

кафедра онкологии,
Тел. моб.: +375 29 7346860,
e-mail: igor-mikhailov-2014@yandex.ru
Михайлов Игорь Викторович

Сведения об авторах

Михайлов И.В., к.м.н., доцент, заведующий кафедрой онкологии УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Бондаренко В.М., врач-онкохирург онкологического абдоминального отделения У «Гомельский областной клинический онкологический диспансер».

Кудряшов В.А., заведующий онкологическим абдоминальным отделением У «Гомельский областной клинический онкологический диспансер».

Ачинович С.Л., к.м.н., заведующий патологоанатомическим отделением У «Гомельский областной клинический онкологический диспансер».

Киселев П.Г., к.м.н., доцент, врач-патологоанатом ГУ «РНПЦ ОМР им. Н.Н.Александрова».

Нестерович Т.Н., ассистент кафедры онкологии УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Виеракоон Ч.А., ассистент кафедры онкологии УО «Гомельский государственный медицинский университет».

Address for correspondence

246000, The Republic of Belarus,
Gomel, Lange Str., 5,
Gomel State Medical University,
Department of oncology,
Tel. mob.: +375 29 7346860,
e-mail: igor-mikhailov-2014@yandex.ru
Mikhailov I.V.

Information about the authors

Mikhailov I.V., PhD, head of department of oncology EE «Gomel State Medical University».

Bondarenko V.M., oncological surgeon of the abdominal Oncology Department E "Gomel regional clinical Oncology center".

Kudryashov V.A., head of the Oncology abdominal Department E "Gomel regional clinical Oncology center".

Achinovich S.L., PhD, head of the pathology Department E "Gomel regional clinical Oncology center".

Kiselev P.G., PhD, pathologist SE "Republican scientific and practical center of Oncology and medical radiology named after N. N. Alexandrov".

Nesterovich T.N., assistant, Department of Oncology, Gomel state medical University».

Weerakoon Ch.A., assistant of the Department of Oncology, Gomel state medical University».

Поступила 04.07.2019

УДК 616.155.392.2-036.12-006.446-076

ОЦЕНКА РИСКА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА

Д. В. Кравченко¹, Ю. И. Ярец¹, В. Н. Мартинков¹,
А. Е. Силян¹, А. И. Свирновский²

¹Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека»

г. Гомель, Республика Беларусь

²Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр
трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

г. Минск, Республика Беларусь

Цель: выявить взаимосвязь лабораторных показателей с различным течением хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) и разработать комплексную модель оценки риска прогрессии заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 127 пациентов с ХЛЛ, у которых были оценены лабораторные показатели (общий и биохимический анализы крови, β2-микроглобулин, тимидинкиназа, тканевой полипептидный антиген (ТРА), иммунофенотипические маркеры, а также мутации гена NOTCH1).

Результаты. Наиболее информативными для прогнозирования течения заболевания являлись такие маркеры, как β2-микроглобулин, тимидинкиназа, ZAP-70, CD38 и ТРА. На основе полученных данных разработана модель оценки риска прогрессирования ХЛЛ с высокими чувствительностью и специфичностью. Согласно полученной прогностической модели была выполнена оценка беспрогрессивной выживаемости (БПВ) двух групп пациентов — низкого и высокого рисков. У пациентов из группы низкого риска определялась БПВ, равная 60 месяцам, а у группы высокого риска — 29,4 месяца. Также было установлено, что пациенты без прогрессии на момент включения в исследование при наличии мутаций гена NOTCH1 имели более короткую БПВ в сравнении с пациентами без мутаций, что может свидетельствовать о связи мутаций гена NOTCH1 с неблагоприятным прогнозом в отношении прогрессии заболевания.

Заключение. Комплексное использование прогностических факторов в виде модели оценки риска прогрессии ХЛЛ позволяет стратифицировать пациентов с ХЛЛ на группы высокого и низкого рисков и прогнозировать вероятность и скорость прогрессии в момент постановки диагноза и в процессе лечения.

Ключевые слова: хронический лимфоцитарный лейкоз, факторы, прогрессия, прогноз.

Objective: to identify the interconnection of laboratory parameters with different courses of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and to develop a comprehensive model for the assessment of the risk of the disease progression.

Material and methods. The study included 127 patients with CLL whose laboratory parameters were evaluated (general and biochemical blood tests, β2-microglobulin, thymidinekinase, tissue polypeptide antigen (TPA), immunophenotypic markers, and also NOTCH1 gene mutations).

Results. For the prediction of the course of the disease the most informative were such markers as β2-microglobulin, thymidinekinase, ZAP-70, CD38, and TPA. Based on the obtained data, a model of the risk assess-

ment for CLL progression with high sensitivity and specificity was developed. The progressive-free survival (PFS) was evaluated in two groups of the patients of different risk (low and high) assigned to them according to the prognostic model. In the patients from the low-risk group PFS was determined to be 60 months, and in the high-risk group it was equal to 29.4 months. And it was found out that the patients without progression at the time of inclusion in the study with the presence of mutations of the NOTCH1 gene had a shorter PFS in comparison with the patients without mutations, which may indicate a link between the mutations of the NOTCH1 gene and the unfavorable prognosis for the disease progression.

Conclusion. The integrated application of the prognostic factors in the form of a CLL progression risk assessment model allows to stratify CLL patients into high and low risk groups and to predict the probability and progression rate at the time of the diagnosis and during the treatment.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, factors, progression, prognosis.

D. V. Kravchenko, Yu. I. Yarets, V. N. Martinkov, A. E. Silin, A. I. Svirnovsky
Assessment of the Progression Risk of Chronic Lymphocytic Leukemia
Problemy Zdorov'ya i Ekologii. 2019 Jul-Sep; Vol 61 (3): 38-43

Введение

Клиническое течение ХЛЛ крайне неоднородно. Часть пациентов не требует химиотерапии в течение всей жизни, у других показания для начала химиотерапии имеются уже в момент постановки диагноза [1, 2].

Несмотря на большое количество молекулярно-биологических, цитогенетических и клинических факторов, коррелирующих с течением заболевания и ответом на терапию, в настоящее время не разработано единой системы оценки риска прогрессии заболевания в каждом конкретном случае.

М. Sabatine и соавт. в 2007 г. показали значимость некоторых лабораторных (цитогенетических, иммунофенотипических, мутационный статус IgVH-генов, β 2-микроглобулин) маркеров и оценили выживаемость пациентов с ХЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия этих маркеров либо от степени их выраженности [3, 4]. В результате множества исследований по изучению роли прогностических факторов в 2016 г. К. Rai и Р. Jain были выделены наиболее значимые современные факторы для прогнозирования течения ХЛЛ и ответа на терапию, среди которых иммунофенотипические и молекулярно-генетические маркеры [5].

Наряду с общеизвестными генетическими поломками в последнее время выявлены новые молекулярно-генетические маркеры прогноза течения ХЛЛ. К ним относятся мутации таких генов, как NOTCH1, SF3B1 и др. У пациентов с мутациями NOTCH1 (частота 8–12 %) определяются более короткий период до начала терапии ХЛЛ и более низкие показатели общей и беспрогрессивной выживаемости. У этих пациентов чаще выявляется рефрактерность к химиотерапии, существенно выше риск трансформации в Синдром Рихтера, особенно при одновременном наличии мутаций TP53 и/или del17p [6–8].

Существует более популярная система прогнозирования течения ХЛЛ с определением Международного прогностического индекса

(МПИ, CLL-IPi — International Prognostic Index), где используются данные по наличию мутаций гена TP53, IgVH-статусу, уровню β 2-микроглобулина, стадии ХЛЛ и возрасту пациентов. Согласно данному индексу (оценке по количеству баллов), определяется риск для пациентов с ХЛЛ, дальнейший прогноз течения заболевания и эффективности его лечения [6].

Однако все известные системы и шкалы прогнозирования течения ХЛЛ не являются совершенными. При этом зачастую существуют технические и экономические сложности в получении некоторых показателей этих систем и шкал. Поэтому остается актуальным вопрос разработки новой модели прогноза течения ХЛЛ, которая будет оптимальной по техническому выполнению и экономической целесообразности.

Цель исследования

Выявить взаимосвязь лабораторных показателей с различным течением ХЛЛ и разработать комплексную модель оценки риска прогрессии заболевания.

Материалы и методы

В исследование были включены 127 пациентов с ХЛЛ, наблюдаемых на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» г. Гомеля. Среди данной группы были пациенты без прогрессии ($n = 60$) и с клиническими признаками прогрессии заболевания ($n = 67$). Медиана возраста пациентов составила 62 года (55 и 69 лет) (Me (25 % и 75 %)).

Всем пациентам выполняли диагностическую стерильную пункцию с аспирацией костного мозга, а также забор венозной крови для лабораторного исследования.

У пациентов были оценены: соматический статус (по шкале ECOG), уровень коморбидности (по шкале CIRS), лабораторные показатели (общий и биохимический анализы крови, β 2-микроглобулин, тимидинкиназа, тканевой полипептидный антиген (TPA), иммунофенотипические маркеры, а также мутации гена NOTCH1).

Биохимическое исследование крови выполнялось на автоматическом биохимическом анализаторе ARCHITECT-8000 («Abbott», США). Определяли следующие показатели крови: лактатдегидрогеназа (ЛДГ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), общий билирубин, гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ), С-реактивный белок (СРБ), натрий, калий, кальций, хлор, мочевины, креатинин, глюкоза, общий белок, мочевиная кислота.

Выявление β 2-микроглобулина в сыворотке крови выполнялось электрохемилюминесцентным методом с помощью автоматизированной системы Cobas 6000 для фотометрических тестов, модуль С-501 («Roche Diagnostics», Германия). Для оценки уровней сывороточной тимидинкиназы и ТРА использовался иммунохемилюминесцентный анализатор LIAISON («DiaSorin», Италия).

Для определения иммунофенотипа опухолевых клеток использовали проточный цитофлюориметр FACS Canto II («Becton Dickinson», США) с применением моноклональных антител фирм «Becton Coulter» (Франция), «Becton Dickinson» (США) и «EXBIO» (Чехия). Гейтирование лимфоцитов в обеих группах проводили с использованием маркеров CD45 и CD19.

Для детекции мутаций гена NOTCH1 применяли метод SSCP-PCR с последующим прямым секвенированием образцов ДНК, имеющих конформационный полиморфизм. Анализ осуществляли в пределах 34-го экзона гена NOTCH1. Секвенирование выполняли посредством генетического анализатора AB 3500 (Applied Biosystems) с прямым и обратным праймером.

Использовали методы непараметрической статистики, рассчитываемые в пакете программ «Statistica», 6.1 (StatSoft Inc., США). Статистически значимыми считали результаты, когда $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По результатам статистического анализа наиболее информативными для прогнозирования течения заболевания являлись такие маркеры, как β 2-микроглобулин, тимидинкиназа, ZAP-70, CD38 и ТРА. Для данных маркеров были определены статистически значимые различия при сопоставлении двух подгрупп пациентов — без прогрессии и с клиническими признаками прогрессии ХЛЛ ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p = 0,003$, $p = 0,032$ и $p = 0,026$ соответственно, критерий Mann-Whitney). Значения данных маркеров оказались статистически достоверно выше у пациентов с прогрессирующим заболеванием по сравнению с пациентами без прогрессии.

Однако только по наличию или отсутствию превышения значений данных показателей судить об участии каждого из них в прогнозировании течения заболевания представляется затруднительным. Поэтому на следующем этапе был выполнен анализ с использованием метода CRT (Classification and Regression Tree – Деревья классификации и регрессии), по результатам которого были определены граничные значения показателей. Балльная оценка показателей определена на основе таблицы важности независимых переменных. В результате были получены значения баллов для каждого маркера, которые соответствуют относительному вкладу каждого из них при определении риска прогрессии ХЛЛ (таблица 1).

Таблица 1 — Балльная оценка на основе значений маркеров при определении риска прогрессии ХЛЛ

№	Показатель	Значение	Балл
1	β 2-микроглобулин, мкг/л	$\geq 2,5$	10
2	Тимидинкиназа, Е/л	$\geq 6,6$	7
3	ZAP-70, %	≥ 9	2
4	CD38, %	≥ 19	2
5	ТРА, МЕ/л	≥ 70	1

По результатам ROC-анализа было определено граничное значение суммы баллов для полученной модели, равное 12. При количестве баллов 11 и менее прогнозируют низкий риск прогрессии ХЛЛ, при сумме баллов, равной 12 и более, прогнозируют высокий риск прогрессии ХЛЛ. Чувствительность данной модели составила 88,6 %, специфичность — 84,9 %, точность — 86,6 %, что свидетельствует о высоком качестве полученной модели (рисунок 1).

С целью подтверждения прогностической эффективности полученной модели оценки

риска прогрессии ХЛЛ была выполнена оценка беспрогрессивной выживаемости двух групп пациентов различного риска (низкого и высокого), отнесенных к ним согласно полученной прогностической модели.

У пациентов из группы низкого риска определялась БПВ, равная 60 месяцам, (95 % ДИ [53,9–66,1]), а у группы высокого риска она была равна 29,4 месяца (95 % ДИ [20,7–38,1]) (по Каплану-Майеру). На рисунке 2 графически представлена разница по БПВ всех пациентов обеих групп.

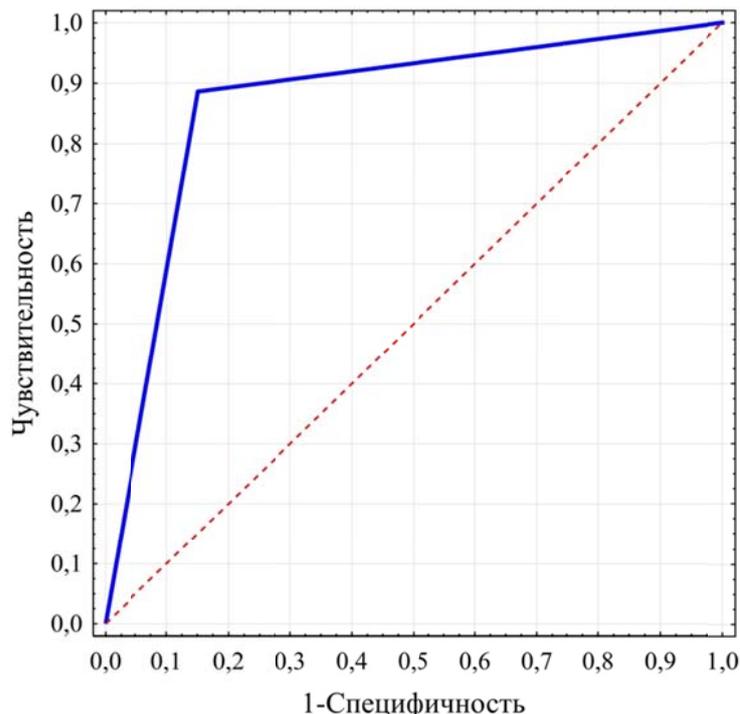


Рисунок 1 — Соотношение между чувствительностью и специфичностью модели для прогнозирования риска прогрессии ХЛЛ (ROC-кривая)

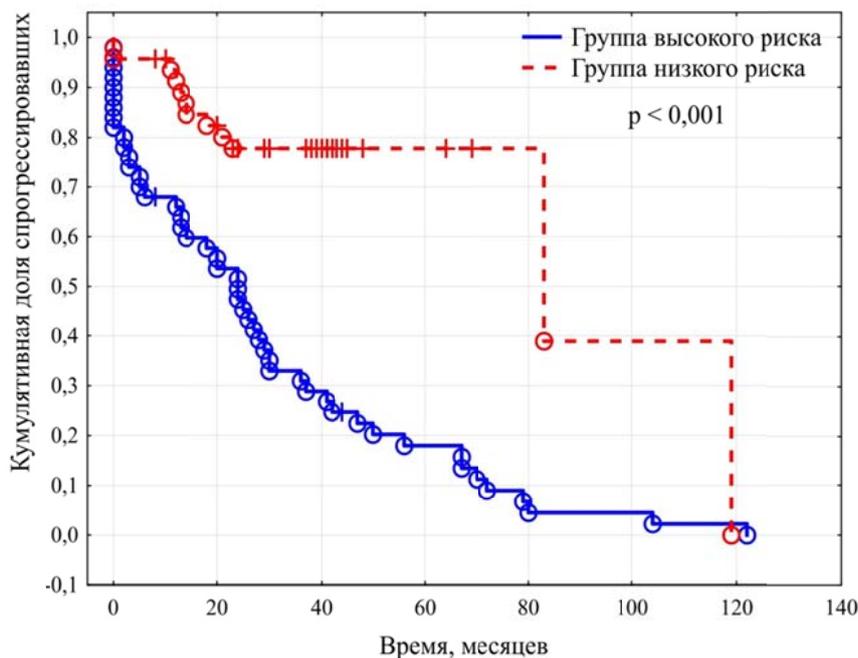


Рисунок 2 — Беспрогрессивная выживаемость пациентов обеих групп (1-я группа — низкий риск, 2-я группа — высокий риск) (по Каплану-Майеру)

Таким образом, выявлена статистически значимая разница (более чем в 2 раза) по БПВ между двумя группами. При этом среди пациентов без прогрессии заболевания на момент включения в исследование при сравнении БПВ пациентов различной степени риска также выявлена достоверная разница по исследуемому при-

знаку: пациенты группы низкого риска имели значительно большую БПВ (среднее значение 63,1 месяца (95 % ДИ [57,7–68,6])), чем пациенты группы высокого риска (33,8 месяца (95 % ДИ [3,7–63,8])) (рисунок 3). Это свидетельствует о высокой значимости представленной модели для прогнозирования риска прогрессии ХЛЛ.

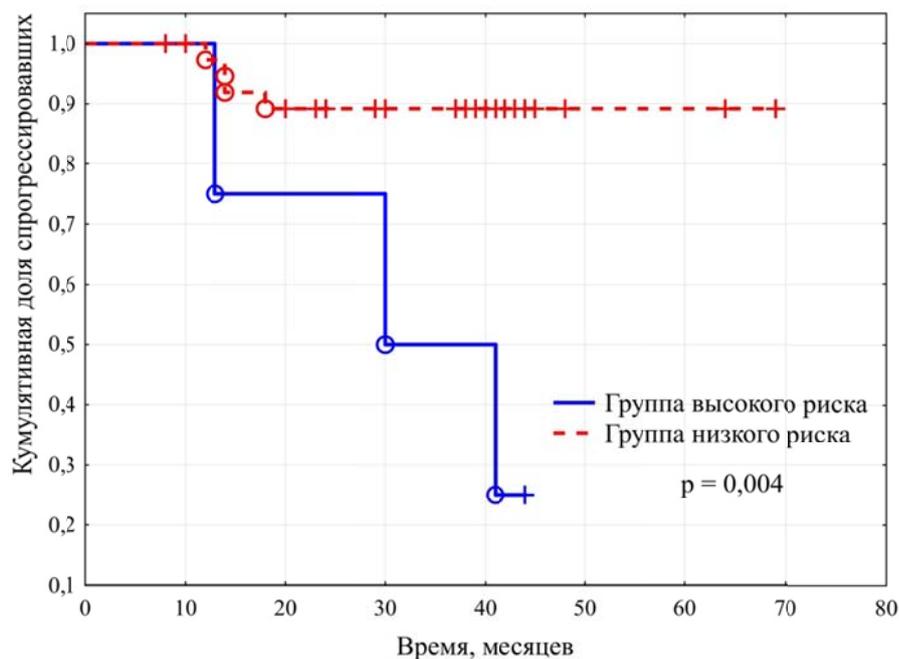


Рисунок 3 — Беспрогрессивная выживаемость пациентов обеих групп (1-я группа — низкий риск, 2-я группа — высокий риск) среди пациентов без прогрессии заболевания на момент включения в исследование (по Каплану-Майеру)

Далее у пациентов был выполнен анализ БПВ в зависимости от наличия мутации гена NOTCH1. Было установлено, что пациенты без прогрессии заболевания на момент включения в исследование при наличии мутаций гена NOTCH1 имели статистически значимо более короткую БПВ (среднее значение 33,4 месяца

(95 % ДИ [22,0–44,8])) в сравнении с пациентами без мутаций (59,2 месяца (95 % ДИ [54,1–64,3])), уровень значимости для лог-рангового критерия $p = 0,018$. Это свидетельствует о связи наличия мутаций гена NOTCH1 с неблагоприятным прогнозом в отношении прогрессии заболевания у пациентов с ХЛЛ (рисунок 4).

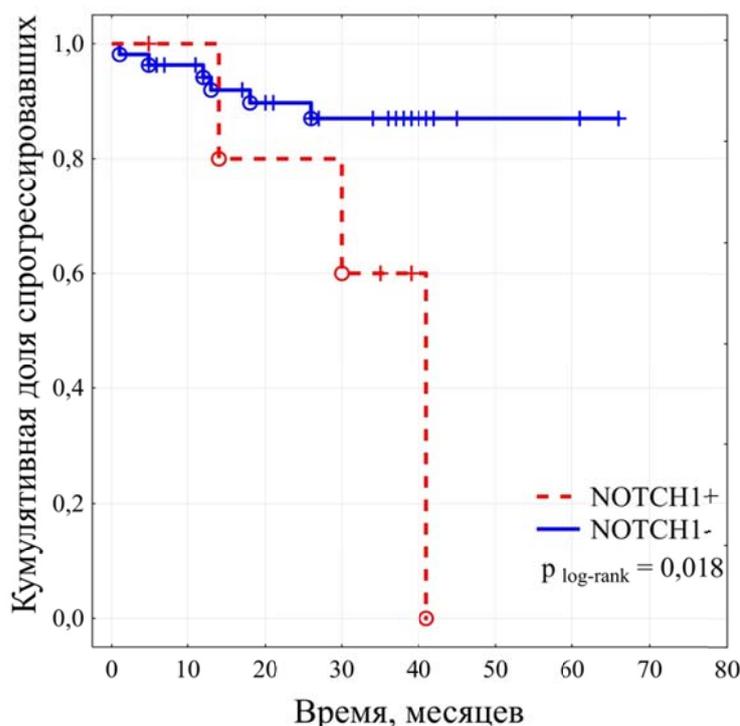


Рисунок 4 — Беспрогрессивная выживаемость пациентов с ХЛЛ в зависимости от наличия мутаций гена NOTCH1 у пациентов без прогрессии заболевания на момент включения в исследование (по Каплану-Майеру)

Определение мутации NOTCH1 может быть использовано в качестве дополнительного этапа прогнозирования для пациентов из группы низкого риска (согласно полученной модели прогноза) с целью более точной оценки вероятности прогрессирования ХЛЛ. Таких пациентов с положительным результатом на наличие мутации NOTCH1 необходимо также относить к группе высокого риска прогрессирования заболевания, несмотря на отсутствие других неблагоприятных факторов прогноза.

Такой подход оправдывает себя и с научно-практической, и с экономической точки зрения.

Заключение

Учитывая гетерогенное течение ХЛЛ, врачу-гематологу очень важно иметь в своем арсенале диагностических возможностей прогностические маркеры, которые могут оказать существенное влияние на выбор тактики ведения пациентов в сложных клинических ситуациях.

При этом комплексное использование прогностических факторов в виде модели оценки риска прогрессирования ХЛЛ позволяет стратифицировать пациентов с ХЛЛ на группы высокого и низкого рисков и прогнозировать вероятность и скорость прогрессии в момент постановки диагноза и в процессе лечения, что может являться основой для оптимизации дифференциального подхода к терапии данных пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова МА. Клиническая онкогематология: руководство для врачей. Москва, РФ; 2007. 820 с.
2. Свирновский АИ. Хронический лимфоцитарный лейкоз: парадигмы и парадоксы. *Мед Новости*. 2008;13:7-19.
3. Claus R, Lucas D, Ruppert A, Williams K, Weng D, Patterson K, Zucknick M. Validation of ZAP-70 methylation and its relative significance in predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(1):42-48. doi: 10.1182/blood-2014-02-555722.
4. Chen Y, Ying M, Chen Y. Serum thymidinekinase 1 correlates to clinical stages and clinical reactions and monitors the outcome of therapy of 1,247 cancer patients in routine clinical settings. *Int J Clin Oncol*. 2010;15(4):359-68.
5. Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia – Then and now. *Am J Hematol*. 2016;91(3):330-40. doi: 10.1002/ajh.24282.
6. Кравченко ДВ, Свирновский АИ. Хронический лимфоцитарный лейкоз: клиника, диагностика, лечение. Практическое пособие для врачей. Гомель, РБ; 2017. 117 с.
7. Стадник ЕА, Никитин ЕВ, Алексеева ЮН, Салогуб ГИ, Якубович МА, Вирц ЮЛ, Зарицкий АЮ. Современная лекарственная терапия и прогностические факторы при хроническом лимфолейкозе. Обзор литературы и собственные данные. *Бюллетень Сиб Медицины*. 2008;3:41-52.
8. Zenz T, Mertens D, Kupperts R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):37-50.

REFERENCES

1. Volkova MA. Klinicheskaya onkogematologiya: rukovodstvo dlya vrachey. Moskva, RF; 2007. 820 p. (in Russ.).
2. Svirnovskiy AI. Hronicheskiy limfocitarnyy leykoz: paradigmy i paradoksy. *Med Novosti*. 2008;13:7-19. (in Russ.).
3. Claus R, Lucas D, Ruppert A, Williams K, Weng D, Patterson K, Zucknick M. Validation of ZAP-70 methylation and its relative significance in predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(1):42-48. doi: 10.1182/blood-2014-02-555722.
4. Chen Y, Ying M, Chen Y. Serum thymidinekinase 1 correlates to clinical stages and clinical reactions and monitors the out-

come of therapy of 1,247 cancer patients in routine clinical settings. *Int J Clin Oncol*. 2010;15(4):359-68.

5. Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia – Then and now. *Am J Hematol*. 2016;91(3):330-40. doi: 10.1002/ajh.24282.

6. Kravchenko DV, Svirnovskiy AI. Hronicheskiy limfocitarnyy leykoz: klinika, diagnostika, lechenie. Prakticheskoe posobie dlya vrachey. Gomel', RB; 2017. 117 p. (in Russ.).

7. Stadnik EA, Nikitin EV, Alekseeva YN, Salogub GI, Yakubovich MA, Virc YL, Zarickiy AU. Sovremennaya lekarstvennaya terapiya i prognosticheskie faktory pri hronicheskom limfoleykoze. Obzor literatury i sobstvenny'e dannyye. *Byulleten' Sib Mediciny*. 2008;3:41-52. (in Russ.).

8. Zenz T, Mertens D, Kupperts R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):37-50.

Адрес для корреспонденции

246040, Республика Беларусь,
г. Гомель, ул. Ильича 290,
Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»,
гематологическое отделение для взрослых.
Тел./факс: (0232) 37-77-12
Тел. моб.: +375 29 619-49-17,
e-mail: dima.gomel@mail.ru
Кравченко Дмитрий Васильевич

Сведения об авторах

Кравченко Д.В., врач-гематолог гематологического отделения для взрослых государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека».

Ярец Ю.И., к.м.н., доцент, заведующий клинико-диагностической лабораторией государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека».

Мартинков В.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека».

Силин А.Е., к.б.н., заведующий лабораторией молекулярной генетики государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека».

Свирновский А.И., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории механизмов клеточной лекарственной резистентности государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий».

Address for correspondence

246040, The Republic of Belarus,
Gomel, st. Illich, 290
Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology.
Tel./fax: (0232) 37-77-12
Tel. mob.: +375 29 619-49-17,
e-mail: dima.gomel@mail.ru
Kravchenko Dmitry Vasilievich

Information about the authors

Kravchenko D.V., hematologist of hematology department for adults of the Republican Scientific Center for Radiation Medicine and Human Ecology.

Yarets Y.I., PhD, MD, ass. prof., The Head of Clinical Laboratory Medicine Department of the Republican Scientific Center for Radiation Medicine and Human Ecology.

Martinkov V.N., PhD, senior scientist of Laboratory of Molecular Genetics of the Republican Scientific Center for Radiation Medicine and Human Ecology.

Silin A.E., PhD, The Head of Laboratory of Molecular Genetics of the Republican Scientific Center for Radiation Medicine and Human Ecology.

Svirnovskiy A.I., doctor of medical Sciences, Professor, Main researcher of the laboratory of mechanisms of cellular drug resistance of Republican scientific and practical center of Transfusiology and medical biotechnology.

Поступила 20.06.2019