Клин. онкогематол. 2015; 8(1): 44–53
ОНКО клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ
КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ЛИМФОИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Klin. Onkogematol. 2015; 8(1): 44–53
ONCO clinical HEMATOLOGY
LYMPHOID MALIGNANCIES

Экспрессия белков MYC и BCL2 у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

А.Е. Мисюрина[1], А.М. Ковригина[1], Е.А. Барях[1], В.А. Мисюрин[2], С.К. Кравченко[1], А.В. Мисюрин[2], Т.Н. Обухова[1], С.М. Куликов[1], А.Н. Копылов[2], А.У. Магомедова[1], Э.Г. Гемджян[1], А.И. Воробьев[1]

[1] ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ, Новый Зыковский пр-д., д. 4а, Москва, Российская Федерация, 125167

[2] ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

MYC and BCL2 Protein Expression in Patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma

A.E. Misyurina[1], A.M. Kovrigina[1], E.A. Baryakh[1], V.A. Misyurin[2], S.K. Kravchenko[1], A.V. Misyurin[2], T.N. Obukhova[1], S.M. Kulikov[1], A.N. Kopylov[2], A.U. Magomedova[1], E.G. Gemdzhyan[1], A.I. Vorob'ev[1]

[1] Hematology Research Center under the Ministry of Health of the Russian Federation, 4a Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

[2] N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

РЕФЕРАТ

Цель. Анализ частоты и роли экспрессии белков MYC и BCL2 у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ), сопоставление результатов гистологического, иммуногистохимического, генетического и молекулярно-биологического исследований с клиническими характеристиками.

Методы. В исследование включено 62 пациента с подтвержденным диагнозом ДВКЛ, получавших лечение в ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ по оригинальному модифицированному протоколу m-NHL-BFM-90 ± R. Группу сравнения составили 13 больных ДВКЛ, которым лечение проводилось по CHOP-подобным программам ± R. Во всех наблюдениях гистологическое и иммуногистохимическое исследования проводились на архивном материале биопсии фрагмента опухолевой ткани или лимфатического узла (парафиновые блоки) с использованием антител к BCL2 (клон 124, Dako), MYC (клон Y69, Epitomics). На основании алгоритма C.P. Hans (2004) был установлен GCB или non-GCB иммуногистохимический подтип ДВКЛ. В работе проводились стандартные цитогенетические исследования (n = 19), FISH (n = 52) для выявления перестройки локуса гена *c-MYC*, гена *IgH,* t(8;14)(q24;q32), гена *BCL2,* t(14;18)(q32;q21) и количественная ПЦР в реальном времени на парафиновых блоках биоптата опухоли/лимфатического узла с целью определить количество мРНК генов *c-MYC* и *BCL2* (n = 17).

Результаты. Экспрессия MYC выявлена у 24 (39%) из 62 больных ДВКЛ, BCL2 — у 36 (58%) из 62 (пороговые значения 40 и 50% опухолевых клеток соответственно). Коэкспрессия MYC/BCL2 обнаружена у 15 (24%) из 62 больных ДВКЛ. Коэкспрессия MYC/BCL2 чаще выявлялась

ABSTRACT

Objective. The objective of this study is to analyze the incidence and the role of MYC and BCL2 protein expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and to compare data of histological, immunohistochemical, genetic, and molecular analyses with clinical characteristics.

Methods. 62 patients with confirmed diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) were enrolled in the study; they underwent treatment according to the original modified protocol NHL-BFM-90 ± R in the Hematology Research Center under the Ministry of Health of the Russian Federation. A reference group consisted of 13 DLBCL patients who underwent CHOP-like ± R therapy. In all observations, histological and immunohistochemical tests were performed in archived biopsy samples of a tumor tissue or a lymph node (paraffin blocks) using BCL2 (clone 124, Dako) and MYC antibodies (clone Y69, Epitomics). Based on C.P. Hans's algorithm (2004), GCB and non-GCB immunohistochemical subtypes of DLBCL were determined. Standard cytogenetic tests (n = 19) and FISH analysis (n = 52) were performed in this study in order to determine locus translocation of *c-MYC* gene, *IgH* gene, t(8;14)(q24;q32), *BCL2* gene, t(14;18)(q32;q21). Quantitative RQ-PCR on paraffin tumor/node biopsy samples was also performed to evaluate the number of mRNAs of *c-MYC* and *BCL2* genes.

Results. MYC expression was found in 24 (39%) of 62 DLBCL patients and BCL2 in 36 (58%) of 62 patients (threshold values were 40% and 50% of tumor cells, respectively). MYC/BCL2 coexpression was revealed more frequently in non-GCB subtype (11 [29%] *vs* 4 [17%], p = 0.18). *c-MYC* rearrangement was revealed in one case, MYC protein expression was 90%. 11 (21%) patients had one or more (up to 4) additional signals from *c-MYC* gene [8q24]. *BCL2* gene rearrangement

© 2015 практическая медицина

при non-GCB иммуногистохимическом подтипе ДВКЛ (11 (29%) *vs* 4 (17%), $p = 0,18$). У одного больного выявлена перестройка гена *c-MYC*, транслокация t(8;14)(q24;q32), что сопровождалось экспрессией MYC (90%). У 11 (21%) пациентов выявлен один или более (до 4) дополнительных сигналов от гена *c-MYC* [8q24]. Перестройка гена *BCL2* не выявлена ни в одном наблюдении. Дополнительные сигналы (от 1 до 4) от гена *BCL2* [18q21] выявлены у 17 (40%) больных. Наблюдалась корреляция между количеством мРНК гена *c-MYC* и белка MYC ($R^2 = 0,13$; $p = 0,08$). Не было обнаружено корреляции между уровнем экспрессии мРНК гена *BCL2* и количеством белка BCL2 ($R^2 = –0,07$; $p = 0,98$). Общая 4-летняя выживаемость в группе больных, которым проводилось лечение по протоколу m-NHL-BFM-90 ± R, без коэкспрессии MYC и BCL2 составила 71 *vs* 57% в группе с коэкспрессией MYC/BCL2 ($p = 0,39$). Вероятность развития рецидивов/прогрессирования у больных ДВКЛ с коэкспрессией MYC/BCL2 статистически значимо выше, чем в группе без коэкспрессии (65 *vs* 15%; $p = 0,0029$). При многофакторном анализе коэкспрессия MYC/BCL2 была независимым от IPI, GCB/non-GCB иммуногистохимического подтипа фактором риска развития рецидива/прогрессирования ДВКЛ.

Заключение. Коэкспрессия MYC/BCL2 встречается преимущественно у пациентов с ДВКЛ иммуногистохимического подтипа non-GCB. У больных ДВКЛ, получающих интенсивную химиотерапию по протоколу m-NHL-BFM-90 ± R, коэкспрессия MYC/BCL2 имеет независимое прогностическое значение в отношении риска развития рецидивов/прогрессирования заболевания. Полученные в работе данные могут служить обоснованием для разработки диагностического иммуногистохимического алгоритма стратификации пациентов с ДВКЛ.

Ключевые слова: ДВКЛ, интенсивная терапия, коэкспрессия MYC/BCL2, иммуногистохимия, фактор неблагоприятного прогноза.

Получено: 8 ноября 2014 г.
Принято в печать: 11 ноября 2014 г.

Для переписки: Анна Евгеньевна Мисюрина, Новый Зыковский пр-д., д. 4а, Москва, Российская Федерация, 125167;
тел.: +7(909)637-32-49; e-mail: anna.lukina1@gmail.com

Для цитирования: Мисюрина А.Е., Ковригина А.М., Барях Е.А., Мисюрин В.А., Кравченко С.К., Мисюрин А.В., Обухова Т.Н., Куликов С.М., Копылов А.Н., Магомедова А.У., Гемджян Э.Г., Воробьев А.И. Экспрессия белков MYC и BCL2 у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Клин.онкогематол. 2015; 8(1): 44–53.

wasn't detected in any case. 17 (40%) patients had one or more (up to 4) additional signals from *BCL2* gene [18q21]. There was a correlation between the amount of *c-MYC* mRNA and *MYC* protein expression ($R^2 = 0.13$; $p = 0.08$). There was no correlation between the level of *BCL2* mRNA expression and the amount of protein BCL2 ($R^2 = –0.07$; $p = 0.98$). Four-year overall survival for DLBCL patients treated with m-NHL-BFM-90 ± R was 71% (in patients without MYC/BCL2 coexpression) *vs* 57% (in patients with MYC/BCL2 coexpression) ($p = 0.39$). The probability of relapse or progression of DLBCL was significantly higher in patients with MYC/BCL2 coexpression, than in patients without MYC/BCL2 coexpression (65% *vs* 15%; $p = 0.0029$). In multivariate analysis MYC/BCL2 coexpression was an independent risk factor (from IPI and GCB/non-GCB immunohistochemical subtype) of DLBCL relapse or progression in patients underwent intensive chemotherapy m-NHL-BFM-90 ± R.

Conclusion. The MYC/BCL2 coexpression is observed mainly in DLBCL patients with non-GCB immunohistochemical subtype of the disease. MYC/BCL2 coexpression had an independent prognostic value for chemotherapy response – probability of DLBCL relapse or progression in patients treated with intensive chemotherapy m-NHL-BFM-90 ± R. Current data provide a base for use MYC and BCL2 like risk stratification markers in patients with DLBCL.

Keywords: DLBCL, intensive therapy, MYC/BCL2 coexpression, immunohistochemistry, unfavorable prognostic factor.

Received: November 8, 2014
Accepted: November 11, 2014

For correspondence: Anna Evgen'evna Misyurina, 4a Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167;
Tel.: +7(909)637-32-46; e-mail: anna.lukina1@gmail.com

For citation: Misyurina A.E., Kovrigina A.M., Baryakh E.A., Misyurin V.A., Kravchenko S.K., Misyurin A.V., Obukhova T.N., Kulikov S.M., Kopylov A.N., Magomedova A.U., Gemdzhyan E.G., Vorob'ev A.I. MYC and BCL2 Protein Expression in Patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Klin. Onkogematol.* 2015; 8(1): 44–53 (In Russ.).

ВВЕДЕНИЕ

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) является гетерогенной группой опухолей, объединенных в одну нозологическую форму на основании специфических морфологических и иммуногистохимических признаков [1]. Результаты лечения больных с диагнозом ДВКЛ показывают, что ответ на химиотерапию и прогноз заболевания существенно различаются. На основании клинических и лабораторных параметров ДВКЛ стратифицируют в соответствии с критериями International Prognostic Index (IPI) на группы низкого, промежуточного и высокого риска, что коррелирует с показателями общей (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ) при лечении по схемам CHOP/R-CHOP-21 [2].

На основании определения профиля экспрессии генов (GEP) выделяют два молекулярных типа ДВКЛ, характеризующихся определенным профилем генов и соответствующих онкогенных мутаций: из активированных В-клеток и В-клеток герминативного центра (ABC и GCB), что соотносится с прогнозом заболевания при лечении по схемам CHOP/R-CHOP-21 [3–11]. Среди онкогенных событий в 5–14% случаев ДВКЛ выявляется перестройка гена *c-MYC*. Заболевание при этом характеризуется агрессивным течением и неблаго-

приятным прогнозом [12–14]. Приблизительно в 17 % случаев ДВКЛ обнаруживается перестройка гена *BCL2* t(14;18)(q32;q21) [15]. Перестройка гена *BCL6* [3q27] наблюдается в 20–40 % случаев ДВКЛ [16, 17], при этом увеличение количества мРНК *BCL6* связывают с благоприятным прогнозом ДВКЛ.

Несмотря на стремительное развитие молекулярно-биологических технологий и широкое использование цитогенетической диагностики, позволяющих определять наличие хромосомных нарушений, а также аномалий генов, контролирующих пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, прогностическое значение выявляемых изменений в ряде случаев остается неоднозначным. Это обусловлено тем, что даже при наличии генетической аномалии (перестройка гена/амплификация/делеция) количество белкового продукта при экспрессии гена может различаться. Известно три формы регулирования синтеза белка: 1) путем модуляции уровня экспрессии генов, что отражается на количестве синтезированной мРНК на матрице ДНК; 2) с помощью структурных перестроек мРНК, которые влияют на активность трансляции рибосомами; 3) путем регуляции срока жизни мРНК до ее деградации. **Учитывая, что именно белок является конечным эффектором, реализующим функции гена, включение в прогностические модели ДВКЛ параметров экспрессии белков, контролирующих ключевые этапы развития лимфоидной В-клетки, представляется оправданным.**

За последние три года в зарубежной литературе появились публикации, посвященные отрицательному влиянию коэкспрессии белков MYC/BCL2 на прогноз ДВКЛ при лечении по схемам CHOP/R-CHOP [18–20]. В зависимости от пороговых значений экспрессии MYC (40 %) и BCL2 (50–70 %) ДВКЛ с коэкспрессией белков встречается приблизительно в 15–21 % случаев. N.A. Johnson и соавт. показали, что коэкспрессия имеет прогностическое значение при уровне экспрессии MYC ≥ 40 % и BCL2 ≥ 50 % [20]. Роль белка BCL6, как правило, обсуждается мало, поскольку повышение уровня его экспрессии считается благоприятным событием [16, 17]. Однако в большинстве проведенных исследований [13, 18–21] рассматриваются случаи ДВКЛ, сопровождающиеся коэкспрессией MYC/BCL2, включая «double-hit»-лимфому *BCL2+/c-MYC+* с перестройкой соответствующих генов *BCL2* и *c-MYC*. При этом «double-hit»-лимфомы характеризуются крайне агрессивным течением и плохим прогнозом, что, бесспорно, могло повлиять на результаты и снизить показатели ОВ и БСВ в исследуемой группе.

В начале 2000-х годов в ФГБУ «Гематологический научный центр» (ГНЦ) разработан оригинальный протокол интенсивной химиотерапии m-NHL-BFM-90 для лечения взрослых больных ДВКЛ. Этот протокол, по данным одноцентрового исследования, показал значительно более высокую эффективность в сравнении со схемами CHOP-21/R-CHOP-21 при ДВКЛ с признаками неблагоприятного прогноза [22]. Тем не менее даже при применении интенсифицированных программ лечения наблюдаются случаи резистентного течения заболевания, а приблизительно у 30 % больных развиваются рецидивы.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе частоты и роли экспрессии белков MYC и BCL2 у больных ДВКЛ, сопоставлении результатов генетического, молекулярно-биологического и иммуногистохимического исследований с клиническими данными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 62 больных ДВКЛ (35 мужчин и 27 женщин), получавших лечение в ФГБУ ГНЦ с 2001 по 2014 г. по оригинальному модифицированному протоколу m-NHL-BFM-90 ± R. Единственным критерием включения был морфологически и иммуногистохимически подтвержденный диагноз ДВКЛ, установленный в соответствии с классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2008 г [1]. Протокол m-NHL-BFM-90 ± R состоял из курсов A-B-A-B (4 или 6), или A-B-C-A-B-C, или A-C-A-C с либо без ритуксимаба (R).

Блок А:
- метотрексат — 1500 мг/м² в/в 12-часовая инфузия в 1-й день;
- винкристин — 2 мг в/в струйно в 1-й день;
- доксорубицин — 25 мг/м² в/в капельно в 1-й и 2-й дни;
- этопозид — 100 мг/м² в/в капельно в 3–5-й день;
- цитарабин — 150 мг/м² в/в 3-часовая инфузия 2 раза в сутки в 4-й и 5-й дни;
- ифосфамид — 800 мг/м² в/в капельно в 1–5-й день;
- дексаметазон — 20 мг в/в капельно в 1–5-й день.

Блок В:
- метотрексат — 1500 мг/м² в/в 12-часовая инфузия в 1-й день;
- винкристин — 2 мг в/в струйно в 1-й день;
- доксорубицин — 25 мг/м² в/в капельно в 4-й и 5-й дни;
- циклофосфамид — 200 мг/м² в/в капельно в 1–5-й день;
- дексаметазон — 20 мг в/в капельно в 1–5-й день.

Блок С:
- метотрексат — 1500 мг/м² в/в 12-часовая инфузия в 1-й день;
- винбластин — 10 мг в/в струйно в 1-й день;;
- цитарабин — 2000 мг/м² в/в 3-часовая инфузия 2 раза в сутки во 2-й и 3-й дни;
- этопозид — 150 мг/м² в/в капельно в 3–5-й день;
- дексаметазон — 20 мг в/в капельно в 1–5-й день.

Интервал между курсами — 21 день.

В 1-й день каждого курса химиотерапии проводилась профилактика нейролейкоза путем интратекального введения 15 мг метотрексата, 4 мг дексаметазона, 30 мг цитарабина.

Выбор схемы и количество курсов зависели от возраста, соматического статуса пациента, наличия факторов неблагоприятного прогноза, противоопухолевого ответа.

Высокодозная химиотерапия (ВДХТ) — BEAM с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) — выполнена 5 больным. Медиана возраста больных составила 48,5 года (от 15 до 73 лет). Согласно оценке соматического статуса по шкале ECOG, 9 пациентов имели 1 балл, 25 — 2 балла, 25 — 3 балла и 3 — 4 балла соответственно. Распределение по стадиям в соответствии с классификацией Ann Arbor: I стадия (n = 5), II стадия (n = 10), III стадия (n = 6), IV стадия (n = 41). У 23 пациентов выявлено поражение более 1 экстранодальной области. Вовлечение костного мозга наблюдалось у 12 больных. Нейролейкоз в дебюте заболевания имел место в 3 случаях. У 23 пациентов заболевание манифестировало с В-симптомов. Повышение активности

сывороточной лактатдегидрогеназы (ЛДГ) отмечено в 55 случаях. Распределение больных по группам риска в соответствии с критериями международного прогностического индекса (IPI): низкий (n = 8), промежуточный низкий (n = 6), промежуточный высокий (n = 14), высокий (n = 34). Группу сравнения составили 13 больных (5 мужчин и 8 женщин) с диагнозом ДВКЛ, которые получали лечение в ФГБУ ГНЦ по CHOP-подобным программам ± R. Медиана возраста составила 69 лет (от 42 до 91 года). Согласно оценке соматического статуса по шкале ECOG, 10 больных имели 3 балла, 1 — 1 балл, 2 — 2 балла соответственно. В соответствии с классификацией Ann Arbor у 2 больных установлена I стадия распространения опухолевого процесса, у 2 — II стадия, у 1 — III стадия и у 8 — IV стадия. У 7 больных выявлено поражение более 1 экстранодальной области. Вовлечение костного мозга наблюдалось у 4 больных. В 6 случаях заболевание манифестировало с В-симптомов. Повышение уровня ЛДГ до начала лечения отмечалось в 8 наблюдениях. Согласно критериям IPI, 2 пациента отнесены к группе низкого риска, 1 — промежуточного низкого, 3 — промежуточного высокого, 7 — высокого риска. Сравнительная характеристика больных представлена в табл. 1.

Ритуксимаб в исследуемой группе применен у 12 (19 %) больных, в группе сравнения — у 7 (58 %). ВДХТ с аутоТГСК выполнена 5 больным исследуемой группы (3 — MYC−/BCL2+, 2 — MYC+/BCL2+).

Гистологическое и иммуногистохимическое исследования проводились на архивном материале фрагмента опухоли или лимфатического узла всем пациентам. Иммуногистохимическое исследование выполняли с использованием

Таблица 1. Клиническая характеристика больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой в исследуемой группе и группе сравнения

Показатель	Исследуемая группа, *n* (%)	Группа сравнения, *n* (%)	*p*
Пол			
Мужчины	35 (56)	5 (38)	0,24
Женщины	27 (44)	8 (62)	
Медиана возраста, лет	48,5 (15–73)	69 (42–91)	0,0001
Статус по ECOG			
1 балл	9 (15)	1 (8)	0,11
2 балла	25 (40)	2 (15)	
3 балла	25 (40)	10 (77)	
4 балла	3 (5)	0 (0)	
Поражение более 1 экстранодальной области	38 (61)	7 (54)	0,61
Поражение костного мозга	12 (19)	4 (31)	0,36
Нейролейкоз	3 (5)	0 (0)	0,42
В-симптомы	23 (47)	6 (60)	0,45
Активность ЛДГ выше нормы	55 (90)	8 (73)	0,1
Стадия по Ann Arbor			
I	5 (8)	2 (15)	0,87
II	10 (16)	2 (15)	
III	6 (10)	1 (8)	
IV	41 (66)	8 (62)	
Прогностический индекс IPI			
Низкий риск	8 (13)	2 (15)	0,99
Промежуточный низкий	6 (10)	2 (15)	
Промежуточный высокий	14 (23)	1 (8)	
Высокий риск	34 (55)	8 (62)	

антител к CD20, CD3, CD10, BCL2, BCL6, MUM1, cyclin D1, Ki-67, MYC (clone Y69, Epitomics). Пороговое значение экспрессии для MYC составляло 40 % опухолевых клеток, для BCL2 — 50 %. Эти пороговые значения были выбраны на основании анализа литературных данных, содержащих подробные клинико-морфологические сопоставления [20]. Медиана индекса пролиферативной активности (Ki-67) равнялась 80 % в исследуемой группе и 90 % — в группе сравнения. На основании алгоритма C.P. Hans [23] диагностирован GCB или non-GCB иммуногистохимический подтип ДВКЛ у больных исследуемой группы.

На диагностическом этапе стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) на материале биопсии лимфатического узла/опухоли выполнено 19 больным исследуемой группы. Кроме того, 52 больным в дополнение к СЦИ выполняли молекулярно-генетическое исследование — флюоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) с ДНК-зондами Vysis LSI MYC Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott Molecular) для выявления перестройки локуса гена *c-MYC*; Vysis LSI BCL2 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott Molecular) для оценки перестройки локуса гена *BCL2*; Vysis LSI IGH/MYC, CEP 8 Tri-color, Dual Fusion Translocation Probe (Abbott Molecular) для определения t(8;14)(q24;q32); Vysis LSI IGH Dual color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott Molecular) для оценки перестройки локуса гена *IGH*; Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (Abbott Molecular) для определения t(14;18)(q32;q21). В 16 случаях исследование проводилось на суспензии клеток, полученной при биопсии опухоли, в 1 — на отпечатке опухолевого лимфатического узла, в 35 — на гистологических срезах с парафинового блока биоптата опухоли.

Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени на парафиновых блоках биоптата опухоли/лимфатического узла с целью определения количества мРНК генов *c-MYC* и *BCL2* выполнена 17 больным исследуемой группы. Для выделения общей РНК использовались реагенты набора RNeasy FFPE Kit (Qiagen, США) согласно инструкции изготовителя. Для получения кДНК применяли реактивы набора RNA-экстракт-1 (ООО «ГеноТехнология», Россия) по инструкции, предложенной разработчиком. Уровень экспрессии генов определяли с использованием плазмид с клонированным геном в качестве положительного контроля. Уровень экспрессии гена «домашнего хозяйства» *ABL* был определен для контроля качества выделенной мРНК и для возможности количественной оценки уровня экспрессии генов *c-MYC* и *BCL2*. Системы праймеров и зондов для оценки уровня экспрессии *c-MYC*, *BCL2* и *ABL* были разработаны на основании данных о геномных последовательностях, опубликованных в онлайн-режиме ресурсом http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Синтез специфических праймеров и зондов был заказан в компании «ДНК-синтез» (Россия).

Для сравнения частотных характеристик оценивался критерий — χ^2. При анализе влияния различных факторов риска на результаты лечения использовался стандартный анализ выживаемости (событийный анализ) (критерий Каплана—Мейера, логранговый тест). Результаты считались достоверными при значении $p < 0,05$. Многофакторный анализ проведен с помощью Кокс-регрессионной модели. Для математической обработки данных использовалась программа SAS 9.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая характеристика исследуемой группы и группы сравнения

Между контрольной группой и группой сравнения не выявлено статистически значимых различий по таким клиническим характеристикам, как пол, соотношение мужчин и женщин, соматический статус. Медиана возраста больных в группе сравнения была статистически значимо выше, составив 69 *vs* 48,5 года в исследуемой группе ($p = 0{,}0001$).

Гистологическое и иммуногистохимическое исследования

Соотношение цитоморфологических вариантов ДВКЛ в исследуемой группе: в 47 (78 %) наблюдениях опухоль представлена популяцией клеток с морфологией центробластов среднего и крупного размера с преобладанием последних; в 10 (17 %) случаях преобладали центробласты среднего размера, в 2 (3 %) — выявлен иммунобластный тип ДВКЛ, в 1 (1,5 %) — опухоль образована клетками с морфологией центробластов с многодольчатыми ядрами. В 2 наблюдениях размер клеток достоверно оценить не удалось в связи с плохим качеством парафинового блока.

Иммуногистохимическая характеристика материала биопсии у больных исследуемой группы и группы сравнения представлена в табл. 2.

Экспрессия MYC выявлена у 24 (39 %) из 62 больных ДВКЛ, BCL2 — у 36 (58 %) (пороговые значения 40 и 50 % опухолевых клеток соответственно). Коэкспрессия MYC/BCL2 выявлена у 15 (24 %) из 62 больных ДВКЛ исследуемой группы. Соотношение GCB/non-GCB-подтипов в исследуемой группе составило 24 (39 %)/38 (61 %). В исследуемой группе и группе сравнения не получено значимых отличий по частоте экспрессии MYC и BCL2, а также коэкспрессии указанных белков. Коэкспрессия MYC/BCL2 встречалась чаще в non-GCB подтипе ДВКЛ 11 (29 %) *vs* 4 (17 %), ($p = 0{,}18$).

Таблица 2. Иммуногистохимическая характеристика опухоли в исследуемой группе и группе сравнения

Показатель	Исследуемая группа ($n = 62$)	Группа сравнения ($n = 13$)	p
MYC ≥ 40 %	24 (39 %)	4 (31 %)	0,59
BCL2 ≥ 50 %	36 (58 %)	10 (77 %)	0,20
MYC+/BCL2–	9 (14,5 %)	0 (0)	0,46
MYC–/BCL2–	17 (27 %)	3 (23 %)	
MYC–/BCL2+	21 (34 %)	6 (46 %)	
MYC+/BCL2+	15 (24 %)	4 (31 %)	

Сопоставление данных стандартного цитогенетического исследования с экспрессией белков MYC и BCL2

По результатам СЦИ у 19 больных выявлены комплексные нарушения кариотипа (табл. 3): дополнительная хромосома 8 обнаружена в 2 случаях; изохромосома 8 — в 1, что сопровождалось появлением дополнительных сигналов от гена *c-MYC* [8q24] по

Таблица 3. Сопоставление результатов стандартного цитогенетического исследования с параметрами экспрессии белков MYC и BCL2

Клиническое наблюдение	Ф.И.О. больного	Результаты стандартного цитогенетического исследования	ИГХ MYC ≥ 40 %	ИГХ BCL2 ≥ 50 %
1	А.Н.Н.	46–47, XY, t(1;3)(p32;p21), del(2)(p10), +3, add(5)(q35), der(8)t(8;15)(q10;q10), add(13)(q34), –16, –17, i(17)(q10), +19, +mar1, +mar2, +mar3[cp8]	–	–
2	В.А.Г.	45,X, –Y, t(10;15)(q24;q25)?, dup(12)(q13q23)[16]/46,XY[4]	–	+
3	Г.В.А.	46,X, –Y, der(1)t(1;?), der(1)t(1;?)(p21;?), –2, der(2)?, der(6), del(6), del(6)(q14), i(8)(q10), der(12)t(?;12)(?;p12), +mar[20]	+	+
4	З.Н.А.	48,XX, +X, add(2)(p23or24), +der(6?), t(8;12)(p10;p10), der(18)t(18;?)(q21–22;?), +mar1, +mar2[cp11]/46,XX[9]	–	+
5	К.К.А.	83,XX, –Y, –Y, i(1)(q10), t(2;2)(p21;q36), –2, add(3)(q26)x4, –4, –4, add(5)(q34–35), del(6)(q22–23), –6, add(7)(q35–36), der(8)t(8;14)(q10;q10), t(9;12)(q21;q24), t(9;12)(q21;q24), –10, –10, –12, –14, –16, +add(17)(p13), –18, der(19)add(p13), +der(20), –21, +mar[cp16]/46,XY[4]	–	+
6	М.Г.С.	50,XY, +2, +5, t(8;14)(q24;q32), +18, +mar[cp20]	+	+
7	Н.И.Н.	48,XY, der(3)t(3;12)(p25;q11)?, del(5)(q21), add(9)(p23), +11, der(12)t(2;12)(q36;q11)?, der(14)t(11;14)(q11;q24), add(17)(q25)[14]/47,XXY, idem, –5[2]/47,XXY, idem, der(5), add(14p)[2]	+	–
8	П.А.А.	46,XX, del(11)(q23), del(11)(q23)[6]	–	–
9	П.А.О.	48,XX, +X, t(2;11)(q33–37?;q23), t(3;22)(q27;q11), der(6?), der(13?), der(16), +mar[cp11]/46,XX[6]	+	+
10	Р.О.Р.	45–48,XY, del(2)(p21), del(7)(q11?), –8, +14?, –16, –17, –18, +der(11)t(7?;11)(q32;q12), +add(14?)(q22–23), +mar1, +mar2, +mar3[cp8]/46,XY[6]	–	–
11	Р.В.И.	48,der(X)t(X;8)(p26?;q21), –Y, del(2)(p16), –4, del(4)(q24?), del(6)(q15), der(11)t(6;11)(q22;p13?), del(13)(q22),del(16)(q13), +idic(18q), +idic(18q), +mar[18]/46,XY[2]	–	+
12	С.Н.А.	49,XX, +3, del(3)(p21), del(5)(q32–q34), dup(6)(p22p25), add(8)(p10), der(13), i(17)(q10), +19, add(19)(p13), +20, add(21)(p13)[9]/46,XX[7]	+	+
13	С.Т.Л.	45,X, –X, add(6)(p23)[11]/46,X, –X, der(6), +mar[2]/45,X, –X, der(6), add(14)(q32)[2]/46,X, –X, +3, der(6), der(14)[2]/48,X, –X, der(6), der(14), +mar1, +mar2, +mar3[1]/46,XX[2]	–	+
14	С.Л.Д.	48–50,X, –X, dup(1)(q21q25)?, del(2)(p21), add(11)(p15), add(12)(q24), del(7)(p10), der(9), del(9)(q10), der(14)t(14;?), der(16), +19, –20, –20, –22, +marx6[cp4]	–	+
15	Ф.Д.А.	43–48,X, –Y, –1, +3, +del(3)(q21?), +5, +7, ?der(8)t(1:8)(q21–22?;q22–24?), –10, der(11)t(10?;11)(p11?;q12–13?), add(15)(p10), add(16)(q22–24?), del(17)(p10), +18, –21[cp8]/43–48,XY, idem[8]/46,XY[6]	+	+
16	Р.Д.А.	47,XY, +der(3)add(3p q?)[1]/46,XY[19]	–	+
17	Я.С.Н.	48–51, X, –Y, +X, +der(3)(q13), der(5)t(5;?)(q11–13;?), –7,i(9)(p10), +11, +13, +15, +add(18)(18)(q23)[cp20]	+	+
18	Б.Е.А.	45,XX, der(2)t(2;?)(q33;?), add(4)(p?), –8, del(10)(q24), del(11)(q13), –15, del(17)(q12), –19, –20, –21[1]/47,XX, der(2)t(2;?)(q33;?), add(4)(p?), t(7;19)(q11;p12), +8, del(10)(q24), del(11)(q13), –15, del(17)(q12), –19[1]	–	+
19	Р.Т.Ю.	46,X, t(X;11)(q21–22;q23), t(8;14)(q32;q24) [9]	–	+

ИГХ — иммуногистохимическое исследование.

данным FISH-исследования; дериваты хромосомы 8 — в 2; дериваты хромосомы 14 — в 3. У 1 больного обнаружена перестройка гена *c-MYC* — транслокация t(8;14)(q24;q32), дополнительная 18-я хромосома, что сопровождалось экспрессией MYC 90 %.

Результаты FISH-исследования генов c-MYC и BCL2

Как было сказано ранее, перестройка гена *c-MYC* t(8;14)(q24;q32) выявлена у 1 больного, что сопровождалось экспрессией белка MYC 90 %. В остальных случаях перестройки гена *c-MYC* не обнаружено. Перестройка гена *BCL2* не выявлена ни в одном наблюдении. У 11 (21 %) больных обнаружено от 1 до 4 дополнительных сигналов от гена *c-MYC* [8q24], у 17 (40 %) больных выявлено от 1 до 4 дополнительных сигналов от гена *BCL2* [18q21], что может быть связано с амплификацией генов *c-MYC* и *BCL2* или полисомией хромосом 8 и 18.

Сопоставление экспрессии белков MYC и BCL2, определенных методом иммуногистохимического окрашивания и количественной ПЦР

В пересчете на проценты относительно гена *ABL* уровень экспрессии генов у различных больных составлял от 492 до 5408 % (*c-MYC*) и от 87 до 2600 % (*BCL2*). Медиана уровня экспрессии мРНК гена *c-MYC* составила 1748 %. Медиана уровня экспрессии мРНК гена *BCL2* составила 373 %. Мы сопоставили между собой данные об экспрессии мРНК генов с количеством соответствующих белков в клетках, измеренным методом иммуногистохимического окрашивания. Наблюдалась корреляция количества мРНК гена *c-MYC* при возрастании значения экспрессии белка MYC ($R^2 = 0{,}13$; $p = 0{,}08$). У больного с наличием транслокации t(8;14)(q24;q32) уровень мРНК гена *c-MYC* был выше медианного значения (3940 %). Не было выявлено корреляции между уровнем экспрессии мРНК гена *BCL2* и количеством белка BCL2 ($R^2 = -0{,}07$; $p = 0{,}98$).

Клиническая характеристика больных ДВКЛ в группах MYC+/BCL2–, MYC–/BCL2–, MYC–/BCL2+, MYC+/BCL2+

Группы больных MYC+/BCL2–, MYC–/BCL2–, MYC–/BCL2+, MYC+/BCL2+ были сопоставимы по таким клиническим характеристикам, как пол, статус по ECOG, стадия заболевания, поражение более одной экстранодальной области, нейролейкоз в дебюте заболевания, уровень ЛДГ, В-симптомы, показатель IPI. Между группами выявлены статистически значимые различия по поражению костного мозга ($p = 0{,}02$), возрасту больных ($p < 0{,}05$).

Сравнительная характеристика больных в группах MYC+/BCL2–, MYC–/BCL2–, MYC–/BCL2+, MYC+/BCL2+ представлена в табл. 4.

Клиническая характеристика больных с коэкспрессией MYC/BCL2 и без таковой

Группы больных ДВКЛ с или без коэкспрессии MYC/BCL2 не различались по таким клиническим характеристикам, как пол, статус по ECOG, стадия заболевания, поражение костного мозга, нейролейкоз в дебюте заболевания и активность ЛДГ. Поражение более одной экстранодальной области встречалось у 14 (74 %) и 31 (55 %) больного соответственно ($p = 0{,}16$). В-симптомы в группе без коэкспрессии отмечены у 24 (54 %) пациентов *vs* 5 (33 %) в группе с коэкспрессей ($p = 0{,}16$). Сравнительная характеристика пациентов в общей группе и в зависимости от наличия или отсутствия

Таблица 4. Клиническая и иммуногистохимическая характеристика больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой в зависимости от экспрессии MYC и BCL2

Показатель	MYC+/BCL2–	MYC–/BCL2–	MYC–/BCL2+	MYC+/BCL2+	*p*
Число больных (*n* = 75)	9 (100 %)	20 (100 %)	27 (100 %)	19 (100 %)	
Пол					
Мужчины	3 (33 %)	13 (65 %)	14 (52 %)	10 (53 %)	0,46
Женщины	6 (67 %)	7 (35 %)	13 (48 %)	9 (47 %)	
Медиана (диапазон) возраста, лет	37 (24–54)	52 (15–91)	49 (29–83)	61 (25–71)	0,05
Статус по ECOG					
1 балл	3 (33 %)	3 (15 %)	2 (7 %)	2 (10,5 %)	0,19
2 балла	3 (33 %)	9 (45 %)	11 (41 %)	4 (21 %)	
3 балла	2 (22 %)	8 (40 %)	14 (52 %)	11 (57 %)	
4 балла	1 (11 %)	0	0	2 (10,5 %)	
Поражение более 1 экстранодальной области	4 (44 %)	10 (50 %)	17 (63 %)	14 (74 %)	0,34
Поражение костного мозга	0	2 (10 %)	11 (41 %)	3 (16 %)	0,02
Нейролейкоз	1 (11 %)	1 (5 %)	0	1 (5 %)	0,49
В-симптомы	5 (55 %)	9 (53 %)	10 (56 %)	5 (33 %)	0,56
Активность ЛДГ выше нормы	9 (100 %)	16 (84 %)	22 (88 %)	16 (84 %)	0,64
Стадия по Ann Arbor					
I	1 (11 %)	2 (10 %)	2 (7 %)	2 (10,5 %)	0,80
II	2 (22 %)	5 (25 %)	2 (7 %)	3 (16 %)	
III	1 (11 %)	3 (15 %)	2 (7 %)	1 (5 %)	
IV	5 (55 %)	10 (50 %)	21 (78 %)	13 (68 %)	
Прогностический индекс IPI					
Низкий риск	1 (11 %)	3 (15 %)	2 (7 %)	4 (21 %)	0,16
Промежуточный низкий	2 (22 %)	2 (10 %)	2 (7 %)	1 (5 %)	
Промежуточный высокий	3 (33 %)	8 (40 %)	5 (19 %)	1 (5 %)	
Высокий риск	3 (33 %)	7 (35 %)	18 (67 %)	13 (68 %)	
Ki-67 ≥ 90 %	4/8 (50 %)	11/18 (55 %)	6/24 (25 %)	5/18 (28 %)	

коэкспрессии MYC/BCL2 представлена в табл. 5. Обе группы были сопоставимы по показателю IPI. Выявлены статистически значимые различия по возрасту у больных с коэкспрессией MYC/BCL2 (медиана возраста составила 61 *vs* 48 лет в группе без коэкспрессии; $p < 0,05$).

Результаты терапии

Рецидивы ДВКЛ в исследуемой группе развились у 9 (15 %) больных, в группе сравнения — у 5 (39 %) ($p = 0,13$); прогрессирование заболевания — у 7 (11 %) и 4 (30 %) больных в исследуемой и в группе сравнения соответственно ($p = 0,07$). Сохраняется ремиссия заболевания у 45 (73 %) и 5 (39 %) пациентов исследуемой и группы сравнения соответственно ($p = 0,01$). От прогрессирования заболевания умерло 5 (33 %) больных с коэкспрессией MYC/BCL2. Летальность в исследуемой группе от осложнений полихимиотерапии составила 8 % ($n = 5$). Остаются под наблюдением во второй ремиссии 4 (27 %) пациента после терапии второй линии (в 1 случае выполнена ВДХТ с аутоТГСК).

В группе больных, получавших лечение по схеме R ± CHOP-21, 4-летняя ОВ была статистически значимо ниже, чем у пациентов, получавших лечение по протоколу m-NHL-BFM-90 ± R (37 *vs* 67 %; $p = 0,0335$). Вероятность развития рецидивов/прогрессирования в группе R ± CHOP-21 была статистически значимо выше, чем в группе m-NHL-BFM-90 ± R (79 *vs* 38 %; $p = 0,0086$). В зависимости от добавления ритуксимаба к схеме m-NHL-BFM-90 статистически значимых различий по ОВ и вероятности рецидивов или прогрессирования заболевания у больных ДВКЛ не выявлено ($p = 0,87$ и $p = 0,99$ соответственно). В зависимости от экспрессии MYC и BCL2 показатели 4-летней ОВ в исследуемой группе распределились следующим образом: MYC+/BCL2− — 100 %, MYC−/BCL2− — 78 %, MYC+/BCL2+ — 57 %, MYC−/BCL2+ — 53 % ($p = 0,0861$). Вероятность развития рецидивов/прогрессирования ДВКЛ составила 65 % при MYC+/BCL2+, 26 % при MYC−/BCL2+, 14 % при MYC+/BCL2−, 14 % при MYC−/BCL2− ($p = 0,0238$). В группе пациентов без коэкспрессии MYC и BCL2 4-летняя ОВ составила 71 *vs* 57 % в группе с коэкспрессией MYC/BCL2 ($p = 0,39$) (рис. 1). Вероятность развития рецидивов/прогрессирования в группе больных с коэкспрессией MYC/BCL2 была статистически значимо выше, чем в группе без коэкспрессии MYC и BCL2 (65 *vs* 15 %; $p = 0,0029$) (рис. 2).

Таблица 5. Сравнительная характеристика групп с и без коэкспрессии MYC/BCL2

Показатель	С коэкспрессией, *n* (%)	Без коэкспрессии, *n* (%)	ОШ (95% ДИ)	*p*
Число больных (*n* = 75)	19 (100)	56 (100)		
Пол				
Мужчины	10 (53)	30 (54)	1,04 (0,37–2,95)	0,94
Женщины	9 (47)	26 (46)		
Медиана возраста, лет	61	48		< 0,05
Статус по ECOG				
1 балл	2 (11)	8 (14)		0,16
2 балла	4 (21)	23 (41)		
3 балла	11 (58)	24 (43)		
4 балла	2 (11)	1 (2)		
Поражение более 1 экстранодальной области	14 (74)	31 (55)	2,26 (0,72–7,13)	0,16
Поражение костного мозга	3 (16)	13 (23)	0,62 (0,16–2,47)	0,5
Нейролейкоз	1 (5)	2 (4)	1,5 (0,12–17,54)	0,75
B-симптомы	5 (26)	24 (52)	0,42 (0,12–1,42)	0,16
Активность ЛДГ выше нормы	16 (84)	47 (85)	0,68 (0,15–3,04)	0,6
Стадия по Ann Arbor				
I	2 (11)	4 (7)		0,91
II	3 (16)	7 (13)		
III	1 (5)	6 (11)		
IV	13 (68)	30 (54)		
Прогностический индекс IPI				
Низкий риск	4 (21)	6 (11)	0,74 (0,19–2,84)	0,66
Промежуточный низкий	1 (5)	6 (11)		
Промежуточный высокий	1 (5)	16 (28)		
Высокий риск	13 (68)	28 (50)		

95% ДИ — 95%-й доверительный интервал; ОШ — отношение шансов.

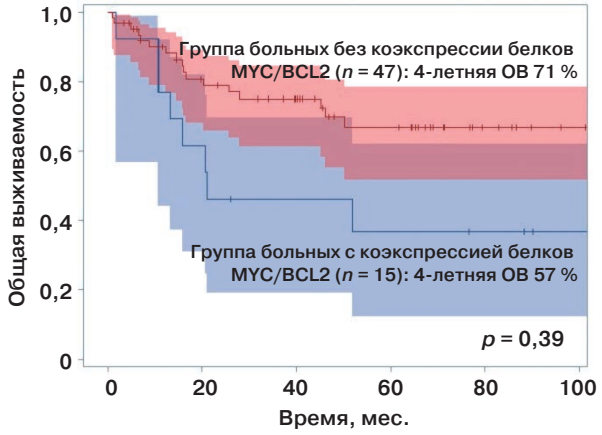

Рис. 1. Общая выживаемость больных, получавших лечение по программе m-NHL-BFM-90 ± R, в группах с наличием и отсутствием коэкспрессии белков MYC/BCL2

Fig. 1. Overall survival of patients treated according to the m-NHL-BFM-90 ± R regimen in groups with and without co-expression of MYC/BCL2 proteins

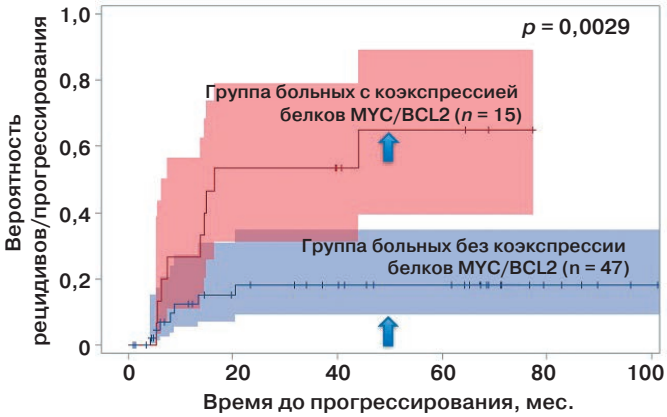

Рис. 2. Вероятность развития рецидивов/прогрессирования ДВКЛ у больных, получавших лечение по программе m-NHL-BFM-90 ± R, в группах с наличием и отсутствием коэкспрессии белков MYC/BCL2. Стрелкой отмечен 4-й год наблюдения

Fig. 2. Probability of relapses/progression of DLBCL in patients treated according to the m-NHL-BFM-90 ± R regimen in groups with and without co-expression of MYC/BCL2 proteins. The arrow points to the 4th observation year

Вероятность развития рецидивов/прогрессирования ДВКЛ в течение 4 лет в группе сравнения была значительно выше, чем в исследуемой группе (70 *vs* 31 %; $p = 0{,}0038$). Вероятность рецидивов/прогрессирования заболевания в группе сравнения была выше у больных ДВКЛ с коэкспрессией MYC/BCL2 – 75 *vs* 67 % в группе больных без коэкспрессии ($p = 0{,}6945$).

Многофакторный анализ вероятности развития рецидива/прогрессирования ДВКЛ проведен с учетом следующих параметров: возраст, соматический статус по шкале ECOG, стадия заболевания по Ann Arbor, поражение более одного экстранодального очага, поражение костного мозга, нейролейкоз, МПИ, добавление к терапии ритуксимаба, аутоТГСК, принадлежность к GCB/non-GCB иммуногистохимическому подтипу, наличие экспрессии одного из белков MYC или BCL2, коэкспрессии MYC/BCL2. В результате пошаговой селекции отобраны следующие параметры, прогностическая значимость которых была проанализирована в отношении вероятности развития рецидива/прогрессирования ДВКЛ у больных, прошедших лечение по протоколу m-NHL-BFM-90 ± R: коэкспрессия MYC/BCL2, IPI, принадлежность к определенному иммуногистохимическому подтипу (GCB/non-GCB). Коэкспрессия MYC/BCL2 являлась независимым прогностически значимым фактором риска развития рецидива/прогрессирования ДВКЛ у больных, получивших лечение по протоколу m-NHL-BFM-90 ± R (отношение рисков (ОР) 4,717; $p = 0{,}0024$), при учете IPI (ОР 6,496; $p = 0{,}0719$) и иммуногистохимического подтипа ($p = 0{,}18$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о частоте ДВКЛ с коэкспрессией MYC/BCL2 соответствуют результатам, полученным другими исследовательскими группами (15–21 % в зависимости от пороговых значений для MYC и BCL2). Так, доля больных с коэкспрессией обоих белков составила 24 % в исследуемой группе. Статистически значимых различий по частоте ДВКЛ с коэкспрессией MYC/BCL2 между исследуемой группой больных и группой сравнения не выявлено.

Полученные результаты по экспрессии белков MYC и BCL2 при наличии различных аномалий кодирующих их генов не противоречат данным литературы.

В большинстве случаев при наличии t(8;14)(q32;q24), приводящей к встраиванию гена *c-MYC* в область энхансера генов тяжелой цепи иммуноглобулина, происходит повышение уровня экспрессии мРНК *c-MYC* в опухолевых клетках. Таким образом, повышение мРНК *c-MYC* коррелирует с высоким процентным соотношением (≥ 74–90 %) опухолевых клеток, экспрессирующих белок MYC в биоптате [20, 21, 24]. В то же время J.R. Cook и соавт. опубликовали данные, показывающие, что приблизительно в 50 % случаев ДВКЛ, сопровождавшихся перестройкой *c-MYC*, гиперэкспрессия белка MYC наблюдалась менее чем в 40 % опухолевых клеток [25]. В проведенном нами исследовании в одном случае выявлена транслокация t(8;14)(q32;q24), что сопровождалось экспрессией белка MYC 90 %.

При других аномалиях, например увеличении количества копий гена *c-MYC* (до 4 аллелей), как сообщают A. Valera и соавт., не происходит повышения общего уровня экспрессии мРНК *c-MYC*, и уровень экспрессии MYC в биоптате опухоли не превышает порогового значения (40 %) соответственно [21]. При увеличении количества копий *c-MYC* > 4 в ряде случаев наблюдается экспрессия белка MYC > 40 % опухолевых клеток.

В настоящем исследовании с целью оценки корреляции полученных нами результатов FISH-исследования генов *c-MYC* и *BCL2* с уровнем экспрессии соответствующих белков необходимо провести FISH-исследование центромерных регионов хромосом 8 и 18. Зарубежные авторы использовали для определения количества копий соответствующего гена метод сравнительной геномной гибридизации. Амплификация гена *c-MYC* еще не подразумевает начала его неконтролируемой экспрессии. Если белок MYC действительно контролирует работу около $^1/_{10}$ генома, то в клетке должно находиться множество систем для регуляции функций самого MYC. Как на уровне мРНК, так и на белковом уровне MYC обладает огромным количеством кофакторов, в роли которых выступают другие белки и микроРНК [11, 26, 27]. Допустимо, что амплификация гена *c-MYC* приводит к кратному увеличению уровня экспрессии мРНК и белка. При этом внутриклеточные системы контроля отвечают очень быстро и способны понизить уровень экспрессии до нормального. Даже если при амплификации промотор гена *c-MYC* поврежден, микроРНК инактивируют избыточную мРНК, в результате количество белка не переходит порогового значения. С другой стороны, если при амплификации *c-MYC* формируется большое количество конечного продукта (гиперэкспрессия белка), то можно предположить, что в клетках ДВКЛ произошли дополнительные генетические аномалии, нарушившие работу факторов-антагонистов белка MYC. При нарушенной функции этих факторов ничто не будет препятствовать гиперэкспрессии *c-MYC* и успешной трансляции его мРНК. Это подтверждается тем, что мы экспериментально установили прямую связь между количеством мРНК *c-MYC* и содержанием белка в опухолевых клетках.

Другой объект — это белок BCL2. Ген *BCL2* в отличие от *c-MYC* обладает специфической функцией, и для контроля его экспрессии в процессе эволюции не возникло сложной системы. Считается, что наличия только одной перестройки t(14;18)(q32;q21) совершенно не достаточно для развития лимфомы [28]. По всей вероятности, механизма целенаправленной деградации мРНК *BCL2* не существует, и нет препятствий для синтеза белка. Таким образом, практически любые поломки, приводящие к усилению активности гена *BCL2* либо ставящие его под контроль более сильного энхансера гена *IgH*, будут реализованы в виде наработки значительного количества функционально активного белка BCL2. Можно заметить, что результаты измерения количества мРНК *BCL2* в настоящем исследовании не коррелировали с количеством белка BCL2. Для объяснения этого вновь можно обратиться к биологической роли белков BCL2 и MYC. Как было показано, контроль экспрессии гена *BCL2* не затрагивает его мРНК (точнее, экспрессия этого гена контролируется только на уровне хроматина), поскольку его значение в поддержании жизни клетки не первостепенно. С другой стороны, широкая регуляторная сеть, в которую интегрирован фактор MYC, требует наличия сложных систем контроля его функций. В результате клетка всегда имеет множество микроРНК, которые комплементарны мРНК *c-MYC*, но в ней нет сопоставимого количества микроРНК, ассоциированных с мРНК *BCL2* [29].

Результаты определения количества мРНК подчеркнули преимущества иммуногистохимической оценки параметров экспрессии белков BCL2 и MYC ввиду их прогностического значения при ДВКЛ [30]. Более того, именно посредством белка реализуется эффекторная функция гена. Ниже будет описано клиническое значение экспрессии белков MYC и BCL2.

Интересным представляется тот факт, что медиана возраста в группе больных с коэкспрессией MYC/BCL2 была статистически значимо выше, чем в группе без коэкспрессии MYC/BCL2 (61 *vs* 48 лет). Как известно, с возрастом в популяции возрастает частота мутаций, в т. ч. перестройка гена *BCL2* [31]. Кроме транслокаций, экспрессию гена регулируют другие механизмы, в т. ч. альтернативный сплайсинг мРНК *BCL2* [32]. В нашем исследовании перестройка указанного выше гена не выявлена ни у одного пациента с коэкспрессией MYC/BCL2, в то время как перестройка *c-MYC* обнаружена в 1 случае с коэкспрессией MYC/BCL2. Из 9 больных с коэкспрессией MYC/BCL2, у которых развились рецидивы/прогрессирование заболевания, трое были моложе 60 лет.

K. Dunleavy в докладе на конференции Американской гематологической ассоциации в 2013 г. сообщил о том, что при интенсификации режимов терапии, т. е. при проведении не R-CHOP-21, а R-(DA)-EPOCH, наличие перестройки гена *c-MYC* не имеет прогностического значения [33], так же как и наличие коэкспрессии MYC/BCL2 (пороговое значение для MYC ≥ 40 % опухолевых клеток, для BCL2 внутренним контролем служили Т-клетки). Согласно данным автора, прогностически значимой при ДВКЛ является принадлежность к определенному иммуногистохимическому подтипу (GCB *vs* non-GCB), а случаи с коэкспрессией MYC/BCL2 были статистически значимо связаны с non-GCB-подтипом. В настоящем исследовании распределение больных в группе с коэкспрессией MYC/BCL2 по иммуногистохимическим подтипам GCB *vs* non-GCB было 27 *vs* 73 % соответственно ($p < 0{,}02$). ОВ пациентов с коэкспрессией MYC/BCL2 статистически значимо не отличалась от ОВ больных без коэкспрессии MYC/BCL2 при лечении по протоколу m-NHL-BFM-90 ± R. Тем не менее вероятность развития рецидивов или прогрессирования у пациентов в группе с коэкспрессией MYC/BCL2 была статистически значимо выше, чем у больных без коэкспрессии, что согласуется с предыдущими исследованиями ($p = 0{,}0029$) [19–22]. Возможно, мы не получили значимых отличий между группами с коэкспрессией MYC/BCL2 и без таковой (обобщенная группа с тремя вариантными характеристиками экспрессии белков MYC, BCL2), получавших лечение по схеме CHOP-21 ± R, т. к. пациенты группы сравнения в большинстве своем (62 %) характеризовались высоким риском и частота неблагоприятных событий, связанных с течением ДВКЛ, была практически одинаково высокой в обеих группах.

Таким образом, коэкспрессия MYC/BCL2 повышает риск неблагоприятного события (рецидива или прогрессирования) в группе больных ДВКЛ при применении режима терапии m-NHL-BFM-90 ± R. Вероятно, ОВ пациентов с коэкспрессией MYC/BCL2 статистически значимо не отличается от ОВ пациентов без коэкспрессии указанных выше белков в связи с тем, что терапия второй линии оказалась эффективной и в ряде случаев у больных достигнута вторая ремиссия заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Коэкспрессия MYC/BCL2 встречается чаще при non-GCB иммуногистохимическом подтипе ДВКЛ.

2. Коэкспрессия белков MYC/BCL2 является независимым фактором риска развития рецидива/прогрессирования ДВКЛ у взрослых больных, получающих химиотерапию по интенсивному протоколу m-NHL-BFM-90 ± R ($p = 0{,}003$). Экспрессия одного из белков (MYC или BCL2) выше пороговых значений не оказывает статистически значимого влияния на вероятность развития рецидивов/прогрессирования у больных ДВКЛ, получающих химиотерапию по протоколу m-NHL-BFM-90 ± R. Экспрессия белка MYC выше порогового значения не ухудшает результаты ОВ у больных ДВКЛ, получающих химиотерапию по протоколу m-NHL-BFM-90 ± R.

3. Определение экспрессии белков MYC и BCL2 иммуногистохимическим методом обосновано для включения в диагностический алгоритм обследования больных ДВКЛ в целях стратификации на группы риска развития рецидива/прогрессирования заболевания.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ.

Финансовая помощь на проведение молекулярно-биологических исследований оказана при участии Юлии Денисовой и Николая Денисова (лаборатория «Диалаб») и благотворительного фонда «Гематология и интенсивная терапия».

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: А.Е. Мисюрина, Е.А. Барях, А.М. Ковригина, С.К. Кравченко.
Сбор и обработка данных: А.Е. Мисюрина, В.А. Мисюрин.
Предоставление материалов исследования: А.В. Мисюрин, А.Н. Копылов, А.У. Магомедова.
Анализ и интерпретация данных: Э.Г. Гемджян, С.Н. Куликов, А.Е. Мисюрина.
Подготовка рукописи: А.Е. Мисюрина, В.А. Мисюрин.
Окончательное одобрение рукописи: А.М. Ковригина, Е.А. Барях, Т.Н. Обухова, С.К. Кравченко, В.А. Мисюрин.
Административная поддержка: А.И. Воробьев, С.К. Кравченко.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al.* (editors) WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2008.

2. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. N. Engl. J. Med. 1993; 329(14): 987–94.

3. *Frick M., Dorken B., Lenz G.* New insights into the biology of molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2012; 25(1): 3–12.

4. *Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E. et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling.Nature.2000; 403: 503–11.

5. *Rosenwald A., Wright G., Chan W.C. et al.* The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N. Engl. J. Med. 2002; 346(25): 1937–47.

6. *Shipp M.A., Ross K.N., Tamayo P. et al.* Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. Nat. Med. 2002; 8: 68–74.

7. *Lenz G., Wright G., Dave S.S. et al*. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. N. Engl. J. Med. 2008; 359(22): 2313–23.

8. *Rosenwald A., Wright G., Leroy K. et al*. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. J. Exp. Med. 2003; 198(6): 851–62.

9. *Savage K.J., Monti S., Kutok J.L. et al*. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2003; 102(12): 3871–9.

10. *Wright G., Tan B., Rosenwald A. et al*. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100: 9991–6.

11. *Мисюрина А.Е., Мисюрин В.А., Барях Е.А. и др*. Роль экспрессии c-MYC, BCL-2, BCL-6 в патогенезе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Клиническая онкогематология. 2014; 7(4): 512–21.

[Misyurina A.E., Misyurin V.A., Baryakh E.A. et al. Role of c-MYC, BCL-2, and BCL-6 expression in pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2014; 7(4): 512–21. (In Russ.)]

12. *Savage K.J., Johnson N.A., Ben-Neriah S. et al*. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. Blood. 2009; 114(17): 3533–7.

13. *Horn H., Ziepert M., Becher C. et al*. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2013; 121(12): 2253–63.

14. *Barrans S., Crouch S., Smith A. et al*. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. J. Clin. Oncol. 2010; 28(20): 3360–5.

15. *Iqbal J., Sanger W.G., Horsman D.E. et al*. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. Am. J. Pathol. 2004; 165(1): 159–66.

16. *Ohno H., Fukuhara S*. Significance of rearrangement of the BCL6gene in B-cell lymphoid neoplasms. Leuk.Lymphoma.1997; 27: 53–63.

17. *Willis T.G., Dyer M.J*. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies.Blood.2000; 96: 808–22.

18. *Hu S., Xu-Monette Z.Y., Tzankov A. et al*. MYC/BCL2 protein co-expression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. Blood. 2013; 121(20): 4021–31.

19. *Green T.M., Young K.H., Visco C. et al*. Immunohistochemical Double-Hit Score Is a Strong Predictor of Outcome in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. J. Clin. Oncol. 2012; 30(28): 3460–7.

20. *Johnson N.A., Slack G.W., Savage K. et al*. Concurrent Expression of MYC and BCL2 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. J. Clin. Oncol. 2012; 30(28): 3452–9.

21. *Valera A., Lopez-Guillermo A., Cardesa-Salzmann T*. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. Haematologica. 2013; 98(10): 1554–62.

22. *Магомедова А.У., КравченкоС.К., КременецкаяА.М. и др*. Модифицированная программа NHL-BFM-90 в лечении больных диффузной В-крупноклеточной лимфосаркомой. Терапевтический архив. 2006; 10: 44–7.

[Magomedova A.U., Kravchenko S.K., Kremenetskaya A.M. et al. Modified NHL-BFM-90 protocol in treatment of diffuse large B-cell lymphosarcoma. *Terapevticheskiiarkhiv*.2006; 10: 44–7.(In Russ.)]

23. *Hans C.P., Weisenburger D.D., Greiner T.C., Gascoyne R.D*. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray.Blood. 2004; 103(1): 275–82.

24. *Green T.M., Nielsen O., de Stricker K. et al*. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. Am. J. Surg. Pathol. 2012; 36: 612–9.

25. *Cook J.R., Goldman B., Tubbs R.R*. Clinical significance of MYC expression and/or «high-grade» morphology in non-Burkitt, diffuse aggressive B-cell lymphomas: a SWOG S9704 correlative study. Am. J. Surg. Pathol. 2014; 38(4): 494–501.

26. *Leucci E., Cocco M., Onnis A. et al*. MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. J. Pathol. 2008; 216(4): 440–50.

27. *Onnis A., De Falco G., Antonicelli G. et al*. Alteration of microRNAs regulated by c-MYC in Burkitt lymphoma. PLoS One.2010; 5(9); e12960.

28. *Kluin P.M*. Origin And Migration of Follicular Lymphoma Cells. Haematologica.2013; 98: 1331–3.

29. *Ameres S.L., Zamore P.D*. Diversifying microRNA sequence and function. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2013; 14(8): 475–88.

30. *Мангасарова Я.К., Мисюрин А.В., Магомедова А.У. и др*. Молекулярная диагностика первичной медиастинальной В-клеточной лимфомы и диффузной В-крупноклеточной лимфомы с первичным вовлечением лимфоузлов средостения. Клиническая онкогематология. 2011; 4(2): 142–5.

[Mangasarova Ya.K., Misyurin A.V., Magomedova A.U. et al. Molecular diagnostics of primary mediastinal B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with primary involvement of mediastinal lymph nodes. *Klinicheskaya onkogematologiya*.2011; 4(2): 142–5. (In Russ.)]

31. *Liu Y., Hernandez A.M., Shibata D., Cortopassi G.A*. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91(19): 8910–4.

32. *Harries L.W., Hernandez D., Henley W*. Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. Aging Cell. 2011; 10(5): 868–78.

33. *Dunleavy K., Pittaluga S., Shovlin M*. Concurrent Expression Of MYC/BCL2 Protein In Newly Diagnosed DLBCL Is Not Associated With An Inferior Survival Following EPOCH-R Therapy. Blood. 2013; 122(21): 3029.