

На правах рукописи

ВАНЕЕВА ЕЛЕНА ВИКТОРОВНА

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ pSTAT3, pAKT1, pSyk ПРИ ДИФФУЗНОЙ
В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ

14.01.21 - гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КИРОВ – 2021 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»

Научный руководитель

кандидат медицинских наук

Росин Виталий Анатольевич

Официальные оппоненты:

Байков Вадим Валентинович, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, заведующий лабораторией патоморфологии института детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой

Ковригина Алла Михайловна, доктор биологических наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства».

Ведущая организация:

Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева)

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.074.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России) по адресу: 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д.16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (www.bloodscience.ru).

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

Глазанова Т. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) является наиболее распространенным типом неходжкинских лимфом. Заболевание характеризуется различными темпами прогрессирования, неодинаковой выживаемостью больных и чувствительностью к терапии [S. H. Swerdlow, 2016; S. Li, 2018].

В настоящее время для оценки индивидуального риска раннего прогрессирования болезни используются клинические критерии: международный прогностический индекс (МПИ), стадирование и другие. Однако они не всегда позволяют точно предсказать характер дальнейшего течения патологического процесса у каждого конкретного больного. Поэтому поиск информативных биологических маркеров, определяющих прогноз заболевания и одновременно способных выступать в качестве мишеней для средств таргетной терапии, несомненно, следует считать актуальной задачей медицинской науки [D. Morgensztern, 2005; К. Д. Капланов, 2019].

В последние годы накапливается все больше данных об участии различных сигнальных путей в патогенезе ДВККЛ. Наибольшее внимание уделяется каскадам JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTOR, передаче сигнала через В-клеточный рецептор (BCR). Показано, что степень экспрессии ключевых молекул-посредников (pSTAT3, pAKT1 и pSyk) этих путей влияет на биологическое поведение опухолевых клеток и может определять прогноз заболевания [J. N. Loretta, 2012; Sh. Li, 2018].

Имеется ряд иностранных научных работ, свидетельствующих о связи бесконтрольной активации названных сигнальных молекул с течением ДВККЛ [Z. I. Wu., 2016; J. Y. Hong, 2014]. Вместе с тем результаты исследований прогностической значимости белков pSTAT3, pAKT1, pSyk при этой патологии неоднозначны и противоречивы. Недостаточно информации о роли сочетанной экспрессии этих маркеров, их взаимосвязи с продукцией других онкобелков. В отечественных публикациях изучение указанных сигнальных молекул проводили

преимущественно при солидных опухолях, сведения о значении их экспрессии при ДВККЛ отсутствуют, что подчеркивает актуальность исследования.

Степень разработанности темы

На сегодняшний день имеются немногочисленные научные данные, указывающие на наличие ассоциативной связи отмеченных биомаркеров с неблагоприятным прогнозом ДВККЛ при лечении по протоколу R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон) [J. P. Wang, 2017; H. Liu, 2016; H. J. Kwon, 2018; S. H. Cheng, 2014]. Предпринимаются попытки оценить значение дифференцированной экспрессии маркеров при прогнозировании течения заболевания [X. Huang, 2013; L. Dong, 2016; B. V. Ding, 2008; J. Y. Hong, 2014]. По мнению ряда авторов, указанные белки является потенциальной мишенью для новых средств таргетной терапии при ДВККЛ [M. Krstic, 2018; Sh. Li, 2018; H. Yu, 2009]. В то же время наблюдается значительный разброс результатов исследований, который может быть обусловлен отсутствием унифицированных критериев для определения пороговых значений экспрессии белков, сопутствующей коморбидностью, разным объемом выборок. Сведения об ассоциации экспрессии pSTAT3, pAKT1, pSyk с продукцией других онкобелков малочисленны и противоречивы. Отсутствует информация о взаимосвязи коэкспрессии анализируемых биомаркеров с течением ДВККЛ.

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилась оценка прогностического значения экспрессии белков pSTAT3, pAKT1 и pSyk у больных ДВККЛ.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать экспрессию pSTAT3, pAKT1, pSyk в опухолевом субстрате больных ДВККЛ. Определить оптимальный прогностически значимый пороговый уровень их экспрессии.
2. Изучить ассоциацию биомаркеров pSTAT3, pAKT1, pSyk с морфологией опухолевых клеток, иммуногистохимическими подтипами опухоли, экспрессией онкобелков c-Myc, p53, BCL2.

3. Оценить взаимосвязь экспрессии pSTAT3, pAKT1, pSyk и с клинико-лабораторными характеристиками заболевания.
4. Определить ассоциацию изолированной и сочетанной экспрессии белков pSTAT3, pAKT1, pSyk с общей и беспрогрессивной выживаемостью больных. Оценить прогностическое значение биомаркеров pSTAT3, pAKT1, pSyk при ДВККЛ.

Научная новизна

Получены новые данные о прогностической значимости экспрессии белков pSTAT3, pAKT1 и pSyk при ДВККЛ. Определены оптимальные пороговые значения экспрессии исследуемых маркеров. Установлено, что гиперэкспрессия маркеров pSTAT3 и pAKT1 позволяет прогнозировать низкую общую и беспрогрессивную выживаемость у больных ДВККЛ, а также ассоциируется с надпороговым уровнем белков c-Myc, p53. Определено, что количество pAKT1-позитивных опухолевых клеток, превышающее 70%, является независимым неблагоприятным критерием прогноза ДВККЛ. Получены новые данные о том, что сочетанная гиперэкспрессия pSTAT3/pAKT1, pSTAT3/pSyk и pAKT1/pSyk связана с более высоким риском неблагоприятного течения заболевания, чем в случаях с монотипической экспрессией указанных белков.

Практическая и теоретическая значимость работы

Полученные данные способствуют расширению представлений о биологических особенностях развития ДВККЛ, а также выделению групп пациентов, нуждающихся в интенсификации терапии. Предложены дополнительные прогностические критерии течения данной нозологии. Обнаружено, что наличие гиперэкспрессии белков pSTAT3, pAKT1, pSyk с учетом установленных пороговых значений (pSTAT3 \geq 68%, pAKT1 \geq 70%, pSyk \geq 28% опухолевых клеток), позволяет выделять прогностически неблагоприятные группы пациентов уже в дебюте заболевания. Результаты исследования могут быть использованы в гематологических и патологоанатомических отделениях, патоморфологических лабораториях, бюро

судебно-медицинских экспертиз, а также в образовательном процессе на медицинских и биологических факультетах ВУЗов.

Методология и методы исследования

При выполнении работы использовались: ретроспективный, статистический, лабораторные методы. Объект исследования – пациенты с впервые установленным диагнозом ДВККЛ, получавшие терапию 1 линии по схеме R-СНОР. Изучаемые явления – экспрессия белков pSTAT3, pAKT1, pSyk на опухолевых клетках ДВККЛ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Надпороговые уровни экспрессии pSTAT3 и pAKT1 ассоциируются с неблагоприятными клинико-биологическими характеристиками заболевания и низкой ОВ и БПВ.
2. Гиперэкспрессия pSTAT3 (пороговое значение – 68% опухолевых клеток) и pAKT1 (пороговое значение – 70% опухолевых клеток) может рассматриваться в качестве дополнительного критерия неблагоприятного прогноза течения ДВККЛ.
3. Биомаркер pAKT1 является независимым прогностическим фактором течения ДВККЛ.
4. Сочетанная гиперэкспрессия маркеров pSTAT3, pAKT1, pSyk связана с более низкими показателями ОВ и БПВ по сравнению с их изолированной экспрессией.

Степень достоверности и апробация работы

Диссертация основана на большом клинико-лабораторном материале (100 больных, 1600 исследований с учетом диагностической панели антител). Степень достоверности результатов проведенной научной работы подтверждается использованием поверенного лабораторного оборудования, статистических программ для обработки качественных и количественных данных, соответствующих цели и задачам исследования, а также применением современных высокочувствительных методик.

Основные положения научной работы были представлены на научно-практической конференции молодых ученых (Киров 2018, диплом 1 степени в конкурсе работ молодых ученых), межрегиональной научно-практической

конференции «Вопросы терапии рефрактерных/рецидивирующих лимфом» (Киров 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований. Опубликовано 3 тезиса, в том числе 1 в зарубежной печати. По результатам работы получены 2 патента Российской Федерации (№2694838 от 17.07.2019; №2710591 от 30.12.2019).

Внедрение

Результаты исследования использованы при подготовке методических рекомендаций «Иммуногистохимические прогностические маркеры ответа на противоопухолевую терапию при злокачественных лимфомах» МР ФМБА России 11. 20-25 (утв. ФМБА 04.07.2020). Разработанные методы внедрены в практику лаборатории патоморфологии, клинико-диагностического, а также взрослого отделений гематологии и химиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», патологоанатомического отделения КОГКБУЗ «Центр онкологии и медицинской радиологии», патологоанатомического отделения КОГБСЭУЗ «Кировское областное бюро судебно-медицинской экспертизы».

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 146 источников, из которых 35 – отечественных авторов, 111 – зарубежных. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 16 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены в период с 2012 по 2018 гг. на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, директор – д-р.мед.наук. И. В. Парамонов).

В научную работу было включено 100 пациентов с впервые установленным диагнозом ДВККЛ, получавших терапию 1 линии по схеме R-СНОР. Диагностику заболевания проводили в соответствии с Классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения 2008-2017 гг. [Н. Swerdlow, 2017]. Для проведения исследований использовали первичный биологический материал, полученный до начала лечения. Характер и тяжесть процесса оценивали ретроспективно с помощью врачей клинико-диагностического отделения гематологии и химиотерапии по клиническим данным историй болезни и амбулаторного наблюдения, включающим жалобы, анамнез, физикальные, лабораторные и инструментальные методы исследования (руководитель С. В. Самарина).

Медиана (Ме) возраста обследованных составила 59 лет. Распределение больных по полу было сопоставимым (49 – мужчин, 51 – женщина). У большей части пациентов (59 из 100) в дебюте заболевания регистрировались В-симптомы, у 41 больного они отсутствовали. В 60% случаев болезнь диагностирована на распространенных стадиях (III-IV), в 40% – на I-II стадиях. Стадирование ДВККЛ проводили согласно классификации Ann Arbor. Общее состояние пациентов оценивали по шкале ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) [И. В. Поддубная, 2018]. У подавляющей части больных (95 обследованных) соматический статус соответствовал значениям 0-1 и 2 баллам.

Все обследуемые стратифицированы на 2 группы согласно бальной системе оценки МПИ. Преобладали пациенты с низкими и промежуточно низкими значениями прогностического индекса (группа 1, n=55), меньшую долю составили больные с промежуточно высоким и высоким риском (группа 2, n=45). Полный

ответ на терапию 1 линии R-СНОР достигнут в 62 случаях, неудачи терапии зарегистрированы у 38 пациентов. За период наблюдения летальный исход констатирован у 35 обследуемых, продолжают наблюдение 65 больных.

В качестве материала для исследования использовали архивные образцы (парафиновые блоки) лимфоузлов или других, вовлеченных в патологический процесс органов, а также материал послеоперационных биопсий. Гистологическую и иммуногистохимическую верификацию диагноза ДВККЛ выполняли врачи-специалисты лаборатории патоморфологии (заведующий лабораторией – канд.мед.наук. Д. А. Дьяконов). Все препараты окрашивали гематоксилином и эозином стандартным способом [Д. С. Саркисов, 1996]. С помощью световой микроскопии в приготовленных срезах оценивали гистологическую структуру и морфологию клеток, входящих в состав биоптата, с идентификацией морфологических вариантов заболевания.

Постановку иммуногистохимических (ИГХ) реакций осуществляли непрямой пероксидазным методом по стандартной методике в соответствии с протоколом для систем визуализации EnVISION (DAB+, «Dako»), с использованием широкой диагностической панели антител. Для детекции pSTAT3, pAKT1 и pSyk в опухолевых клетках гистологические срезы инкубировали с соответствующими моноклональными антителами. ИГХ подтип опухоли определяли на основании алгоритма С. Р. Hans. В 35 случаях установлен GCB-подтип ДВККЛ, в 65 – non-GCB. У всех больных количественно оценивали экспрессию антигенов c-Myc, BCL2 и p53 на опухолевых клетках. Подсчет доли опухолевых клеток, экспрессирующих белки pSTAT3, pAKT1 и pSyk в гистологических срезах проводили морфометрическим способом, с помощью двойного «слепого» анализа на световом микроскопе «AxioScope.A1» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) со встроенной фото/видеокамерой и программным обеспечением анализа изображений.

Статистическую обработку данных осуществляли с применением статистической программы IBM SPSS Statistics 26. В работе использовали определение Me с интерквартильным размахом [Q_1 - Q_3], критерий хи-квадрат (χ^2) Пирсона, точный двусторонний критерий Фишера (F), критерий Манна-Уитни.

Пятилетнюю ОВ и БПВ анализировали по методу Каплана-Мейера с графическим построением соответствующих кривых и расчетом логарифмического рангового критерия (log-rank test). С целью выявления независимых факторов прогноза ДВККЛ применяли метод регрессии Кокса. Оптимальный пороговый уровень экспрессии для каждого из исследуемых биомаркеров устанавливали с помощью ROC-анализа. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика экспрессии pSTAT3, pAKT1, pSyk и определение ее порогового уровня у больных ДВККЛ

В опухолевом субстрате больных ДВККЛ определена ядерная локализация экспрессии белков pSTAT3 и pAKT1. При изучении pSyk выявлен цитоплазматический тип его распределения в неопластических клетках (рисунок 1).

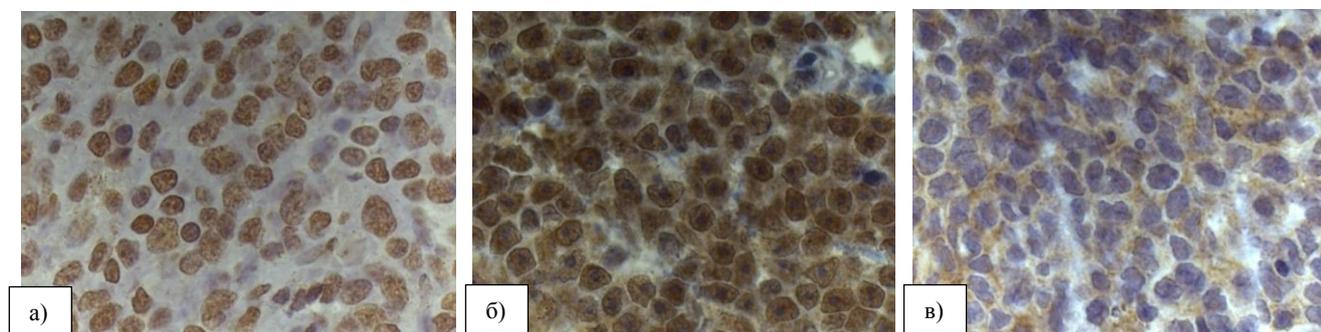


Рисунок 1 – а) ядерная экспрессия pSTAT3; б) ядерная экспрессия pAKT1;
в) цитоплазматическая экспрессия pSyk

Для всех биомаркеров были характерны выраженные колебания процентного содержания позитивных лимфоидных элементов в биоптатах. С помощью ROC-анализа установлено оптимальное пороговое значение относительного количества опухолевых клеток, экспрессирующих анализируемые белки (рисунок 2). Для pSTAT3 оно составило 68%, для pAKT1 — 70%, для pSyk — 28%.

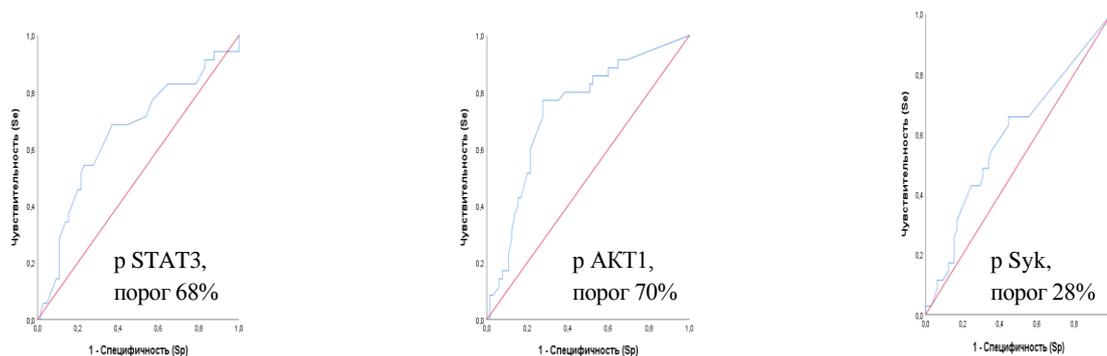


Рисунок 2 - ROC-кривые для маркеров: pSTAT3 (а), pAKT1 (б), pSyk (в)

С учетом данных значений всех обследуемых разделили на 2 группы: первую составили пациенты с долей позитивно-маркированных В-лимфоцитов, превышающей пороговый уровень (высокая или гиперэкспрессия), вторую - больные, у которых относительное число экспрессирующих клеток было ниже порогового значения (низкая экспрессия). Провели сопоставительный анализ с биологическими параметрами опухоли, а также выраженностью клинических проявлений заболевания.

**Взаимосвязь экспрессии pSTAT3, pAKT1, pSyk с морфологией
неопластических клеток, иммуногистохимическими подтипами опухоли,
экспрессией онкобелков c-Мус, p53, BCL2**

В результате анализа установлен ряд закономерностей, которые в основном были связаны с особенностями экспрессии биомаркеров pSTAT3 и pAKT1 (рисунок 3). Выявлено достоверное преобладание гиперэкспрессии pSTAT3 у пациентов с non-GCB вариантом ДВККЛ по сравнению с обследуемыми, имевшими GCB подтип заболевания ($p=0,020$; $OR=2,7$; $95\% CI=1,03-2,65$). Схожие результаты получены при исследовании pAKT1. Низкая выраженность данного маркера в 1,7 раза чаще выявлялась при крупноклеточной лимфоме герминального происхождения, чем при non-GCB варианте патологического процесса. Напротив, гиперэкспрессия pAKT1 статистически значимо превалировала у пациентов с non-GCB подтипом заболевания ($p=0,003$; $OR=3,9$; $95\% CI=1,55-9,95$).

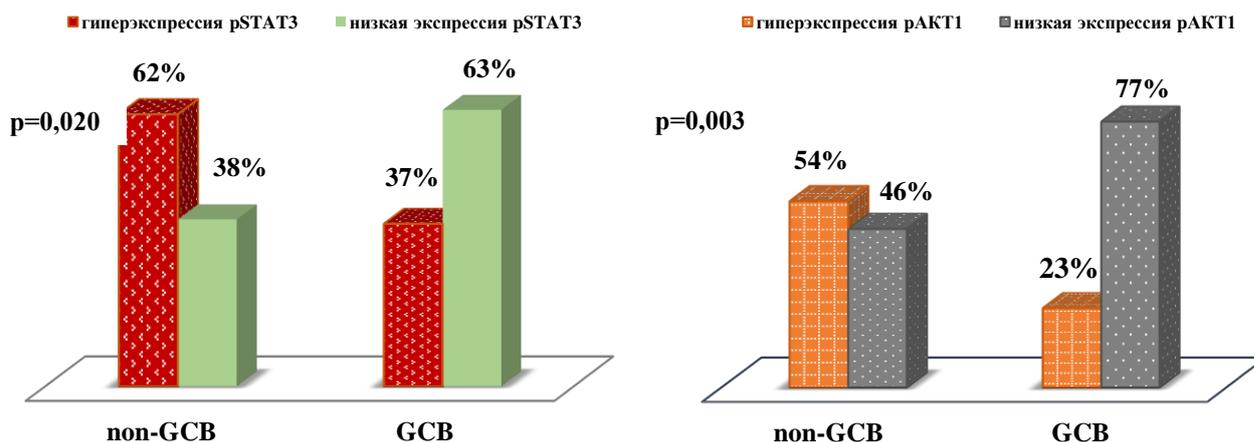


Рисунок 3 - Распределение вариантов экспрессии pSTAT3 и pAKT1 в группах пациентов с разными ИГХ подтипами ДВККЛ

На основании полученных данных можно заключить, что высокий уровень экспрессии биомаркеров pSTAT3, pAKT1 ассоциируется с прогностически неблагоприятным non-GCB подтипом ДВККЛ. При анализе pSyc межгрупповых различий не обнаружено.

Изучена возможная взаимосвязь исследуемых молекул сигнальных путей с характером экспрессии белков c-Myc, p53 и BCL2 (таблица 1). Установлено, что надпороговая экспрессия pSTAT3 почти в 2 раза чаще определялась в группе пациентов с уровнем c-Myc \geq 40%, чем у больных с более низкой степенью выраженности данного онкобелка (p=0,015; OR=3,9; 95% CI=1,33-11,8). Частота встречаемости гиперэкспрессии pSTAT3 была значительно выше у больных с p53-позитивным статусом, чем у обследуемых с низкой экспрессией p53 (p=0,010; OR=2,8; 95% CI=1,1-2,4).

При изучении pAKT1 определено, что его высокая экспрессия достоверно чаще регистрировалась в группе пациентов с уровнем c-Myc \geq 40% в сравнении с больными, имевшими экспрессию c-Myc<40% (p=0,014; OR=3,8; 95% CI=1,39-10,5). Гиперэкспрессия биомаркера в 1,9 раза чаще встречалась у обследуемых с относительным содержанием p53-позитивных опухолевых клеток в биоптатах \geq 30%, чем в группе пациентов с подпороговым уровнем p53 (p=0,008; OR=3,0; 95% CI=1,33-7,01).

Таблица 1 - Ассоциация pSTAT3, pAKT1 с экспрессией белков c-Мус, p53 и BCL2

Онкомаркеры		Экспрессия pSTAT3		p	Экспрессия pAKT1		p
		Высокая n=53, абс.(%)	Низкая n=47, абс.(%)		Высокая n=43, абс.(%)	Низкая n=57, абс.(%)	
c-Мус	≥40%	17 (77,3)	5 (22,7)	0,015*	15 (68,2)	7 (31,8)	0,014*
	<40%	36 (46,2)	42 (53,8)		28 (35,9)	50 (64,1)	
p53	≥30%	34 (65,4)	18 (34,6)	0,010*	29 (55,8)	23 (44,2)	0,008*
	<30%	19 (39,6)	29 (60,4)		14 (29,2)	34 (70,8)	
BCL2	≥50%	32 (52,5)	29 (47,5)	0,892	25 (40,9)	36 (59,1)	0,610
	<50%	21 (53,8)	18 (46,2)		18 (46,2)	21 (53,8)	

*- различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

Таким образом, установлена ассоциация между гиперэкспрессией биомаркеров pSTAT3, pAKT1 и высоким содержанием в опухолевых клетках транскрипционных факторов c-Мус и p53. Ассоциации pSTAT3, pAKT1, pSyk с экспрессией BCL2, а также морфологией опухолевых клеток не установлено.

Взаимосвязь экспрессии pSTAT3, pAKT1, pSyk

с клинико-лабораторными характеристиками заболевания

Проанализирован характер распределения вариантов экспрессии биомаркеров pSTAT3, pAKT1, pSyk в группах пациентов с различной выраженностью проявлений патологического процесса. При этом наиболее значимые закономерности обнаружены для белка pAKT1. Установлено, что низкая экспрессия данного маркера достоверно чаще встречалась среди больных, у которых ДВККЛ была выявлена на I и II стадиях (рисунок 4). Напротив, гиперэкспрессия белка преобладала у пациентов с III-IV стадиями заболевания ($p=0,011$; $OR=0,3$; $95\% CI=1,11-3,38$). Высокая экспрессия pAKT1 значительно чаще выявлялась у обследуемых с МПИ>2 баллов, по сравнению с больными, имевшими низкие значения этого показателя ($p=0,007$; $OR=3,0$; $95\% CI=1,34-6,96$).

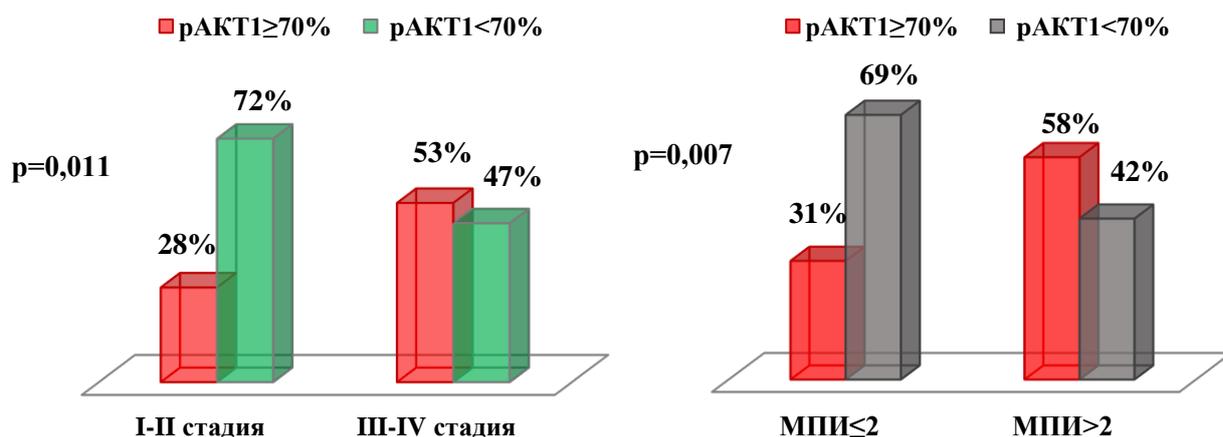


Рисунок 4 - Ассоциация экспрессии pAKT1 со стадиями заболевания и МПИ

Выявлена взаимосвязь экспрессии pSTAT3 с уровнем лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови больных ДВККЛ. Частота встречаемости гиперэкспрессии белка достоверно выше у пациентов с высокой концентрацией фермента, чем у обследуемых с уровнем ЛДГ, соответствующим норме ($p=0,033$; OR=2,5; 95% CI=1,07-6,01).

Для белков pAKT1 и pSTAT3 отмечено, что их надпороговый уровень экспрессии преобладал в группе пациентов с частичным ответом, рецидивом или прогрессией заболевания, в сравнении с больными, достигшими полной ремиссии ($p=0,019$; OR=2,7; 95% CI=1,17-6,16 и $p=0,045$; OR=2,3; 95% CI=1,01-5,38, соответственно; рисунок 5).

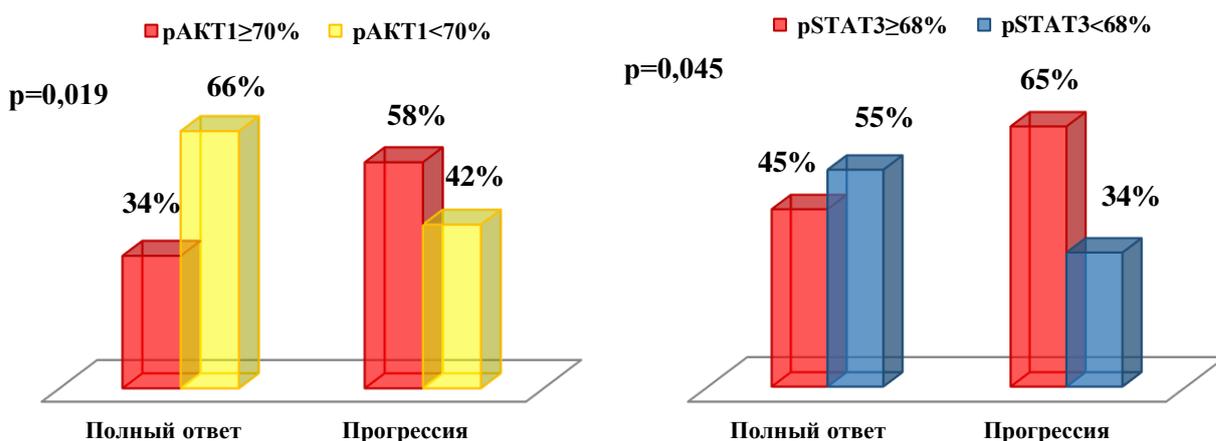


Рисунок 5 - Связь экспрессии pAKT1 и pSTAT3 с ответом на лечение

Таким образом, получены результаты, указывающие на взаимосвязь гиперэкспрессии биомаркеров pSTAT3 и pAKT1 с прогностически

неблагоприятными клинико-лабораторными характеристиками ДВККЛ. При изучении pSyk такой зависимости не обнаружено.

Ассоциация монотипической экспрессии pSTAT3, pAKT1, pSyk с общей и беспрогрессивной выживаемостью больных ДВККЛ

В ходе исследования выявлена достоверная взаимосвязь экспрессии белка pSTAT3 с выживаемостью больных ДВККЛ, получавших лечение по протоколу R-CHOP (рисунок 6). Установлено, что 5-летняя ОВ в группе больных с гиперэкспрессией pSTAT3 соответствовала 54,7% (Me=50 мес.) против 76,6% (Me не достигнута) – с низкой экспрессией белка. У пациентов с высокой экспрессией маркера риск летального исхода был в 2,4 раза выше, чем у обследуемых с подпороговым уровнем pSTAT3 ($p=0,015$; HR=2,4; 95% CI=1,15-4,87).

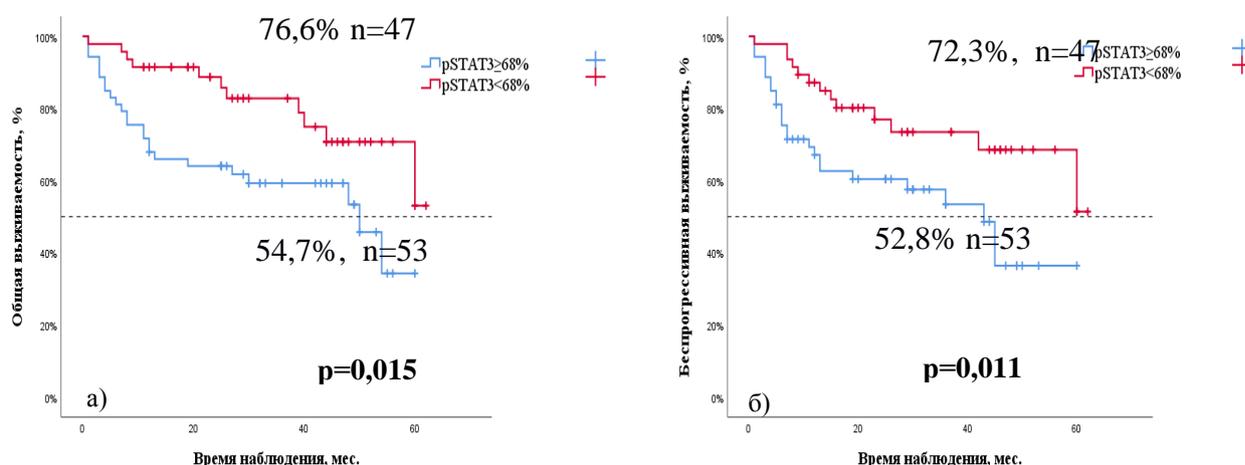


Рисунок 6 – ОВ (а) и БПВ (б) больных ДВККЛ в зависимости от экспрессии pSTAT3

Значение БПВ у больных с гиперэкспрессией pSTAT3 было в 1,4 раза ниже по сравнению с группой обследуемых, имевших низкую степень выраженности биомаркера в опухолевой ткани: 52,8% (Me=42 мес.) и 72,3% (Me не достигнута), соответственно. Риск рецидива и/или рефрактерности к терапии в случаях с высокой выраженностью pSTAT3 был в 2,2 раза выше по отношению к пациентам с подпороговым уровнем его экспрессии ($p=0,011$; HR=2,2; 95% CI=1,14-4,41).

Значимые межгрупповые различия установлены при оценке 5-летней ОВ в группах обследуемых с дифференцированной экспрессией pAKT1 (рисунок 7).

Показатели ОВ статистически значимо отличались в группах больных с высокой и низкой экспрессией маркера: 41,2% (Me=21 мес.) и 82,5% (Me не достигнута), соответственно). Риск наступления летального исхода у лиц с гиперэкспрессией pAKT1 был в 5,7 раза выше, по сравнению с группой пациентов, у которых зарегистрирован низкий уровень его экспрессии ($p<0,001$; HR=5,7; 95% CI=2,65-12,49).

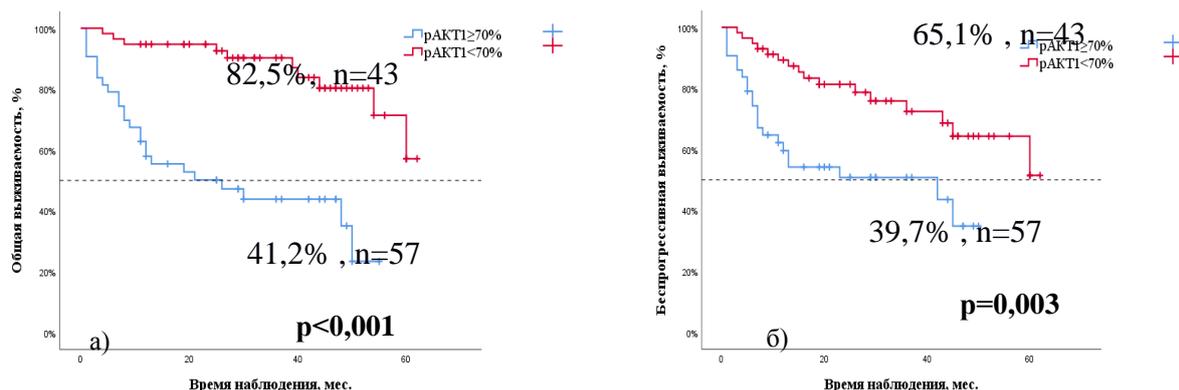


Рисунок 7 - ОВ (а) и БПВ (б) больных ДВККЛ в зависимости от экспрессии pAKT1

В группе обследуемых с надпороговым уровнем экспрессии pAKT1 показатель БПВ соответствовал 39,7% (Me=41 мес.) против 65,1% (Me не достигнута) у больных с низкой выраженностью маркера. При этом вероятность развития рецидива/прогрессии ДВККЛ у пациентов с гиперэкспрессией белка была в 2,7 раза выше ($p=0,003$; HR=2,7; 95% CI=1,42-5,33).

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что биомаркеры pAKT1 и pSTAT3 являются предикторами неблагоприятного течения ДВККЛ. Статистически значимой ассоциации дифференцированной экспрессии pSyc с ОВ и БПВ не выявлено.

Ассоциация сочетанной экспрессии pSTAT3, pAKT1, pSyc с общей и беспрогрессивной выживаемостью больных ДВККЛ

Изучено возможное влияние сочетанной экспрессии pSTAT3 и pAKT1 на течение ДВККЛ. Самые низкие показатели 5-летней ОВ были характерны для сочетанной гиперэкспрессии указанных биомаркеров (рисунок 8). Наличие у пациентов такой комбинации увеличивало риск летального исхода в 5 раз, по

сравнению с больными, имевшими другие варианты их совместной экспрессии. Напротив, наиболее высокая общая выживаемость (85%) зарегистрирована в случаях с одновременно низкой выраженностью указанных маркеров ($p=0,001$; $HR=5,2$; $95\% CI=2,61-10,22$).

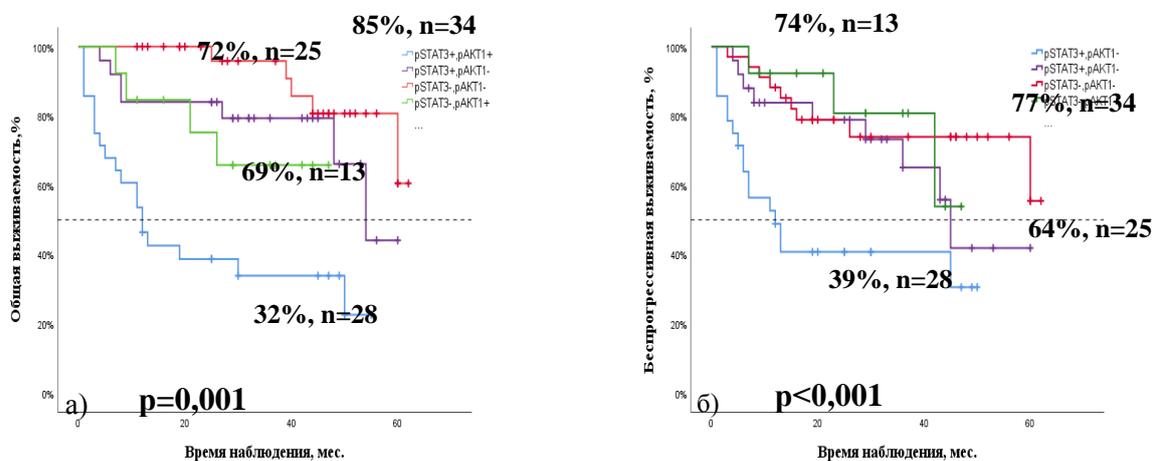


Рисунок 8 – ОВ (а) и БПВ (б) выживаемость больных с различным сочетанием экспрессии pSTAT3 и pAKT1

Схожие результаты получены при исследовании БПВ. Этот показатель в группе больных с сочетанной гиперэкспрессией pSTAT3 и pAKT1 соответствовал 39% (Me=17 мес.) и значительно превышал таковой у обследуемых с одновременно низкой выраженностью маркеров – 77% (Me не достигнута). При этом риск наступления рецидива/прогрессии заболевания был выше в 3,5 раза по сравнению с другими комбинациями ($p<0,001$; $HR=3,5$; $95\% CI=1,76-6,51$).

При изучении коэкспрессии pSTAT3 и pSyc наиболее низкая ОВ и БПВ зарегистрирована у обследованных с одновременной гиперэкспрессией указанных белков (рисунок 9). При данном сочетании маркеров вероятность наступления неблагоприятного события у пациентов при ОВ увеличивалась в 2,9 раза ($p=0,003$; $HR=2,9$; $95\% CI=1,43-5,85$), а при БПВ – в 2,3 раза ($p=0,021$; $HR=2,3$; $95\% CI=1,14-4,87$) по сравнению с другими вариантами их совместной экспрессии.

Проанализирована взаимосвязь экспрессии pAKT1 и pSyc (рисунок 10). Наиболее высокая ОВ (90,2%; Me не достигнута) зафиксирована в группе больных с одновременно низкой экспрессией указанных белков.

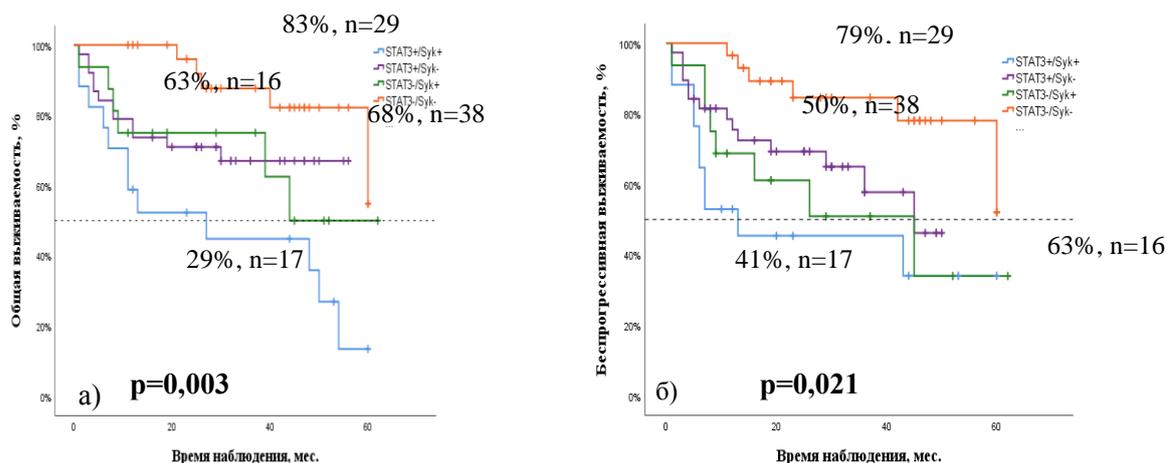


Рисунок 9 – ОВ (а) и БПВ (б) выживаемость больных с различным сочетанием экспрессии pSTAT3 и pSyk

Данные статистически значимо отличались у пациентов с гиперэкспрессией обоих маркеров (ОВ=26,7%; Me=10 мес.; $p < 0,001$; HR=5,2; 95% CI=2,49-10,9).

При оценке БПВ значение этого показателя в группе лиц с одновременной гиперэкспрессией pAKT1 и pSyk соответствовало 40% (Me=14 мес.) против 78,1% (Me не достигнута) у обследуемых с подпороговым уровнем экспрессии белков ($p = 0,002$; HR=3,3; 95% CI=1,54-7,30).

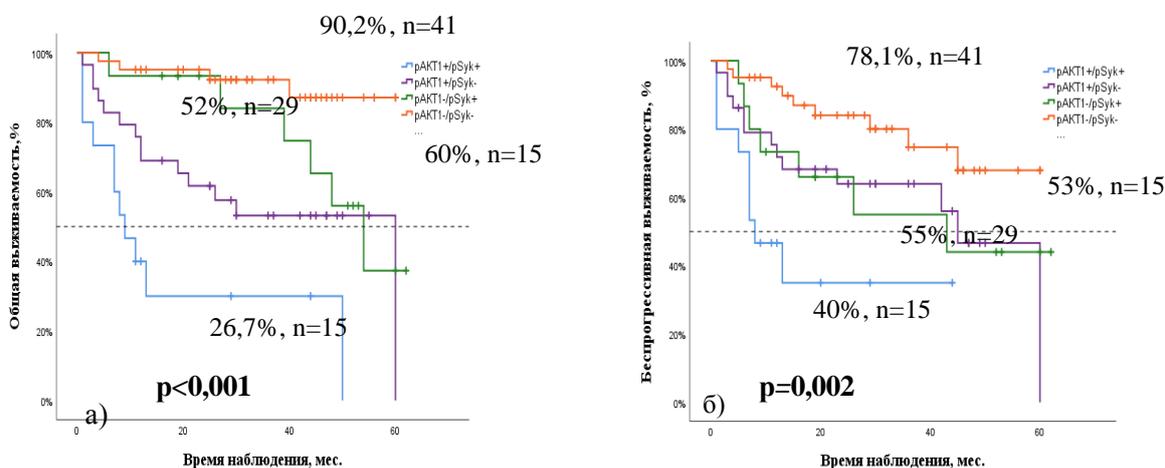


Рисунок 10 – ОВ (а) и БПВ (б) выживаемость больных с различным сочетанием экспрессии pAKT1 и pSyk

Таким образом, установлено, что сочетанная гиперэкспрессия изученных биомаркеров оказывает более неблагоприятное влияние на прогноз заболевания по сравнению с их изолированной экспрессией. Это указывает на наличие тесной связи

в функционировании различных сигнальных путей и существование синергических и модулирующих эффектов в отношении течения заболевания.

Регрессионный анализ Кокса

По результатам однофакторного анализа показателями, негативно влияющими на ОВ больных ДВККЛ, являлись: МПИ>2, non-GCB подтип заболевания, экспрессия pSTAT3 \geq 68%, pAKT1 \geq 70%, c-Myc \geq 40% и p53 \geq 30%. Вероятность наступления неблагоприятного события при pSTAT3 \geq 68% была в 2,4 раза выше, чем у обследуемых с низким уровнем экспрессии биомаркера (p=0,019). При гиперэкспрессии pAKT1 риск развития летального исхода увеличивался в 5,7 раза в сравнении с пациентами, имевшими подпороговый уровень его выраженности (p<0,001).

Факторами, значимо влияющими на БПВ больных, стали значение МПИ>2, экспрессия pSTAT3 \geq 68% и pAKT1 \geq 70%. При гиперэкспрессии pSTAT3 и pAKT1 риск неблагоприятного события увеличивался в 2,2 (p=0,019) и 2,7 (p=0,003) раза, соответственно, по сравнению с пациентами, имевшими низкий уровень экспрессии маркеров.

В результате многофакторного анализа независимое неблагоприятное прогностическое значение в отношении ОВ установлено только для МПИ>2, а также высокой экспрессии c-Myc и pAKT1. В отношении БПВ – для МПИ>2 и pAKT1 \geq 70% (таблица 2). Выявлено, что больные с гиперэкспрессией pAKT1 имели значительно более высокий риск летального исхода, а также рецидива/прогрессии заболевания, чем пациенты с подпороговым уровнем выраженности белка (p=0,016; HR=2,9 и p=0,031; HR=2,1, соответственно).

Таблица 2 – Результаты многофакторного регрессионного анализа Кокса предикторов общей и беспрогрессивной выживаемости

Параметр	ОВ			БПВ		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
МПИ>2	4,0	1,79-8,53	0,001*	4,8	2,28-10,32	0,001*
ИГХ подтип (non-GCB)	1,9	0,83-4,58	0,125	-	-	-

Продолжение таблицы 2

Экспрессия pSTAT3 ≥68%	1,0	0,44-2,42	0,936	1,9	0,99-3,93	0,051
Экспрессия pAKT1 ≥70%	2,9	1,21-6,86	0,016*	2,1	1,07-4,11	0,031*
Экспрессия с-Мус ≥40%	3,0	1,43-6,45	0,004*	-	-	-
Экспрессия p53≥30%	2,3	0,96-5,29	0,062	-	-	-

*- различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

Таким образом, биомаркер pAKT1 является независимым фактором прогноза течения ДВККЛ. Белок pSTAT3 не подтвердил самостоятельного прогностического значения при этой патологии. Ассоциации экспрессии pSyk с течением заболевания в нашем исследовании не установлено.

ВЫВОДЫ

1. Определены прогностически значимые пороговые уровни монотипической экспрессии биомаркеров pSTAT3 и pAKT1. Значения показателей $\geq 68\%$ для pSTAT3 и $\geq 70\%$ для pAKT1 определяют неблагоприятный прогноз течения заболевания.
2. Надпороговые значения экспрессии pSTAT3 и pAKT1 ассоциированы с неблагоприятными клинико-биологическими характеристиками ДВККЛ: распространенными стадиями, повышенной концентрацией ЛДГ, значениями МПИ >2 , non-GCB подтипом опухоли, гиперэкспрессией онкобелков с-Мус, p53. Взаимосвязи указанных сигнальных молекул с экспрессией белка BCL2, а также морфологией опухолевых клеток не выявлено.
3. Биомаркер pAKT1 является независимым фактором прогноза течения ДВККЛ. Его гиперэкспрессия ассоциирована с увеличением риска летального исхода и рецидивирующих/резистентных форм заболевания в 5,7 и 2,7 раза, соответственно.

4. Наиболее неблагоприятными в отношении прогноза ДВККЛ являются комбинации сочетанной гиперэкспрессии изученных белков.
5. Ассоциации экспрессии белка pSyk с течением ДВККЛ не установлено.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразно включить в диагностическую панель определение уровня экспрессии маркеров pSTAT3, pAKT1 в качестве дополнительного критерия для прогнозирования неблагоприятного течения ДВККЛ в дебюте заболевания.
2. Для выявления групп высокого риска у пациентов с ДВККЛ, требующих интенсификации лечения, рекомендуется исследование наличия/отсутствия сочетанной гиперэкспрессии белков pSTAT3 и pAKT1 в опухолевых клетках.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Ванеева Е.В. Оценка прогностического значения экспрессии pSTAT3 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме на российской выборке пациентов / Е.В. Ванеева, В.А. Росин, Д.А. Дьяконов, С.В. Самарина, А.В. Рылов // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – Т.39, №5. – С. 125–133.
2. Vaneeva E. STAT3 protein as a prognostic factor of diffuse large B-cell lymphoma / E. Vaneeva, V. Rosin, D. Dyakonov, S. Samarina, E. Poponina, A. Rylov, I. Paramonov // HemaSphere. – 2019. – Vol.3 (Suppl.1). – P. 833.
3. Ванеева Е.В. Прогностическое значение экспрессии белка STAT3 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Е.В. Ванеева, В.А. Росин, Д.А. Дьяконов, С.В. Самарина, А.В. Рылов // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии”. – 2019. – С.61.
4. Ванеева Е.В. Значение экспрессии pAKT1 у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой / Е.В. Ванеева, В.А. Росин, Д.А. Дьяконов, С.В. Самарина // Гематология и трансфузиология – 2020. – Т.65, №1. – С.124.
5. Ванеева Е.В. Ассоциация экспрессии pSTAT3, pAKT1 с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой / Е.В. Ванеева, В.А. Росин, Д.А. Дьяконов, С.В. Самарина // Казанский медицинский журнал. – 2020. – Т.101, №4. – С. 501–506.
6. Ванеева Е.В. Значение экспрессии pAKT1 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Е.В. Ванеева, В.А. Росин, Д.А. Дьяконов, С.В. Самарина, А.С. Лучинин, Н.Л. Кочетов // Бюллетень сибирской медицины. – 2021. – № 3. – С.134

Патенты Российской Федерации:

1. Способ морфометрической оценки прогноза течения диффузной В-крупноклеточной лимфомы по содержанию STAT3+ опухолевых клеток в лимфатических узлах: №2694838 Российская Федерация / Д.А. Дьяконов, В.А. Росин, Е.В. Ванеева, С.В. Самарина // заявитель и патентообладатель ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» ФМБА России. №2694838; заявл. 18.12.2018, опубл. 17.07.2019, Бюл. № 20.
2. Способ морфометрической оценки прогноза течения диффузной В-крупноклеточной лимфомы по содержанию STAT3+ в опухолевой ткани: № 2710591 Российская Федерация / Д.А. Дьяконов, В.А. Росин, Е.В. Ванеева, С.В. Самарина // заявитель и патентообладатель ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» ФМБА России. № 2710591; заявл. 09.04.2019, опубл. 30.12.2019, Бюл. № 1.

Список сокращений:

БПВ – беспрогрессивная выживаемость
 ДВККЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома
 ИГХ – иммуногистохимия
 ЛДГ – лактатдегидрогеназа
 МПИ – международный прогностический индекс
 ОВ – общая выживаемость
 АКТ1 – (**R**AC-**A**lpha **s**erine/**t**hreonine-**p**rotein **K**inase)
 BCL – (**B**-cell **l**ymphoma), белок В-клеточной лимфомы
 BCR – (**B**-cell **R**eceptor), В-клеточный рецептор
 с-Мус – (**m**yelocytomatosis **v**iral **o**ncogene **h**omolog), протоонкогенный белок, фактор транскрипции
 ECOG – **E**astern **C**ooperative **O**ncology **G**roup
 GCB – (**G**erminal **c**enter **B**-cell), В-клетка герминального происхождения
 non-GCB – В-клетка постгерминального происхождения
 STAT3 – (**S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription3), сигнальный белок
 Syk – (**S**pleen **t**yrosine **k**inase), селезеночная тирозинкиназа