

## ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

## LYMPHOID TUMORS

### Значение экспрессии активационных белков pAKT1, pSyk при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

### Significance of the Expression of pAKT1 and pSyk Activation Proteins in Diffuse Large B-Cell Lymphoma

*Е.В. Ванеева, В.А. Росин, Д.А. Дьяконов, С.В. Самарина, И.В. Парамонов*

*EV Vaneeva, VA Rosin, DA Dyakonov, SV Samarina, IV Paramonov*

ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА», ул. Красноармейская, д. 72, Киров, Российская Федерация, 610027

Kirov Research Institute of Hematology and Transfusiology, 72 Krasnoarmeiskaya ul., Kirov, Russian Federation, 610027

#### РЕФЕРАТ

#### ABSTRACT

**Актуальность.** Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) составляет 30–40 % всех неходжкинских лимфом взрослых. После иммунохимиотерапии R-CHOP у 40 % больных развиваются ранние рецидивы или наблюдается рефрактерное к лечению течение болезни. Параметры, используемые для оценки прогноза ДВКЛ, не всегда эффективны. В связи с этим проблема изучения дополнительных предикторов течения заболевания остается актуальной.

**Background.** Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) amounts for 30–40 % of all adult non-Hodgkin's lymphomas. After R-CHOP immunochemotherapy 40 % of patients develop early relapsed or therapy-refractory disease. The conventional prognostic parameters in DLBCL are not always effective. Therefore, exploring further predictors of disease course remains an issue.

**Цель.** Оценить прогностическое значение экспрессии pAKT1 и pSyk при ДВКЛ.

**Aim.** To assess the prognostic value of pAKT1 and pSyk expression in DLBCL.

**Материалы и методы.** В исследование включено 100 пациентов с впервые диагностированной ДВКЛ, получавших иммунохимиотерапию первой линии по схеме R-CHOP. С помощью иммуногистохимического и морфометрического методов определяли относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих pAKT1, pSyk. Пороговый уровень экспрессии указанных белков вычисляли с применением ROC-анализа. Взаимосвязь экспрессии белков с клиническими параметрами ДВКЛ анализировали с применением точного двустороннего критерия Фишера. 5-летние общую (ОВ) и выживаемость без прогрессирования (ВБП) рассчитывали по методу Каплана–Мейера (лог-ранговый тест).

**Materials & Methods.** The study enrolled 100 patients with newly diagnosed DLBCL treated with R-CHOP first-line immunochemotherapy. The relative count of pAKT1- and pSyk-expressing tumor cells was determined by immunohistochemical and morphometric methods. The expression cut-off of these proteins was calculated by ROC analysis. The relationship of protein expression with clinical parameters of DLBCL was analyzed by Fisher's exact two-tailed test. The 5-year overall (OS) and progression-free (PFS) survivals were estimated by Kaplan-Meier method (log-rank test).

**Результаты.** Высокая экспрессия pAKT1 была связана с распространенными стадиями ДВКЛ, международным прогностическим индексом более 2 баллов, концентрацией лактатдегидрогеназы в сыворотке выше нормальных значений, неудачами терапии по схеме R-CHOP, худшими показателями ОВ и ВБП. Взаимосвязи экспрессии pSyk с клиническими характеристиками лимфомы не установлено. Самая низкая 5-летняя ОВ (27,6 %) зафиксирована в наблюдениях с сочетанной гиперэкспрессией pAKT1 и pSyk (отношение рисков [ОР] 5,2; 95%-й доверительный интервал [95% ДИ] 2,49–10,9;  $p < 0,001$ ). Аналогичная закономерность установлена и для ВБП (ОР 3,3; 95% ДИ 1,54–7,30;  $p = 0,002$ ).

**Results.** High pAKT1 expression was associated with advanced DLBCL stages, International Prognostic Index  $> 2$ , serum lactate dehydrogenase concentration above normal, failures of R-CHOP therapy, as well as worse OS and PFS. No correlation between pSyk expression and clinical lymphoma characteristics was found. The worst 5-year OS (27.6 %) was reported in cases of pAKT1 and pSyk co-overexpression (hazard ratio [HR] 5.2; 95% confidence interval [95% CI] 2.49–10.9;  $p < 0.001$ ). A similar trend was observed for PFS (HR = 3.3; 95% CI 1.54–7.30;  $p = 0.002$ ).

**Заключение.** Гиперэкспрессия pAKT1 служит информативным параметром, позволяющим прогнозировать неблагоприятное течение ДВКЛ. Сочетанная гиперэкспрессия маркеров pAKT1, pSyk связана с более низкими показателями ОВ и ВБП по сравнению с их изолированной экспрессией и другими вариантами коэкспрессии.

**Conclusion.** Overexpression of pAKT1 is an informative indicator of a poor DLBCL prognosis. Co-overexpression of pAKT1 and pSyk markers is associated with worse OS and PFS compared to their isolated expressions and other co-expression variants.

**Ключевые слова:** диффузная В-крупноклеточная лимфома, экспрессия pAKT1 и pSyk, общая выживаемость, выживаемость без прогрессирования.

**Получено:** 17 ноября 2021 г.

**Принято в печать:** 2 марта 2022 г.

*Для переписки:* Елена Викторовна Ванеева, ул. Красноармейская, д. 72, Киров, Российская Федерация, 610027; тел.: +7(922)975-23-34; e-mail: vaneeva.elena.vic@mail.ru

*Для цитирования:* Ванеева Е.В., Росин В.А., Дьяконов Д.А. и др. Значение экспрессии активационных белков pAKT1, pSyk при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Клиническая онкогематология. 2022;15(2):140–7.

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-140-147

**Keywords:** diffuse large B-cell lymphoma, pAKT1 and pSyk expression, overall survival, progression-free survival.

**Received:** November 17, 2021

**Accepted:** March 2, 2022

*For correspondence:* Elena Viktorovna Vaneeva, 72 Krasnoarmeiskaya ul., Kirov, Russian Federation, 610027; Tel.: +7(922)975-23-34; e-mail: vaneeva.elena.vic@mail.ru

*For citation:* Vaneeva EV, Rosin VA, Dyakonov DA, et al. Significance of the Expression of pAKT1 and pSyk Activation Proteins in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Clinical oncohematology. 2022;15(2):140–7. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-140-147

## ВВЕДЕНИЕ

Среди всех неходжкинских лимфом взрослых диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) составляет 30–40 %. Опухоль гетерогенна, представлена широким спектром вариантов, различающихся по своим морфологическим, иммунофенотипическим, генетическим характеристикам, а также клиническому течению и прогнозу [1, 2]. Несмотря на выраженное разнообразие форм и проявлений заболевания, лечение в большинстве случаев остается однотипным. В качестве стандартной первой линии при ДВКЛ используется иммунохимиотерапия R-СНОР (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон). Однако у 40 % больных регистрируются ранние рецидивы, прогрессирование или отмечается рефрактерное течение опухоли [3].

Широко применяемым стандартным инструментом для оценки индивидуального риска раннего прогрессирования ДВКЛ служат международный прогностический индекс (МПИ) и его модификации. Однако в эпоху применения R-СНОР значимость МПИ ограничена и не всегда позволяет достоверно определять прогноз заболевания. Расчеты в соответствии с МПИ проводят, в основном опираясь на клинические характеристики ДВКЛ без учета молекулярных особенностей опухолевых клеток. Отмечается высокая вариабельность ответов на противоопухолевое лечение в пределах одной группы риска, определенной по шкале МПИ. Это особенно актуально в отношении пациентов из низкой и промежуточной низкой групп риска. В связи с этим поиск дополнительных биологических критериев, уточняющих прогноз заболевания, является актуальным [4, 5].

К настоящему времени успехи молекулярной генетики позволили существенно продвинуться в понимании биологии ДВКЛ. Установлено, что заболевание неоднородно по профилю экспрессии генов (GEP) в опухолевых клетках [6]. Выделены два основных молекулярных подтипа болезни: из В-клеток герминативного центра (GCB) и из активированных В-клеток (ABC), которые соотносятся с прогнозом заболевания при лечении по протоколу R-СНОР. Несмотря на вы-

сокую информативность, применение GEP в рутинной практике ограничено трудоемкостью и большими материальными затратами [7].

Среди других потенциальных факторов прогноза течения заболевания большое внимание уделяется идентификации компонентов различных онкогенных путей, дисрегуляция которых связана с биологической гетерогенностью ДВКЛ. В ряде исследований установлено, что aberrантная активация сигнальных каскадов BCR, PI3K/AKT/mTOR лежит в основе патогенеза лимфомы. Степень экспрессии ключевых молекул-посредников этих путей влияет на биологические характеристики опухолевых клеток и может определять прогноз заболевания [8].

Известно, что пролиферация и дифференцировка лимфоидных клеток тесно связаны с функционированием В-клеточного рецептора (BCR). Способность В-клеток пролиферировать в ответ на инфекцию лежит в основе адаптивного иммунитета человека. Однако данный защитный механизм сопряжен с риском опухолевой трансформации. На функционирование BCR могут влиять генетически обусловленные поломки многочисленных молекул-адаптеров (BLNK, CARD11, GRB2 и др.), активность регуляторных киназ и фосфатаз (LYN, Syk, тирозинкиназа Брутона, SHIP-1 и др.) [9]. Нарушение передачи сигнала через BCR занимает важное место в возникновении злокачественных лимфоидных новообразований, в т. ч. ДВКЛ. Одной из критически значимых сигнальных молекул BCR, являющейся перспективной мишенью таргетной терапии, считается тирозинкиназа Syk. Белок участвует в регуляции нисходящей передачи сигнала в клетке, ангиогенезе, а также клеточной дифференцировке от стадии пре-В-клеток до плазмочитов. Избыточная экспрессия фосфорилированной формы Syk (pSyk) способствует нарушению созревания лимфоидных элементов на стадии пре-В-клетки, возникновению мутаций и злокачественной трансформации лимфоцитов [10, 11]. Работы, посвященные изучению прогностического значения pSyk, проводились преимущественно при солидных опухолях. Сведения о значении их экспрессии при ДВКЛ отсутствуют.

Сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR взаимодействует со множеством онкогенных путей и опосре-

**Таблица 1.** Характеристика больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Показатель	Число пациентов, %
Пол	
Мужчины	49
Женщины	51
Возраст	
≥ 60 лет	60
< 60 лет	40
В-симптомы	
Нет	51
Есть	49
Стадия по Ann Arbor	
I–II	40
III–IV	60
Экстранодальные поражения	
Нет	64
Есть	36
Концентрация ЛДГ	
Норма	50
Выше нормы	50
Иммуногистохимический подтип	
GCB	35
non-GCB	65
МПИ	
≤ 2 баллов	45
> 2 баллов	55
Ответ на противоопухолевую терапию	
Полный	62
Частичный/рецидив/рефрактерность	38
Статус пациента на момент исследования	
Летальный исход	35
Остается под наблюдением	65

ЛДГ — лактатдегидрогеназа; МПИ — международный прогностический индекс.

дует широкий спектр клеточных функций, включая пролиферацию, апоптоз, метаболизм, ангиогенез [12, 13]. Активация пути представляет собой ферментный каскад последовательных реакций фосфорилирования таких ключевых белков, как PI3K, PIP2, PIP3, протеинкиназа В (АКТ1), негативный регулятор передачи сигнала РТЕН и др. Особое внимание уделяется исследованию функций белка АКТ1, т. к. он является онкогеном при многих злокачественных опухолях, в т. ч. ДВКЛ [14, 15]. Показано, что повышенный уровень фосфорилированных форм этого фермента влияет на устойчивость опухоли к химиотерапии через негативную регуляцию активности белков-транспортеров, контролирующих поступление и выведение веществ из клетки [16, 17]. Результаты исследований прогностического значения рАКТ1 при ДВКЛ противоречивы, что определяет необходимость дальнейшего изучения указанного сигнального белка.

Таким образом, функционирование сигнальных путей PI3K/АКТ/mTOR и BCR при ДВКЛ изучено недостаточно. Не установлено значение изолированной и сочетанной экспрессии рАКТ1 и рSyk при определении прогноза заболевания.

**Цель исследования** — оценить прогностическое значение экспрессии рАКТ1 и рSyk при ДВКЛ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование включено 100 первичных пациентов с морфологически и иммуногистохимически подтвержденным диагнозом ДВКЛ, установленным в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2008–2017 гг. [13]. Больные обследовались в КНИИГиПК ФМБА России с 2012 по 2018 г. (клинико-диагностическое отделение гематологии и химиотерапии с дневным стационаром) и получали терапию первой линии по схеме R-СНОР. Медиана возраста больных составила 59 лет (диапазон 24–83 года). Среди заболевших 60 % ( $n = 60$ ) представлены возрастной группой 60 лет и старше, 40 % ( $n = 40$ ) составили пациенты моложе 60 лет. Распределение пациентов по полу было сопоставимым: 49 мужчин, 51 женщина. Клиническая характеристика больных ДВКЛ представлена в табл. 1. Проведение научной работы одобрено локальным этическим комитетом КНИИГиПК ФМБА России (протокол № 30 от 27.10.2021 г.).

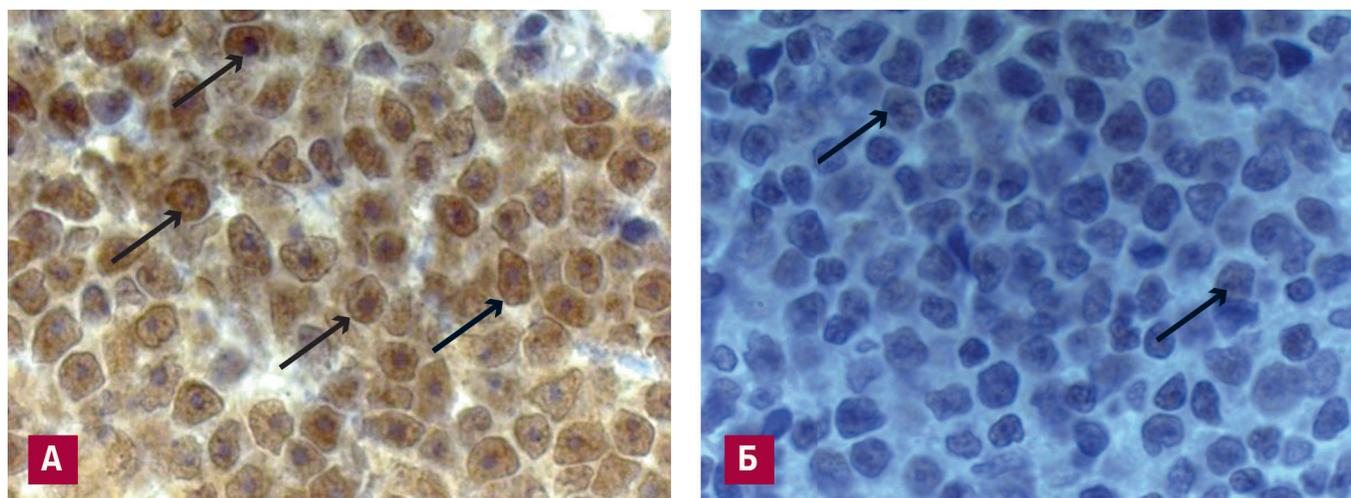
Для исследования использовали архивные образцы (парафиновые блоки) и интраоперационный материал лимфатических узлов или других вовлеченных в патологический процесс тканей. Морфологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследования выполняли в лаборатории патоморфологии ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России (зав. лабораторией канд. мед. наук Д.А. Дьяконов). Постановку ИГХ-реакций осуществляли непрямым пероксидазным методом в соответствии с протоколом для систем визуализации EnVISION (DAB+, Dako) с использованием широкой диагностической панели антител. Для обнаружения рАКТ1 (GeneTex, phosphor Ser473) и рSyk (GeneTex, phosphor Tyr348) в опухолевых клетках гистологические срезы инкубировали с соответствующими моноклональными антителами (GeneTex). ИГХ-подтип опухоли определяли на основании алгоритма Hans. В 35 случаях установлен GCB-подтип ДВКЛ, в 65 — non-GCB.

Тирозинкиназа рSyk и протеинкиназа рАКТ1 являются важнейшими ферментами в системе передачи сигналов в клетке, т. е. относятся к активационным (сигнальным) белкам.

Морфометрическую оценку относительного содержания опухолевых клеток выполняли визуально способом двойного «слепого» анализа на световом микроскопе AxioScore.A1 со встроенной фото-/видеокамерой и программным обеспечением анализа изображений (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Оценивали 10 полей зрения в каждом образце с применением окуляров  $\times 10$  и объектива  $\times 100$ . Исходя из полученных результатов, вычисляли среднее относительное содержание антигенпозитивных опухолевых клеток в исследуемом материале.

### Статистический анализ

Статистическую обработку данных, полученных в ходе исследования, проводили с использованием статистической программы IBM SPSS Statistics 26. Прогностически значимый порог экспрессии белков

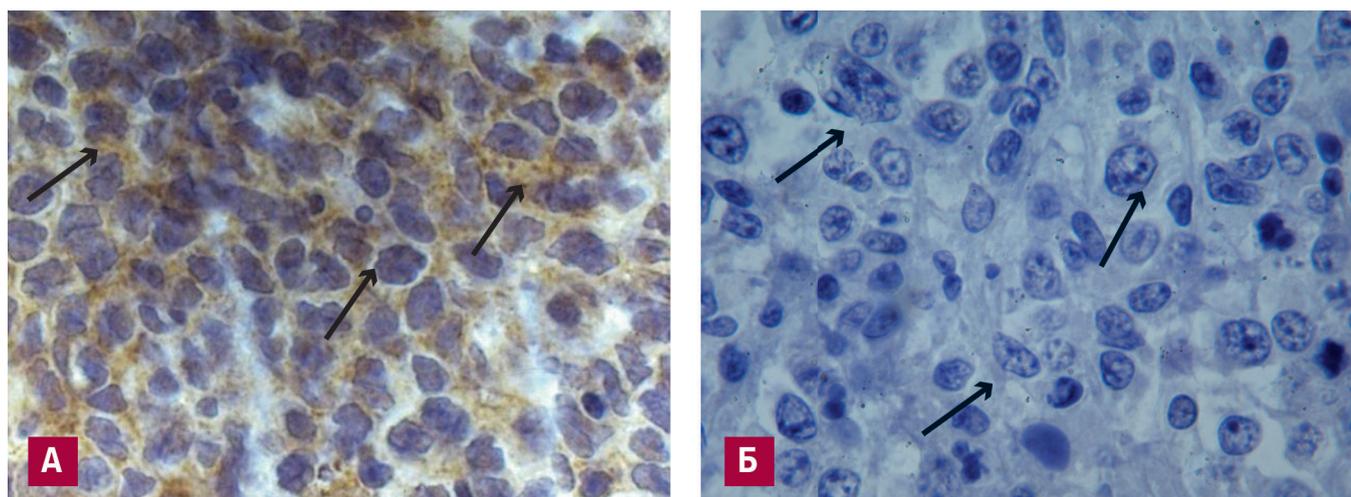


**Рис. 1.** Диффузная В-крупноклеточная лимфома. Биоптат лимфатического узла. Иммуногистохимическое окрашивание опухолевых клеток моноклональным антителом к pAKT1 (клон phosphor Ser473), система визуализации EnVision (Dako, Дания). Продукт реакции окрашен в коричневый цвет (стрелки). Докраска ядер гематоксилином,  $\times 1000$ :

А — высокая экспрессия (количество опухолевых клеток, экспрессирующих pAKT1,  $\geq 70\%$ ); Б — низкая экспрессия (количество опухолевых клеток, экспрессирующих pAKT1,  $< 70\%$ )

**Fig. 1.** Diffuse large B-cell lymphoma. Lymph node biopsy. Immunohistochemical staining of tumor cells by monoclonal pAKT1 antibody (clone phosphor Ser473), EnVision visualization system (Dako, Denmark). The reaction product is brown (arrows). Hematoxylin final nuclear staining,  $\times 1000$ :

А — high expression (count of pAKT1-expressing tumor cells  $\geq 70\%$ ); Б — low expression (count of pAKT1-expressing tumor cells  $< 70\%$ )



**Рис. 2.** Диффузная В-крупноклеточная лимфома. Биоптат лимфатического узла. Иммуногистохимическое окрашивание опухолевых клеток моноклональным антителом к pSyc (клон phosphor Tyr348), система визуализации EnVision (Dako, Дания). Продукт реакции окрашен в коричневый цвет (стрелки). Докраска ядер гематоксилином,  $\times 1000$ :

А — высокая экспрессия (количество опухолевых клеток, экспрессирующих pSyc,  $\geq 28\%$ ); Б — низкая экспрессия (количество опухолевых клеток, экспрессирующих pSyc,  $< 28\%$ )

**Fig. 2.** Diffuse large B-cell lymphoma. Lymph node biopsy. Immunohistochemical staining of tumor cells by monoclonal pSyc antibody (clone phosphor Tyr348), EnVision visualization system (Dako, Denmark). The reaction product is brown (arrows). Hematoxylin final nuclear staining,  $\times 1000$ :

А — high expression (count of pSyc-expressing tumor cells  $\geq 28\%$ ); Б — low expression (count of pSyc-expressing tumor cells  $< 28\%$ )

pAKT1, pSyc в опухолевых клетках вычисляли с помощью ROC-анализа с расчетом соответствующих показателей специфичности и чувствительности. Высокий, или надпороговый, — уровень экспрессии маркера выше порогового значения (для pAKT1 —  $\geq 70\%$  опухолевых клеток, для pSyc —  $\geq 28\%$ ); низкий, или подпороговый, — уровень экспрессии белка ниже порогового значения (для pAKT1 —  $< 70\%$  опухолевых клеток, для pSyc —  $< 28\%$ ) (рис. 1 и 2). Пороговый уровень соответствует критическому значению опухолевых клеток, экспрессирующих тот или иной маркер.

Согласно установленным пороговым значениям, всех обследуемых разделили на группы с высокой (гиперэкспрессия:  $\geq 70\%$  (+) для pAKT1;  $\geq 28\%$  (+) для pSyc) и низкой ( $< 70\%$  (-) для pAKT1;  $< 28\%$  (-) для pSyc) экспрессией белков. Проанализировали взаимосвязь различных вариантов коэкспрессии pAKT1 и pSyc с течением ДВКЛ.

Статистическую оценку наличия/отсутствия связи изучаемых маркеров с клиническими характеристиками опухоли осуществляли с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона с расчетом отношения шансов

Таблица 2. Взаимосвязь экспрессии pAKT1 и pSyk с клиническими показателями диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Показатель	Экспрессия pAKT1				Экспрессия pSyk			
	Высокая (n = 43), n (%)	Низкая (n = 57), n (%)	ОШ (95% ДИ)	p	Высокая (n = 32), n (%)	Низкая (n = 68), n (%)	ОШ (95% ДИ)	p
Пол								
Мужчины	22 (44,9)	27 (55,1)	1,0 (0,30–0,96)	0,580	20 (40,8)	29 (59,2)	0,6 (0,73–1,1)	0,785
Женщины	26 (51,0)	25 (49,0)			29 (56,9)	22 (43,1)		
Возраст								
≥ 60 лет	30 (50,0)	30 (50,0)	1,1 (0,12–0,99)	0,387	39 (65,0)	21 (35,0)	1,2 (0,50–2,30)	0,436
< 60 лет	18 (45,0)	22 (55,0)			17 (42,5)	23 (57,5)		
Стадия по Ann Arbor								
I–II	11 (27,5)	29 (72,5)	0,3 (0,14–0,78)	<b>0,011</b>	13 (32,7)	27 (68,3)	0,9 (0,75–1,30)	0,930
III–IV	32 (53,3)	28 (46,7)			19 (32,5)	41 (67,5)		
В-симптомы								
Нет	29 (49,2)	30 (50,8)	1,8 (0,81–4,24)	0,136	23 (39,0)	36 (61,0)	1,7 (0,92–3,44)	0,085
Есть	14 (34,1)	27 (65,9)			9 (28,0)	32 (47,0)		
Экстранодальные поражения								
Нет	18 (43,9)	23 (56,1)	1,0 (0,47–2,37)	0,879	10 (24,4)	31 (75,6)	0,5 (0,22–1,37)	0,174
Есть	25 (42,4)	34 (57,6)			22 (37,3)	37 (62,7)		
Концентрация ЛДГ								
Норма	31 (45,6)	37 (54,4)	1,4 (0,50–3,30)	0,446	11 (34,4)	21 (69,1)	0,8 (0,49–1,63)	0,727
Выше нормы	12 (37,5)	20 (62,5)			21 (30,9)	47 (69,1)		
МПИ								
≤ 2 баллов	26 (57,8)	19 (42,2)	3,0 (1,34–6,96)	<b>0,007</b>	15 (33,3)	30 (66,7)	0,9 (0,73–1,26)	0,796
> 2 баллов	17 (30,9)	38 (69,1)			17 (30,9)	38 (69,1)		
Ответ на противоопухолевую терапию								
Полный	22 (57,9)	16 (42,1)	2,7 (1,17–6,16)	<b>0,019</b>	15 (39,5)	23 (60,5)	1,1 (0,61–1,91)	0,210
Частичный/рецидив/рефрактерность	21 (33,9)	41 (66,1)			17 (27,4)	45 (72,6)		
Иммуногистохимический подтип								
GCB	15 (22,9)	20 (77,1)	3,9 (1,55–9,95)	<b>0,003</b>	11 (28,6)	24 (71,4)	1,3 (0,52–3,13)	0,591
non-GCB	28 (53,8)	37 (46,2)			21 (33,8)	44 (66,2)		

95% ДИ — 95%-й доверительный интервал; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; МПИ — международный прогностический индекс; ОШ — отношение шансов. Полушириным шрифтом выделены статистически значимые различия между группами.

(ОШ) и 95%-го доверительного интервала (95% ДИ). В случае числа ожидаемых частот менее 5 применяли точный двусторонний критерий Фишера (F). 5-летние общую выживаемость (ОВ) и выживаемость без прогрессирования (ВБП) рассчитывали по методу Каплана—Мейера с графическим построением соответствующих кривых (лог-ранговый тест) и расчетом отношения рисков (ОР) и 95% ДИ. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

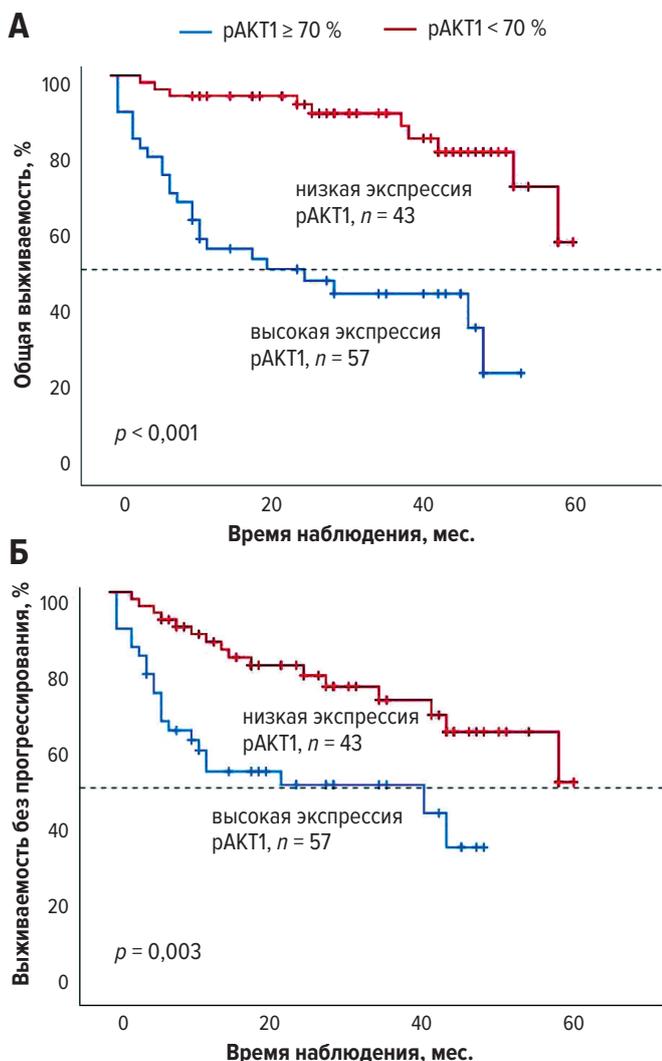
Проанализирован характер распределения вариантов изолированной экспрессии биомаркеров pAKT1, pSyk в группах пациентов с различными клиническими характеристиками ДВКЛ (табл. 2). При этом наиболее значимые закономерности обнаружены для белка pAKT1. Установлено, что гиперэкспрессия pAKT1 в 2 раза чаще регистрировалась у пациентов с III–IV стадией заболевания, чем у больных с I–II стадией (53,3 и 27,5 % соответственно;  $p = 0,011$ ). Надпороговый уровень экспрессии pAKT1 почти в 2 раза чаще выявлялся у пациентов с высоким и промежуточным высоким риском по шкале МПИ, чем у больных с низкими значениями этого показателя (57,8 и 30,9 % соответственно;  $p = 0,007$ ).

У пациентов с гиперэкспрессией pAKT1 шансы на регистрацию неудачи терапии увеличивались в 2,7 раза по сравнению с больными, имевшими низкую выраженность маркера по количеству опухолевых клеток (ОШ 2,7;  $p = 0,019$ ). Взаимосвязи изучаемого биомаркера с другими клиническими показателями не обнаружено ( $p > 0,05$ ).

Гиперэкспрессия pSyk преобладала у лиц возрастной группы 60 лет и старше, у обследуемых с В-симптомами, повышенной концентрацией сывороточной лактатдегидрогеназы, значениями МПИ > 2 баллов и прогрессированием заболевания ( $p > 0,05$ ).

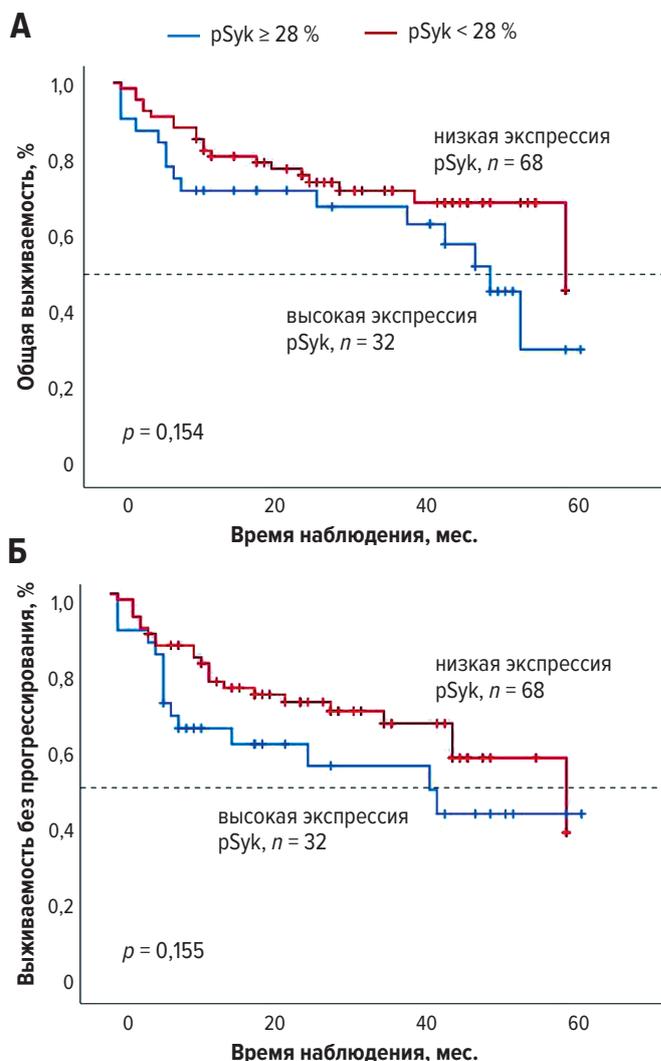
Частота высокой экспрессии pAKT1 у обследуемых с подтипом non-GCB была статистически значимо выше по сравнению с пациентами с GCB-вариантом ДВКЛ (53,8 % и 22,9 % соответственно;  $p = 0,003$ ).

В результате анализа 5-летней ОВ в группах пациентов с дифференцированной экспрессией pAKT1 установлены межгрупповые отличия (рис. 3). Показатель 5-летней ОВ статистически значимо различался у обследуемых с высоким и подпороговым уровнями экспрессии маркера (41,2 и 82,5 % соответственно;  $p < 0,001$ ). Вероятность не дожить до 5-летнего рубежа у лиц с гиперэкспрессией белка pAKT1 была в 5,7 раза выше в сравнении с пациентами, у которых



**Рис. 3.** Общая (А) и выживаемость без прогрессирования (Б) в группах больных ДВКЛ с различным уровнем экспрессии pAKT1

**Fig. 3.** Overall (A) and progression-free (B) survivals depending on pAKT1 expression levels in DLBCL patients



**Рис. 4.** Общая (А) и выживаемость без прогрессирования (Б) в группах больных ДВКЛ с различным уровнем экспрессии pSyk

**Fig. 4.** Overall (A) and progression-free (B) survivals depending on pSyk expression levels in DLBCL patients

зарегистрирован низкий уровень его экспрессии (ОР 5,7; 95% ДИ 2,65–12,49;  $p < 0,001$ ).

В группе пациентов с надпороговым уровнем экспрессии pAKT1 5-летняя ВВП соответствовала 39,7 % при медиане выживаемости 41 мес. и была значительно ниже таковой у обследуемых с низкой выраженностью маркера по количеству опухолевых клеток (65,1 % при недостигнутой медиане;  $p = 0,003$ ). При этом риск развития рецидива/прогрессирования ДВКЛ у лиц с гиперэкспрессией белка pAKT1 был в 2,7 раза выше, чем у лиц с низким уровнем его выраженности (ОР 2,7; 95% ДИ 1,42–5,33;  $p = 0,001$ ).

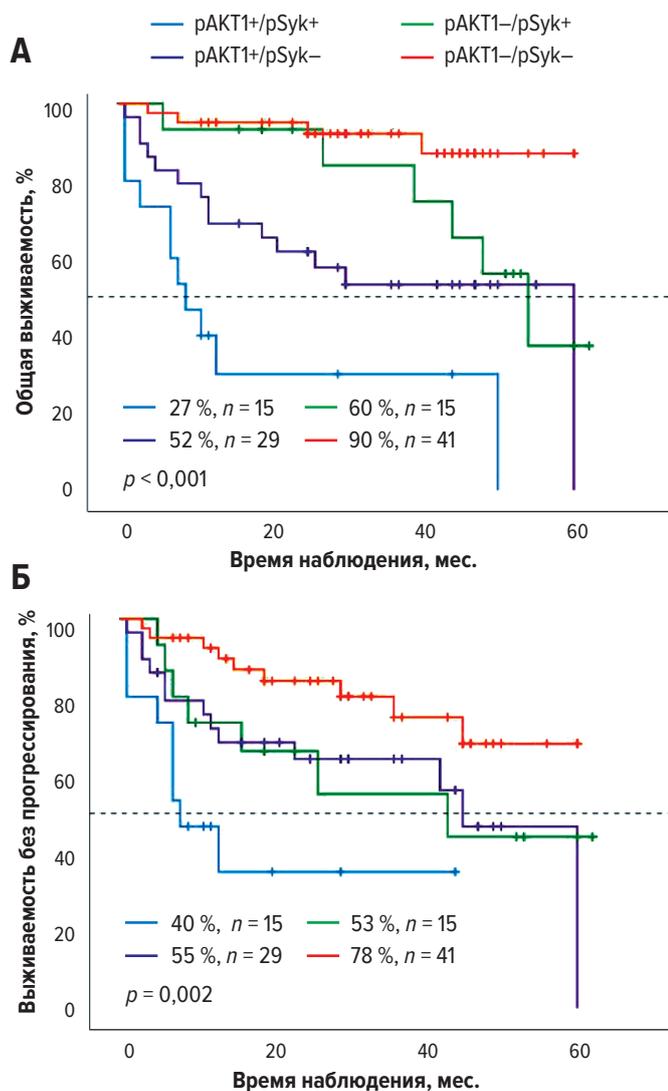
У больных с гиперэкспрессией pSyk 5-летняя ОВ составила 53,1 % при медиане выживаемости 47 мес., у обследуемых с низкой выраженностью маркера — 70,6 % (медиана не достигнута). Однако полученные различия не были статистически значимыми ( $p = 0,154$ ) (рис. 4).

5-летняя ВВП у пациентов с гиперэкспрессией pSyk была в 1,2 раза ниже по сравнению с группой обследуемых, имевших низкую экспрессию биомаркера (53,1 и 66,2 % соответственно). При этом статистически

значимой связи экспрессии pSyk с ВВП не установлено ( $p = 0,155$ ).

Изучалась сочетанная экспрессия AKT1 и pSyk при ДВКЛ (рис. 5). Комбинация pAKT1+/pSyk+ зарегистрирована у 15 пациентов, одновременно низкая экспрессия белков (pAKT1-/pSyk-) — у 41. Варианты сочетанной экспрессии pAKT1+/pSyk- и pAKT1-/pSyk+ выявлены у 29 и 15 обследуемых соответственно.

Лучшие показатели 5-летней ОВ зафиксированы в группе пациентов с одновременной низкой экспрессией онкобелков (90,2 %, медиана не достигнута). Эти данные статистически значимо отличались от показателей 5-летней ОВ у больных с сочетанной гиперэкспрессией маркеров: 26,7 % при медиане 10 мес. ( $p < 0,001$ ). Риск наступления неблагоприятного события у обследуемых с вариантом экспрессии pAKT1+/pSyk+ при использовании стандартной схемы R-CHOP возрастал в 5,2 раза по сравнению с больными, имевшими одновременно низкую выраженность отмеченных биомаркеров или изолированную гиперэкспрессию одного из них (ОР 5,2; 95% ДИ 2,49–10,9;  $p < 0,001$ ).



**Рис. 5.** Общая (А) и выживаемость без прогрессирования (Б) в группах больных ДВКЛ с коэкспрессией pAKT1 и pSyk

**Fig. 5.** Overall (A) and progression-free (B) survivals depending on pAKT1 and pSyk co-expression in DLBCL patients

При оценке 5-летней ВБП значение этого показателя в группе лиц с одновременной гиперэкспрессией pAKT1 и pSyk соответствовало 40 % при медиане 14 мес. vs 78,1 % (медиана не достигнута) у обследуемых с подпороговым уровнем экспрессии маркеров. Риск развития рецидива/прогрессирования в группе больных с сочетанием pAKT1+/pSyk+ был в 3,3 раза выше, чем у лиц с другими комбинациями их экспрессии (ОР 3,3; 95% ДИ 1,54–7,30;  $p = 0,002$ ).

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что биомаркер pAKT1 может служить предиктором неблагоприятного прогноза при ДВКЛ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

ДВКЛ является самой частой нозологической формой среди всех неходжкинских лимфом взрослых. В настоящее время активно изучается значение сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR, BCR в патогенезе ДВКЛ. Показано, что степень экспрессии основных моле-

кул-посредников (pAKT1, pSyk) этих путей влияет на биологическое поведение опухолевых клеток и определяет прогноз заболевания. Однако полученные результаты отличаются противоречивостью.

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ экспрессии маркеров pAKT1 и pSyk с биологическими параметрами опухоли, а также с выраженностью клинических проявлений ДВКЛ. В результате установлен ряд закономерностей, которые в основном связаны с особенностями экспрессии маркера pAKT1. Определена взаимосвязь гиперэкспрессии pAKT1 с неблагоприятными клиническо-биологическими параметрами заболевания (non-GCB-подтипом заболевания, III–IV стадией, высоким и промежуточным высоким риском в соответствии с критериями МПИ, неудачами терапии по схеме R-CHOP). Результаты исследования указывают на связь высокого уровня экспрессии pAKT1 с распространенностью опухолевого процесса в дебюте ДВКЛ.

Установлена взаимосвязь дифференцированной экспрессии pAKT1 с прогнозом ДВКЛ. В группе больных с гиперэкспрессией белка регистрировались наихудшие показатели ОВ и ВБП по сравнению с пациентами, имевшими подпороговый уровень экспрессии маркера. Полученные данные подтверждают результаты исследований других авторов [16, 17]. Вероятно, более низкая выживаемость больных с высокой экспрессией pAKT1 связана с антиапоптотическим эффектом белка, опосредованным синергизмом с белком BCL2. Кроме того, этот биомаркер способствует подавлению экспрессии ингибиторов циклинзависимых киназ, следствием чего является бесконтрольное деление опухолевых клеток. Таким образом, выявление гиперэкспрессии pAKT1 на этапе первичной диагностики служит фактором высокого риска неблагоприятного течения ДВКЛ при использовании стандартных программ лечения и дает возможность выделить группу пациентов, требующих другого подхода к терапии.

Корреляция экспрессии маркера pSyk с течением заболевания не установлена. Предположительно это связано с тем, что передача сигнала через BCR при ДВКЛ осуществляется в обход тирозинкиназы за счет других посредников, а также с более сильным влиянием регуляторных компонентов взаимосвязанных с ним каскадов.

Согласно современным представлениям, сигнальная система клетки — это сложноорганизованный комплекс, состоящий из множества пересекающихся и взаимодействующих сигнальных ферментных каскадов. Постоянная активация какого-либо фермента оказывает влияние не только на функции того сигнального пути, к которому он относится, но и на другие каскады. Поскольку в трансформированных В-лимфоцитах при ДВКЛ часто отмечается дисрегуляция сразу нескольких сигнальных путей, представляло интерес изучить связь коэкспрессии pAKT1 и pSyk с течением заболевания.

Установлено, что больные с сочетанной гиперэкспрессией биомаркеров отличались худшей выживаемостью или прогрессирующим течением заболевания по сравнению с группой пациентов, имевших одновременно низкую экспрессию pAKT1 и pSyk. На

основании полученных результатов можно предположить, что наличие активации нескольких сигнальных путей способствует значительному повышению пролиферативной активности опухолевых клеток, а также устойчивости патологического процесса к проводимому лечению. Анализ дифференцированной экспрессии биомаркеров pAKT1 и pSyk на этапе первичной диагностики ДВКЛ может способствовать выявлению групп пациентов с возможным неблагоприятным ответом на стандартную терапию этой опухоли. Исследования коэкспрессии белков pAKT1 и pSyk при ДВКЛ не проводились.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, pAKT1 может рассматриваться в качестве дополнительного критерия прогноза течения ДВКЛ. Сочетанная гиперэкспрессия маркеров pAKT1 и pSyk увеличивает риск летального исхода или прогрессирования заболевания в сравнении с их изолированной гиперэкспрессией. Взаимосвязи изолированной экспрессии pSyk с неблагоприятными параметрами заболевания, а также с выживаемостью больных не выявлено.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Е.В. Ванеева, В.А. Росин, Д.А. Дьяконов.

**Сбор и обработка данных:** В.А. Росин, Е.В. Ванеева.

**Предоставление материалов исследования:** С.В. Самарина.

**Анализ и интерпретация данных:** Е.В. Ванеева, В.А. Росин.

**Подготовка рукописи:** В.А. Росин, Е.В. Ванеева, Д.А. Дьяконов.

**Административная поддержка:** И.В. Парамонов.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Bahar T, Chowdhury ZZ, Rahman S, et al. Clinicopathological Correlation with Outcome of Diffuse Large B Cell Lymphoma: Experience in a Specialized Cancer Care Centre in Bangladesh. *J Medicine*. 2021;22(1):3–6. doi: 10.3329/jom.v22i1.51383.
- Самарина С.В., Лучинин А.С., Минаева Н.В. и др. Иммуногистохимический подтип и параметры международного прогностического индекса в новой модели прогноза диффузной В-крупноклеточной лимфомы. *Клиническая онкогематология*. 2019;12(4):385–90. doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-385-390.
- [Samarina SV, Luchinin AS, Minaeva NV, et al. Immunohistochemical Subtype and Parameters of International Prognostic Index in the New Prognostic Model of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clinical oncohematology*. 2019;12(4):385–90. doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-385-390. (In Russ)]
- Mondello P, Mian M, Frontline treatment of diffuse large B-cell lymphoma: Beyond R-CHOP. *Hematol Oncol*. 2019;37(4):333–44. doi: 10.1002/hon.2613.
- Song JL, Wei XL, Zhang YK, et al. The prognostic value of the international prognostic index, the national comprehensive cancer network IPI and the age-adjusted IPI in diffuse large B cell lymphoma. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2018;39(9):739–44. doi: 10.3760/cmaj.issn.0253-2727.2018.09.007.
- Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(1):12–23. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.197.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503–11. doi: 10.1038/35000501.
- Расторгуев С.М., Королева Д.А., Булыгина Е.С. и др. Клиническое и прогностическое значение молекулярных маркеров диффузной В-крупноклеточной лимфомы. *Клиническая онкогематология*. 2019;12(1):95–100. doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-1-95-100.
- [Rastorguev SM, Koroleva DA, Boulygina ES, et al. Clinical and Prognostic Value of Molecular Markers of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clinical oncohematology*. 2019;12(1):95–100. doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-1-95-100. (In Russ)]
- Miao Yi, Medeiros LJ, Xu-Monette ZY, et al. Dysregulation of Cell Survival in Diffuse Large B Cell Lymphoma: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Front Oncol*. 2019;9:107. doi: 10.3389/fonc.2019.00107.
- Seda V, Mraz M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol*. 2014;94(3):193–205. doi: 10.1111/ejh.12427.
- Никитин Е.А. Передача сигнала через В-клеточный рецептор: механизмы и ингибиторы. *Клиническая онкогематология*. 2014;7(3):251–63. [Nikitin EA. BCell Receptor Signaling Pathway: Mechanisms and Inhibitors. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2014;7(3):251–63. (In Russ)]
- Wossnig T, Herzog S, Kohler F, et al. Dereglated Syk inhibits differentiation and induces growth factor-independent proliferation of pre-B cells. *J Exp Med*. 2006;203(13):2829–40. doi: 10.1084/jem.20060967.
- Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, Purohit R. AKT Kinase Pathway: A Leading Target in Cancer Research. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013:756134. doi: 10.1155/2013/756134.
- Ванеева Е.В., Росин В.А., Дьяконов Д.А. и др. Значение экспрессии pAKT1 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. *Бюллетень сибирской медицины*. 2021;3:6–13.
- [Vaneeva EV, Rosin VA, D'yakonov DA, et al. Significance of pAKT1 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Byulleten' sibirskoi meditsiny*. 2021;3:6–13. (In Russ)]
- Karmali R, Gordon LI. Molecular Subtyping in Diffuse Large B Cell Lymphoma: Closer to an Approach of Precision Therapy. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(2):11. doi: 10.1007/s11864-017-0449-1.
- Wang X, Cao X, Sun R, et al. Clinical Significance of PTEN Deletion, Mutation, and Loss of PTEN Expression in De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Neoplasia*. 2018;20(6):574–93. doi: 10.1016/j.neo.2018.03.002.
- Wang J, Xu-Monette ZY, Jabbar KJ, et al. AKT Hyperactivation and the Potential of AKT-Targeted Therapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Pathol*. 2017;187(8):1700–16. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.04.009.
- Hong JY, Hong ME, Choi MK, et al. The impact of activated p-AKT expression on clinical outcomes in diffuse large B-cell lymphoma: A clinicopathological study of 262 cases. *Ann Oncol*. 2014;25(1):182–8. doi: 10.1093/annonc/mdt530.