Нет	1,000	0,400	–	–
Да	1,422 [0,627-3,224]			
Экспрессия с-тус				
Нет	1,000		–	–
Да	0,678 [0,225-2,048]			
коэкспрессия с-тус,bcl-2				
Да	1,000	0,610	–	–
Нет	0,605 [0,249-2,262]			
Тройная экспрессия с-тус,bcl-2, bcl-6				
Нет	1,000	0,220	–	–
Да	2,552 [0,571-11,412]			
Экспрессия CD5				
Нет	1,000	0,203	–	–
Да	1,978 [0,692-5,649]			
Экспрессия CD30				
Нет	1,000	0,801	–	–
Да	1,113 [0,430-2,983]			
Уровень экспрессии Ki-67				
0-89%	1,000	0,215	–	–
90-100%	1,483 [0,453-4,862]			

Примечание – * – переменные, которые были включены в мультивариантный анализ.

Оптимизированный алгоритм диагностики ДВККЛ с учетом новой классификации ВОЗ 2017 года в том числе на предмет наличия перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH

Рутинное проведение анализа FISH всем пациентам с ДВККЛ – достаточно трудоемкий и дорогостоящий процесс. Предложен оптимизированный алгоритм диагностики ДВККЛ с учетом новой классификации ВОЗ 2017 года в том числе на предмет наличия перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 посредством поэтапного выполнения ИГХ анализа при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH (рисунок 6).

Первым этапом в данном алгоритме является морфологическая оценка опухоли, далее определение ИГХ маркеров для подтверждения диагноза в рамках классификации ВОЗ (2017), затем разделение ДВККЛ на подтипы GCB и non-GCB посредством Hans-алгоритма. Следующий шаг – определение экспрессии c-myc и bcl-2, при подтверждении ее наличия – анализ FISH на транслокацию в гене MYC. При положительном тесте необходимо оценить наличие или отсутствие транслокации в генах BCL-2, BCL-6.

Предложенный алгоритм диагностики ДВККЛ с учетом новой классификации ВОЗ 2017 года в условиях невозможности рутинного выполнения FISH всем пациентам с ДВККЛ позволяет выделить прогностически неблагоприятную группу больных, которым потенциально необходим более агрессивный подход в терапии (рисунок 6).

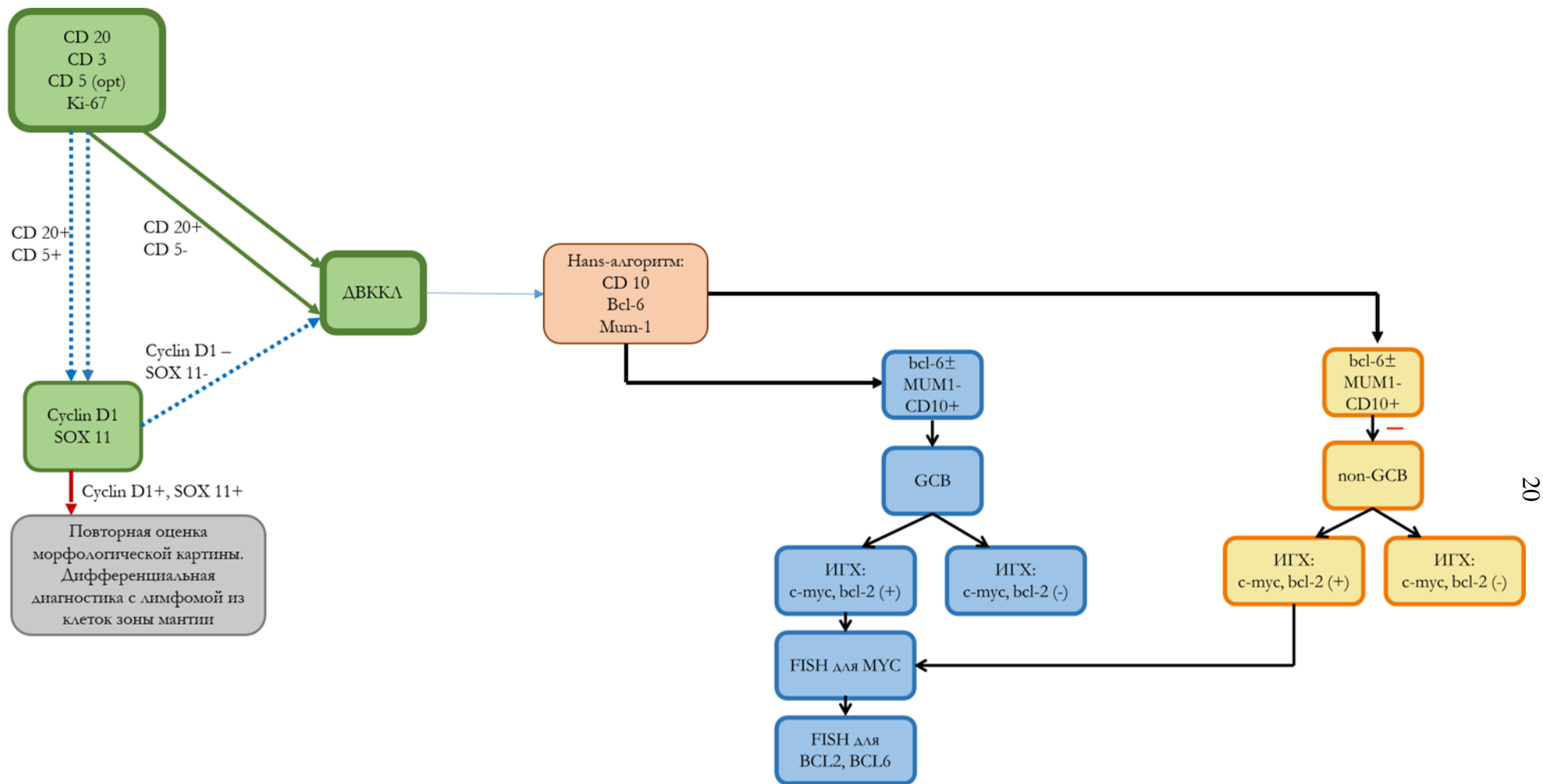


Рисунок 6 – Оптимизированный алгоритм диагностики ДВККЛ с учетом новой классификации ВОЗ 2017 года, в том числе на предмет наличия перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

ВЫВОДЫ

1. Среди включенных в исследование пациентов с ДВККЛ (новая классификация ВОЗ 2017 года) преобладали пациенты с IV стадией (50,5%), экстранодальное вовлечение было зарегистрировано у 23,6%, первично-резистентное течение – у 17,5%, В-симптомы – у 35,2% пациентов.
2. Экспрессия CD20 была зарегистрирована в 96,7% случаев, экспрессия Ki-67 > 89% – у 48,6% пациентов. Согласно новым требованиям ВОЗ 2017 экспрессия CD10 была выявлена в 31,1% случаев, bcl-2 – в 67,6%, c-тус – в 28,4%, bcl-6 – 66,1%. В 29,6% случаев наблюдалась коэкспрессия c-тус и bcl-2. Non-GCB подтип ДВККЛ был установлен в 63% случаев, GCB подтип – в 37% случаев.
3. Лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL2 и/или BCL6 (Double и Triple-hit лимфомы) не были обнаружены, ДВККЛ с перестройками в одном из генов: C-MYC или BCL2 или BCL6 встречались в 20,8% случаев.
4. ВВП была ниже в группе пациентов: с наличием В-симптомов (медиана 12 мес. против 56 мес. в группе больных без В-симптомов, $p=0,034$); у пациентов с III-IV стадиями заболевания (медиана 14 мес. против медиана не достигнута для пациентов с I-II стадиями, $p=0,016$); с первично-рефрактерным течением ДВККЛ (медиана 5,0 мес. против медиана не была достигнута при отсутствии первично-рефрактерного течения, $p<0,001$).
5. Пациенты с ДВККЛ и экспрессией CD10 (GCB-подтип) имели меньший риск развития рецидива в сравнении с пациентами без экспрессии CD10 ($p=0,049$).
6. Достоверных отличий в показатели ВВП в группах с коэкспрессией и без коэкспрессии и c-тус и bcl-2 у пациентов с ДВККЛ NOS не выявлено (медиана не достигнута против $7,0\pm 2,5$ месяцев, $p=0,605$, OR=0,750, 95% ДИ [0,249-2,262]), что может быть связано с проведением ранней интенсификации лечения в первой группе.
7. Оптимизированный в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года алгоритм позволяет диагностировать диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому с учетом перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для улучшения диагностики и лечения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) обязательным является оценка иммуногистохимических маркеров, входящих в Hans-алгоритм с целью разделения на GCB и non-GCB подтипы в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года.
2. Для оценки прогноза заболевания у пациентов с ДВККЛ согласно требованиям классификации ВОЗ 2017 года необходима оценка иммуногистохимических маркеров, таких как c-myc и bcl-2. При наличии экспрессии белков c-myc и bcl-2 выполняется молекулярно-генетическое исследование опухоли на наличие транслокаций в генах C-MYC/BCL-2/BCL-6 с использованием предложенного алгоритма диагностики. Это позволяет диагностировать прогностически неблагоприятный подтип лимфомы – В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с перестройками в генах C-MYC, BCL-2 и/или BCL-6 (впервые выделенный в новой классификации ВОЗ 2017 года).
3. Первым этапом в оптимизированном алгоритме диагностики ДВККЛ с учетом новой классификации ВОЗ 2017 года, в том числе на предмет наличия перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH, является морфологическая оценка опухоли, анализ ИГХ маркеров (CD20, CD3, CD5 (опционально), Ki-67) для подтверждения или исключения диагноза ДВККЛ, затем разделение на подтипы GCB и non-GCB с использованием Hans-алгоритма. Следующий шаг – определение экспрессии c-myc и bcl-2, при подтверждении ее наличия – анализ FISH на транслокацию в гене MYC. При положительном тесте необходимо оценить наличие или отсутствие транслокации в генах BCL-2, BCL-6. Предложенный алгоритм в условиях невозможности выполнения FISH всем пациентам с ДВККЛ поможет выделить прогностически неблагоприятную группу больных, которым потенциально необходим более агрессивный подход в терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Филатова, Л.В.** Высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток в лечении прогностически неблагоприятных форм диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы / Л.В. Филатова, Е.В. Харченко, С.М. Алексеев [и др.] // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63, № 2. – С. 326-328.
2. Харченко, Е.В. Дифференциальная диагностика лимфом средостения / Е.В. Харченко, Т.Ю. Семиглазова, А.С. Артемьева [и др.] // Медицинский совет. – 2017. – № 6. – С. 124-131.
3. Харченко, Е.В. Прогностическое значение иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы / Е.В. Харченко, А.С. Артемьева, И.Л. Поляцкин [и др.] // Медицинский алфавит. – 2019. – Т. 2, № 17. – С. 5.
4. Харченко, Е.В. Прогностическая значимость клинических характеристик диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы / Е.В. Харченко, Т.Ю. Семиглазова, А.С. Артемьева [и др.] // Медицинский Совет. – 2019. – Т. 19. – С. 158-164.
5. Харченко, Е.В. Прогностическая значимость иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы / Е.В. Харченко, Т.Ю. Семиглазова, А.С. Артемьева [и др.] // Вопросы онкологии. – 2020. – Т. 66 № 1. – С. 79-89.
6. Kharchenko, E.V. Poor outcome of double-protein expressor diffuse large B-cell lymphoma / E.V. Kharchenko, T.Y. Semiglazova, A.S. Artemeva [et al.] // Ann. Oncology. – 2018. – Vol. 29, Suppl. 8. – P. viii359-viii371.
7. Kharchenko, E. Mediastinal gray zone lymphoma-morphologically heterogenous group of lymphomas / E. Kharchenko, T. Semiglazova // J. Clin. Oncol. – 2017. – Vol. 35, Suppl. – Abstr. e19050.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АутоТКМ	– аутологичная трансплантация костного мозга
БРВ	– безрецидивная выживаемость
ВБП	– выживаемость без прогрессирования
ВДХТ	– высокодозная химиотерапия
ВОЗ	– Всемирная Организация Здравоохранения
ДВККЛ	– диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома
ДВККЛ NOS	– диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома Not otherwise specified (без дополнительного уточнения)
ИГХ анализ	– иммуногистохимический анализ
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
МПИ	– Международный Прогностический Индекс
НХЛ	– Неходжкинская лимфома
ОВ	– общая выживаемость
ЦНС	– центральная нервная система
АВС	– activated B-cell – из клеток с фенотипом активированных В-клеток
Vcl-2	– B-cell lymphoma 2 – белок В-клеточной лимфомы 2
Vcl-6	– B-cell lymphoma 6 – белок В-клеточной лимфомы 6
DE	– double expressor – двойная экспрессия, коэкспрессия
DN	– double-hit – лимфома с двойной транслокацией
ECOG	– Eastern Cooperative Oncology Group – Восточная группа по оценке общесоматического статуса онкологического пациента
FISH	– Fluorescence in situ Hybridization – флуоресцентная гибридизации in situ
GCB	– Germinal B-cell like – лимфома с фенотипом клеток герминального центра
MYC	– myelocytomatosis viral oncogene homolog – клеточный гомолог вирусного онкогена
SH	– single-hit – лимфома с единственной транслокацией
TH	– triple-hit – лимфома с тремя транслокациями