

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Влияние мутационного статуса IGHV-генов и стереотипности строения BCR на эффективность режима BR в первой линии терапии хронического лимфолейкоза

Effect of IGHV Gene Mutation Status and BCR Structure Stereotypy on Effectiveness of BR Regimen in First-Line Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia

В.В. Стругов¹, Е.А. Стадник^{1,2}, А.М. Румянцев¹, Т.О. Андреева¹, Ю.В. Вириц¹, Ю.В. Миролюбова¹, П.А. Бутылин¹, А.Ю. Зарицкий^{1,2}

VV Strugov¹, EA Stadnik^{1,2}, AM Rumyantsev¹, TO Andreeva¹, YuV Virts¹, YuV Mirolubova¹, PA Butylin¹, AYU Zaritsky^{1,2}

¹ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

¹Federal Almazov North-West Medical Research Centre under the Ministry of Health of the Russian Federation, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

²Клиника факультетской терапии, ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

²Internal Medicine Clinic, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Актуальность и цели. Мутационный статус IGHV-генов является константной биологической характеристикой опухолевых клеток при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ). Данный показатель служит важным предиктором эффективности иммунохимиотерапии. Он включен в разработанный недавно международный прогностический индекс CLL-IPI. Цель — оценить эффективность режима BR у пациентов с различными вариантами строения В-клеточного рецептора (BCR).

Background & Aims. The IGHV gene mutation status is a constant biological feature of tumor cells in chronic lymphocytic leukemia (CLL). This parameter is an important predictor of the efficacy of immunochemotherapy. It was included into the CLL international prognostic index CLL-IPI developed recently. The aim is to evaluate the prognostic significance of the BR regimen in patients with different variants of the B-cell receptor (BCR) structure.

Методы. Анализу подвергнуты непосредственные и отдаленные результаты лечения 183 больных ХЛЛ, включенных в российское проспективное наблюдательное исследование VEN-001 (NCT02110394). Медиана возраста пациентов составила 61 год (диапазон 35–79 лет), 53 (29,6 %) из 179 больных были старше 65 лет и 14 (7,8 %) из 179 — старше 75 лет. Отмечалось преобладание мужчин — 110 (61,5 %) из 179 с соотношением мужчин/женщин 1,6:1,0. Большинство пациентов имели поздние стадии заболевания по Binet: В — 116 (67 %) из 173, С — 38 (22 %) из 173. С 2012 по 2015 г. на базе 36 гематологических учреждений РФ пациентам проводилась терапия первой линии по схеме BR в стандартных дозировках. Материалом для анализа мутационного статуса IGHV-генов служила геномная ДНК, выделенная из мононуклеаров периферической крови.

Methods. The study examined immediate and delayed treatment outcomes for 183 CLL patients included in a Russian, prospective, observational BEN-001 trial (NCT02110394). The median age was 61 years (range: 35–79); 53/179 (29.6 %) patients were older than 65; and 14/179 (7.8 %) patients were older than 75. Prevalence of males (110/179, 61.5 %) in the male/female ratio (1.6:1.0) was observed. Most patients had advanced disease: Binet B 116/173 (67 %) or Binet C 38/173 (22 %). The patients received the first-line therapy according to the BR regimen at standard doses in 36 hematological institutions in the Russian Federation over the period from 2012 until 2015. The genome DNA isolated from mononuclear leukocytes in the peripheral blood was used to assess the mutation status of the IGHV-genes.

Результаты. Показано, что немутированный вариант ХЛЛ (≥ 98 % идентичности герминальному гену) сильнее других факторов ассоциируется с ухудшением показателей бессобытийной и общей выживаемости при одинаковой частоте полных и МОБ-отрицательных ремиссий.

Results. The study demonstrated that unmutated CLL (≥ 98 % of homology to germline gene) is associated with worsening of the event-free and overall survival rates most of all; at that, the complete remission rate and the MRD-free survival rate were the same.

Заключение. Целесообразно оценивать мутационный статус IGHV у всех пациентов с ХЛЛ, которым в первой линии терапии назначается режим BR.

Conclusion. It is reasonable to analyze the IGHV mutation status in all patients prescribed with the BR regimen as the first-line therapy.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, ХЛЛ, бендамустин, ритуксимаб, BR, IGHV, мутационный статус, стереотипность.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, CLL, bendamustine, rituximab, BR, IGHV, mutation status, stereotypy.

Получено: 8 января 2017 г.

Принято в печать: 26 января 2017 г.

Received: January 8, 2017

Accepted: January 26, 2017

Для переписки: Владимир Владимирович Стругов, научный сотрудник, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; тел.: +7(812)702-37-49; e-mail: strugov@almazovcentre.ru

For correspondence: Vladimir Vladimirovich Strugov, staff scientist, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; Tel: +7(812)702-37-49; e-mail: strugov@almazovcentre.ru

Для цитирования: Стругов В.В., Стадник Е.А., Румянцев А.М. и др. Влияние мутационного статуса IGHV-генов и стереотипности строения BCR на эффективность режима BR в первой линии терапии хронического лимфолейкоза. Клиническая онкогематология. 2017;10(2):141–9.

For citation: Strugov VV, Stadnik EA, Rumyantsev AM, et al. Effect of IGHV Gene Mutation Status and BCR Structure Stereotypy on Effectiveness of BR Regimen in First-Line Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia. Clinical oncohematology. 2017;10(2):141–9 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-141-149

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-141-149

ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — одно из наиболее распространенных лимфолиферативных заболеваний, патогенез которого тесно связан с естественным старением гемопоэтических стволовых клеток, а также с селекцией определенных структурно-функциональных вариантов строения В-клеточного рецептора (BCR) [1–4]. Для ХЛЛ характерно гетерогенное клиническое течение. В зависимости от биологии опухоли продолжительность жизни после установления диагноза ХЛЛ колеблется от нескольких месяцев до нескольких десятилетий.

Примерно 50 % случаев ХЛЛ характеризуются наличием признаков соматической гипермутации в генах варибельных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGHV). Такие наблюдения формируют группу пациентов с относительно индолентным и химиочувствительным течением заболевания, низкой частотой прогностически неблагоприятных генетических маркеров — хромосомных aberrаций del(17p13), del(11q23) и мутаций генов *NOTCH1*, *TP53*, *BIRC3*. Наличие или отсутствие соматических гипермутаций является одним из параметров международного прогностического индекса CLL-IPI [5].

Известно, что примерно 30 % случаев ХЛЛ можно отнести к одной из стереотипных групп, характеризующихся почти идентичной структурой BCR и определенными клинико-биологическими особенностями. Для ряда стереотипных групп показана повышенная частота аутоиммунных осложнений и трансформации в агрессивную лимфому [6].

Несмотря на значительный прогресс в терапии, ХЛЛ остается неизлечимой злокачественной опухолью. Комбинация бендамустина и ритуксимаба (BR) — один из наиболее часто используемых вариантов терапии ХЛЛ. Режим обладает высокой эффективностью и сравнительно низкой гематологической токсичностью, что делает его широко применяемым у основного контингента больных ХЛЛ — пожилых людей с сопутствующими заболеваниями и снижением функционального статуса [7]. Эффективность режима BR у пациентов с различными вариантами строения BCR изучена недостаточно.

Мы впервые провели детальный проспективный анализ прогностической значимости иммуногенетических особенностей лейкозных клеток у больных ХЛЛ, получавших иммунохимиотерапию по схеме BR в первой линии. Кроме того, было исследовано влияние стереотипности BCR на результаты терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты и терапия

В многоцентровое проспективное наблюдательное исследование VEN-001 Norma было включено 202 пациента с иммуноморфологически верифицированным диагнозом ХЛЛ. Информация об исследовании доступна на сайте clinicaltrials.gov (NCT02110394). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании, одобренное местным и центральным этическими комитетами.

Медиана возраста пациентов, включенных в исследование, составила 61 год (диапазон 35–79 лет). Из 179 больных 53 (29,6 %) были старше 65 лет, 14 (7,8 %) — старше 75 лет. Преобладали мужчины: 110 (61,5 %) из 179, соотношение мужчин/женщин 1,6:1,0. У большинства пациентов имели место поздние стадии заболевания по Binet: В — у 116 (67 %) из 173, С — у 38 (22 %) из 173. Медиана лимфоцитов в крови составила $38,85 \times 10^9/\text{л}$ (диапазон $7\text{--}500 \times 10^9/\text{л}$; $n = 90$). Медиана концентрации $\beta 2$ -микроглобулина в сыворотке составила 3,65 мг/л (диапазон 0,16–15,12 мг/л; $n = 105$). У 39 (36,1 %) из 108 больных отмечалась повышенная экспрессия маркера CD38 ($\geq 30\%$). При анализе путем флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) прогностически неблагоприятные хромосомные аномалии были обнаружены у 71 (47,6 %) из 149 больных: del(17p) — у 9 (6 %) и del(11q) — у 62 (41,6 %).

В период с 2012 по 2015 г. на базе 36 гематологических учреждений РФ больным проводилась терапия первой линии по схеме BR в стандартных дозировках [8]. Медиана времени до начала лечения после установления диагноза ХЛЛ составила 3 мес. (диапазон 0 мес. — 8 лет). Показания для начала лечения и

методология оценки ответа на терапию соответствовали рекомендациям международной рабочей группы iwCLL. Медиана числа курсов составила 6 (диапазон 1–8), т. е. большая часть пациентов получила лечение в полном объеме. Медиана времени наблюдения составила 2 года (диапазон 1–45 мес.).

Лабораторные исследования

Материалом для анализа мутационного статуса IGHV-генов служила геномная ДНК, выделенная из мононуклеаров периферической крови. В отдельных случаях, например при амплификации только непродуктивной реаранжировки, дополнительно исследовалась кДНК. Анализ концентрации и качества полученных образцов ДНК/РНК проводился с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Во всех случаях выполнялась мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с набором из 7 стандартизованных праймеров, представляющих собой праймеры BIOMED-2, модифицированные включением удобной для секвенирования последовательности рJET (табл. 1).

В случаях с пограничной мутационной нагрузкой дополнительно использовались праймеры, комплементарные лидерному участку соответствующего IGHV-гена. Продукт ПЦР подвергался электрофорезу в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием. Клональную полосу размером около 300 пар оснований вырезали из геля и очищали с помощью Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Секвенирование выполнялось на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3130. После выравнивания и компиляции сиквенса его сопоставляли с последовательностью наиболее близкого герминального IGHV-гена с помощью инструмента IMG/VT-QUEST. Оценка стереотипности проводилась вручную на основании критериев, опубликованных А. Agathangelidis и соавт. [9]. Сомнительные случаи обсуждались с референсной лабораторией ERIC.

FISH проводилась с использованием клинически валидированной панели Vysis CLL FISH Probe Kit, содержащей зонды, комплементарные локусам 11q22.3, 17p13.1, 12p11.1-q11, 13q34, 13q13.4. Исследование выполнялось в соответствии с рекомендациями производителя (Abbott Molecular). Для оценки ми-

нимальной остаточной болезни (МОБ) проводилось исследование аспирата костного мозга методом проточной цитометрии. Набор антител и стратегия гейтирования соответствовали международному стандартизованному протоколу [10].

Статистический анализ

Сравнение количественных переменных проводилось с помощью непараметрических критериев Манна—Уитни и Краскала—Уоллиса. Категориальные переменные сравнивались с помощью критерия χ^2 Пирсона. Для построения кривой бессобытийной выживаемости (БСВ) срок жизни больных рассчитывали от начала терапии до констатации рецидива, летального исхода или начала специфической терапии второй линии в зависимости от того, что наступало раньше. Для построения кривой общей выживаемости (ОВ) срок жизни определяли как время от начала терапии до смерти больного или даты последнего контакта с исследователем. Прогностическую значимость различных факторов оценивали с помощью лог-рангового критерия, а также (при условии соблюдения пропорциональности рисков) методом регрессионного анализа по Коксу. При построении многофакторных моделей учитывали только те показатели, значимость которых была выявлена в однофакторном анализе. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения IBM SPSS, версия 22. Все тесты были двусторонними. Уровень статистической значимости был определен как $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Соотношение пациентов с мутированным и немутированным вариантами строения BCR

Анализ мутационного статуса клонального IGHV-гена был результативным у 183 (90,6 %) из 202 пациентов, включенных в исследование. В части случаев препятствием для проведения исследования послужили отсутствие или утрата биологического материала, у других пациентов не удалось выделить и подвергнуть анализу последовательность клонального BCR. Характеристики включенных в анализ 183 пациентов статистически значимо не отличались от общей выборки ($p > 0,05$, U -критерий Манна—Уитни и критерий χ^2 Пирсона).

Стандартный порог 98 % идентичности герминальной последовательности наиболее близкого IGHV-гена разделил пациентов в соотношении приблизительно 2:1 с преобладанием немутированного варианта строения BCR. Последний был генотипирован у 123 (67,2 %) больных (рис. 1, А). Это близко к результату, полученному в германском исследовании CLL8, в котором доля таких пациентов составила 63 % [7].

Хотя порог 98 %, предложенный в классических работах R.N. Damle и соавт. [11] и T.J. Hamblin и соавт. [12] для отсеивания полиморфных вариантов и ошибок полимеразы, безусловно, наиболее клинически валидирован, в биологическом смысле он не позволяет

Таблица 1. Список праймеров к IGHV-генам

Праймер	Нуклеотидная последовательность
VH1/7-FR1	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGCCCTCAGTGAAGGTCTCC TGCAAG-3'
VH2-FR1	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGGCTGTGGTCTACGCTG GTGAAACCC-3'
VH3-FR1	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGGCTGGGGGTCCCTGAG ACTCTCTG-3'
VH4-FR1	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGGCTCGGAGACCCTGTCC CTCACCTG-3'
VH5-FR1	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGGGAGTCTCTGAAGA TCTCTGT-3'
VH6-FR1	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGGCTCGCAGACCCTCTCAC TCACCTGTG-3'
JH cons.	5'-AAGAACATCGATTTTCATGGCAGCTTACCTGAGGAGACG GTGACC-3'

провести разделение истинно мутированных и немутированных случаев. Действительно, даже единичные изменения в IGHV-генах могут свидетельствовать о прохождении клеткой этапа соматической гипермутации. В ряде публикаций показана прогностическая значимость при ХЛЛ ряда менее устоявшихся уровней отсечения (от 0,2 до 5 %) [13, 14].

В настоящей работе дополнительному анализу подвергнуты пациенты в группах «истинно немутированных» (100 % идентичности герминальному гену), «минимально мутированных» (99,0–99,99 % идентичности), «погранично мутированных» (98,0–98,99 %) и «истинно мутированных» (< 98 % идентичности). Преобладающими оказались группы «истинно немутированных» (73 из 183; 39,9 %) и «истинно мутированных» (60 из 183; 32,8 %) больных. В группе «погранично мутированных» было лишь 19 (10,4 %) пациентов (рис. 1, Б).

В одной из недавних работ британские ученые Z. Davis и соавт. предложили собственную прогностическую шкалу, учитывающую мутационную нагрузку (различное число мутаций) IGHV-генов с выделением порогов 97 и 99 % [15]. В соответствии с методологией авторов случаи, относящиеся к стереотипному классу 2, независимо от мутационного статуса попадают в группу неблагоприятного риска. После исключения 11 пациентов, представлявших стереотипную группу № 2, остальные 172 больных распределились следующим образом: 102 (59,3 %) составили группу высокого риска (99–100 % идентичности), 31 (18 %) — промежуточного риска и 39 (22,7) — низкого риска (рис. 1, В).

Частота использования гена IGHV3-21 составила 7,7 % ($n = 14$), что примерно соответствует частоте, выявленной в популяции пациентов из Украины (5,8 %) [16]. В то же время это меньше, чем в скандинавской когорте (11,7 %), и больше, чем в американской (2,6 %) и средиземноморской (2,9 %) популяциях [17, 18]. К стереотипной группе № 2 отнесено 11 (78,6 %) из 14 наблюдений. Примерно в половине IGHV3-21-позитивных случаев (8 из 14; 57 %) последовательность гена имела признаки соматической гипермутации.

Клинико-биологическая характеристика пациентов с различным мутационным статусом

Основные демографические и клинические характеристики в подгруппах мутированного и немутированного ХЛЛ были одинаковые (табл. 2). В то же время в группе мутированного ХЛЛ было несколько больше пациентов со снижением расчетной скорости клубочковой фильтрации менее 70 мл/мин/1,73 м² (62,3 vs 45,3 %; $p = 0,043$), что, вероятнее всего, является случайной особенностью выборки. В соответствии со множеством других работ в группе пациентов с немутированным вариантом было статистически значимо больше больных с высокой экспрессией поверхностного маркера CD38 — 43 vs 20,5 % в группе с мутированным вариантом ХЛЛ ($p = 0,023$, Z-критерий).

Стереотипность строения BCR

Из 183 наблюдений с известным мутационным статусом IGHV-генов признаки стереотипности строения BCR были выявлены у 35 (19,1 %) больных. Меньшая по сравнению с результатами других авторов частота обнаружения стереотипности в нашей работе была прогнозируемой с учетом нелинейной зависимости этого показателя от размера выборки [9]. Необходимо также учитывать, что наша выборка включает исключительно пациентов с активным течением заболевания и является «госпитальной», поэтому частота стереотипности в ней может отличаться от среднестатистической для всех больных ХЛЛ.

Демографические характеристики (возраст и пол), функциональный статус по шкале ECOG, индекс коморбидности по шкале CIRS-G, а также частота нарушения функции почек не различались в подгруппах пациентов с наличием и отсутствием стереотипности BCR ($p > 0,05$, критерий Манна—Уитни и Z-критерий).

Как и в других европейских работах [19], среди различных вариантов стереотипности в исследованной российской выборке преобладали стереотипные группы № 2 ($n = 11$) и 1 ($n = 5$). Относительно часто встречались варианты, принадлежащие к стереотипным группам № 7 ($n = 5$) и 8 ($n = 4$). Кроме того, по 2 пациента были отнесены к стереотипным группам № 3, 9 и 10 и по 1 — к группам № 4, 6, 28, 59 (рис. 2).

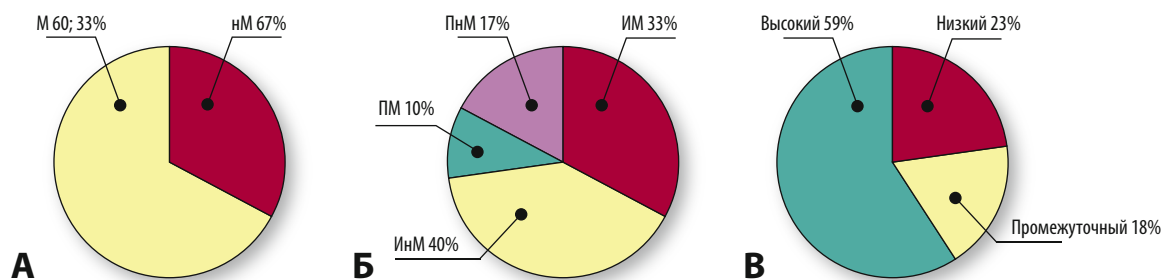


Рис. 1. Распределение пациентов с различным мутационным статусом:

А — по T.J. Hamblin и соавт.; Б — с выделением «погранично мутированных» и «истинно немутированных» групп; В — по Z. Davis и соавт. М — мутированный вариант; нМ — немутированный вариант; ИМ — «истинно мутированная» группа; ИнМ — «истинно немутированная» группа; ПМ — «погранично мутированная» группа; ПнМ — «погранично немутированная» группа.

Fig. 1. Distribution of patients with various mutation statuses:

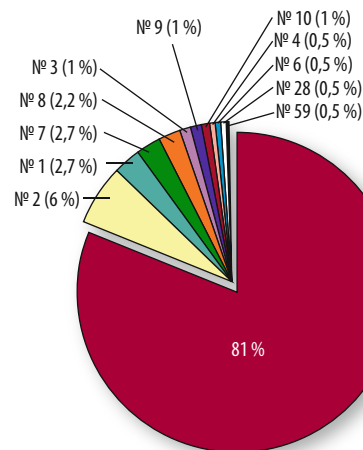
А — according to T.J. Hamblin et al.; Б — with identification of «borderline mutated» and «truly unmutated» groups; В — according to Z. Davis et al. М — mutated; нМ — unmutated; ИМ — truly mutated; ИнМ — truly unmutated; ПМ — borderline mutated; ПнМ — borderline unmutated.

Таблица 2. Характеристики больных ХЛЛ с различным мутационным статусом

Показатель	М-ХЛЛ (n = 60)	нМ-ХЛЛ (n = 123)	p
Медиана (диапазон) возраста, лет	62 (35–76)	59 (39–79)	0,202
≥ 65 лет, n/N (%)	18/53 (34,0)	29/107 (27,1)	0,370
≥ 75 лет, n/N (%)	4/53 (7,5)	8/107 (7,5)	0,987
Пол			
Женщины, n/N (%)	18/53 (34,0)	46/107 (43,0)	0,273
Мужчины, n/N (%)	35/53 (66,0)	61/107 (57,0)	
Медиана (диапазон) скорости клубочковой фильтрации по MDRD, мл/мин/1,73 м ²	67 (40–140)	75 (25–175)	0,095
< 70 мл/мин/1,73 м ² , n/N (%)	33/53 (62,3)	48/106 (45,3)	0,043
< 90 мл/мин/1,73 м ² , n/N (%)	44/53 (83,0)	82/106 (77,4)	0,407
Медиана (диапазон) оценки по шкале ECOG, баллы	1 (0–2)	1 (0–3)	0,751
3 балла, n/N (%)	0/53 (0,0)	7/107 (6,5)	0,060
Медиана (диапазон) индекса коморбидности по шкале CIRS-G	2 (0–9)	3 (0–12)	0,617
> 6, n/N (%)	3/53 (5,7)	15/107 (14,0)	0,115
Стадия заболевания по Binet			
A, n/N (%)	7/53 (13,2)	11/106 (10,4)	0,83
B, n/N (%)	33/53 (62,3)	73/106 (68,9)	
C, n/N (%)	13/53 (24,5)	22/106 (20,8)	
Гепато- и спленомегалия, n/N (%)	28/52 (53,8)	67/107 (62,6)	0,289
Увеличение внутрибрюшных и забрюшинных лимфатических узлов, n/N (%)	7/52 (13,5)	25/107 (23,4)	0,144
Массивная периферическая лимфаденопатия, n/N (%)	6/51 (11,8)	21/107 (19,6)	0,220
Медиана (диапазон) лейкоцитов, ×10 ⁹ /л	52 (7–500)	35,5 (9–290)	0,271
Медиана (диапазон) β2-микроглобулина, мг/л	3,39 (0,26–15,12)	3,48 (0,16–14,05)	0,946
> 3,5 мг/л, n/N (%)	17/34 (50,0)	33/67 (49,3)	0,943
Экспрессия CD38 ≥ 30 %, n/N (%)	7/34 (20,5)	31/72 (43,0)	0,024
Хромосомные аберрации по данным FISH-исследования			
del(17p), n/N (%)	3/44 (6,8)	5/95 (5,3)	0,744
del(11q), n/N (%)	15/44 (34,1)	31/95 (32,6)	
del(13q), n/N (%)	16/44 (36,4)	28/95 (29,5)	
Трисомия 12, n/N (%)	4/44 (9,4)	9/95 (9,5)	
Медиана (диапазон) времени до начала терапии, мес.	2 (0–96)	6 (0–100)	0,045
Медиана (диапазон) курсов терапии	6 (1–8)	6 (1–6)	0,154

MDRD — модификация диеты при болезнях почек; М — мутированный; нМ — немутированный.

У пациентов со стереотипностью BCR чаще выявлялось массивное увеличение периферических лимфатических узлов: 31 vs 14,9 % ($p = 0,037$, Z-критерий). Большой опухолевый объем («bulky») был особенно характерен для стереотипных групп 1 (66,6 %; $p = 0,01$) и 8 (50 %; $p = 0,043$, Z-критерий). В стереотипных группах № 8 и 7 статистически значимо чаще встречалась del(17p) ($p = 0,01$ и $p = 0,033$, Z-критерий). Мутации *NOTCH1* выявлялись значительно чаще в стереотипной группе № 8 по сравнению со всеми

**Рис. 2.** Частота основных стереотипных групп**Fig. 2.** The frequency of basic stereotype groups

остальными больными. Они были обнаружены у 2 (50 %) из 4 пациентов ($p = 0,029$, Z-критерий).

Особенности поверхностного фенотипа клеток ХЛЛ у больных со стереотипностью

У 104 из 183 пациентов с известным мутационным статусом IGHV-генов были доступны детальные результаты иммунофенотипирования лимфоцитов крови. В подавляющем большинстве случаев наблюдался классический фенотип ХЛЛ. Медиана относительного уровня экспрессии CD200 у всех пациентов составила 98,8 %, CD23 — 83,8 %. В 2 наблюдениях результат анализа был интерпретирован как ХЛЛ с атипичным фенотипом, поскольку имелось существенное снижение экспрессии CD23 (14,6 и 19,2 % соответственно). В обоих случаях имелась коэкспрессия CD43 и CD200 и отсутствовала транслокация t(11;14) (q13;q32), что позволяет с уверенностью исключить лимфому из клеток зоны мантии.

Признаки стереотипности были выявлены у 19 (18,3 %) из 104 больных, в т. ч. в 1 наблюдении со снижением экспрессии CD23. Сравнение относительного уровня экспрессии поверхностных маркеров CD20, CD38, CD43, CD79b, CD22, CD200, κ и λ у пациентов с наличием и отсутствием стереотипности строения BCR не показало статистически значимых различий ($p > 0,05$, критерий Манна—Уитни). В то же время наличие стереотипности ассоциировалось со значимым снижением уровня экспрессии CD23 (медиана 64,6 vs 85,3 %; $p = 0,05$, критерий Манна—Уитни) (рис. 3). Можно предположить, что снижение экспрессии CD23 в стереотипных случаях является отражением повышенной активации лейкозных клеток. Так, подавление экспрессии CD23 в В-лимфоцитах описано *in vitro* при активации Toll-подобных рецепторов и BCR [20, 21].

Клиническое значение полученных результатов

У 126 (69 %) из 183 пациентов с известным мутационным статусом IGHV-генов были получены данные об ответе на терапию. Из них у 98 (77,8 %) была документирована полная ремиссия, у 20 (15,9 %) — частичная. Не ответили на терапию 8

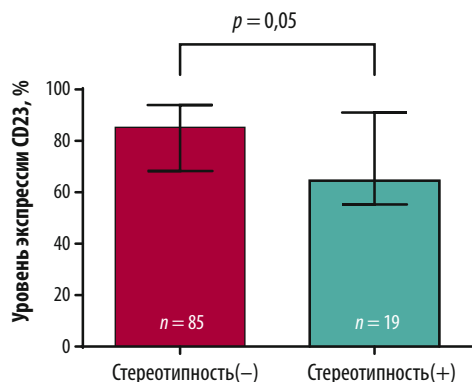


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии CD23 у пациентов с различной стереотипностью (случаи ХЛЛ со сходным строением BCR)

Fig. 3. A relative level of CD23 expression in patients with different stereotypicity (CLL cases with a similar structure of BCR)

Таблица 3. Ответ на противоопухолевую терапию у больных ХЛЛ с различным мутационным статусом IGHV-генов

Ответ на терапию	< 98 % (М-ХЛЛ)	≥ 98 % (нМ-ХЛЛ)	<i>p</i>
Полная ремиссия, <i>n/N</i>	37/43 (86,0 %)	61/83 (73,5 %)	0,266
Частичная ремиссия, <i>n/N</i>	4/43 (9,3 %)	16/83 (19,3 %)	
Отсутствие ответа, <i>n/N</i>	2/43 (4,6 %)	6/83 (7,2 %)	
МОБ в КМ < 0,01 %, <i>n/N</i>	12/33 (36,0 %)	16/65 (25,0 %)	0,224

КМ — костный мозг; М — мутированный; нМ — немутированный.

(6,3 %) больных. Уровень ответа у всех 126 пациентов не отличался от общей выборки. Оценка МОБ в костном мозге была выполнена у 98 больных. Из них у 28 (22,2 %) ко времени окончания лечения в костном мозге опухолевые лимфоциты не определялись. Кроме того, не было обнаружено различий в ответе у пациентов с мутированным и немутированным вариантами ХЛЛ (табл. 3).

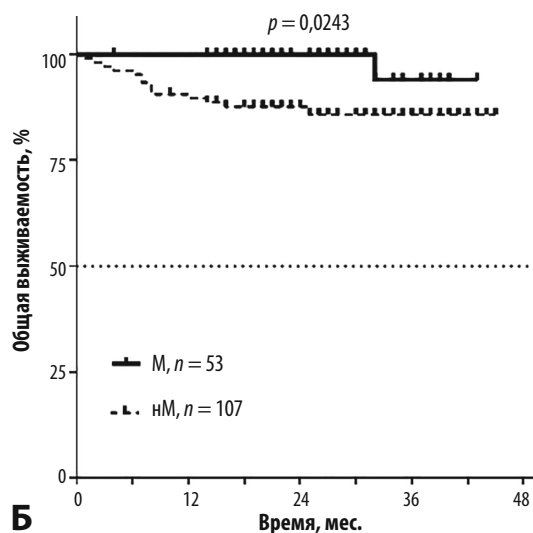
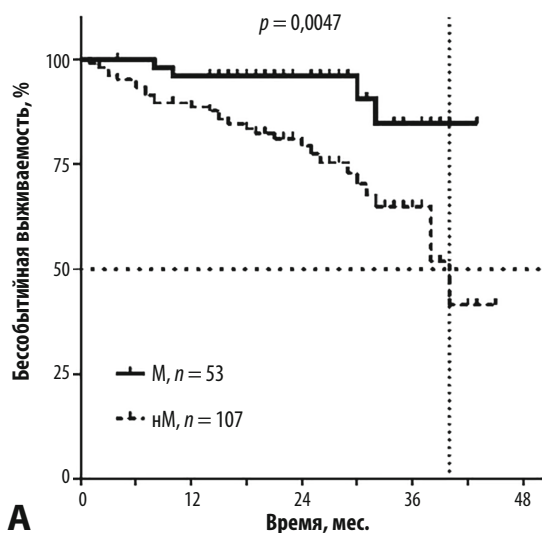


Рис. 4. Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость в группах больных с различным мутационным статусом IGHV-генов (порог 98 %) М — мутированный; нМ — немутированный.

Fig. 4. The event-free (A) and overall (B) survival rates in patients with different mutation status of IGHV genes (cut-off 98 %) М — mutated; нМ — unmutated.

При анализе БСВ в подгруппах пациентов с наличием и отсутствием признаков соматической гипермутации IGHV-генов при использовании стандартного порога отсечения 2 % были выявлены статистически значимые различия. Количество событий в первой подгруппе равно 4 из 53, во второй — 29 из 107 ($p = 0,0047$). Медиана БСВ у пациентов с немутированным вариантом IGHV-генов составила 40 мес., в то время как в подгруппе мутированного ХЛЛ она пока не достигнута (рис. 4, А).

За время наблюдения в группе пациентов с мутированным вариантом IGHV-генов умер 1 больной, в то время как в группе немутированного ХЛЛ было документировано 14 летальных исходов. Медиана ОВ в обеих группах не достигнута (рис. 4, Б). Тем не менее сравнение ОВ показало статистически значимое различие ($p = 0,0243$) в пользу мутированного ХЛЛ.

Разделение пациентов на группы риска по Z. Davis и соавт. не имело прогностической значимости в исследованной когорте (рис. 5). В частности, не наблюдалось различия в БСВ и ОВ у пациентов с < 97 и < 99 % идентичности последовательности IGHV-генов. Расхождение результатов может объясняться разницей в размерах выборки и времени наблюдения.

Ответ на терапию не различался в группах с наличием или отсутствием стереотипности. Так, количество полных ремиссий составило соответственно 17 (74 %) из 23 и 81 (71,7 %) из 113, а частота эрадикации МОБ — 5 (27,8 %) из 18 и 23 (28,4 %) из 81 соответственно. Анализ БСВ показал ее снижение у пациентов со стереотипностью BCR (рис. 6, А). Число неблагоприятных событий в стереотипных случаях достигло 10/30 (33 %) vs 23/130 (17,7 %) в нестереотипных. Медиана БСВ у больных со стереотипностью равна 38 мес., в то время как у остальных пациентов она не была достигнута за время наблюдения ($p = 0,042$). В данных подгруппах ОВ в отличие от БСВ статистически значимо не различалась ($p = 0,119$) (рис. 6, Б).

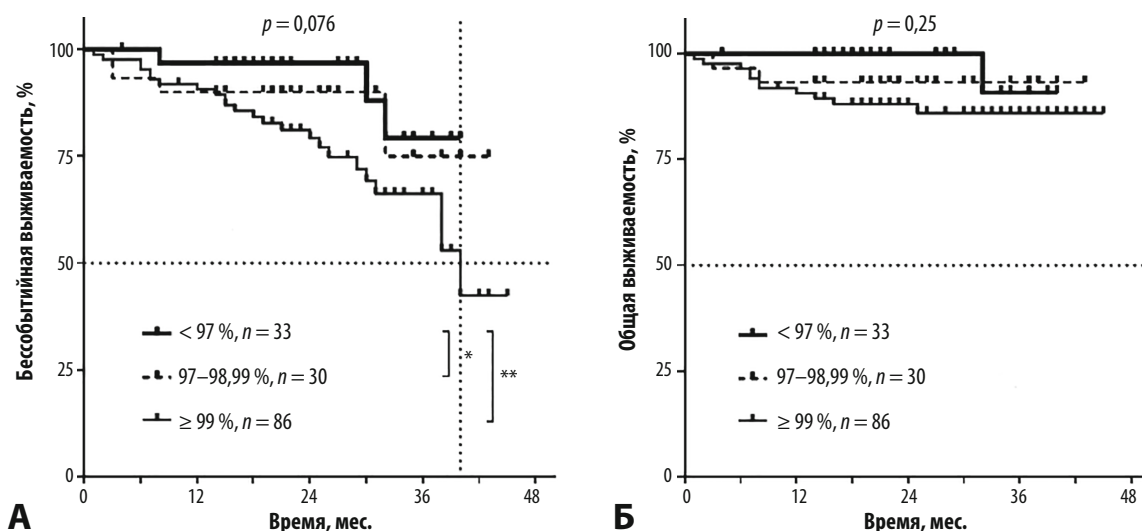


Рис. 5. Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость у больных ХЛЛ с различным мутационным статусом IGHV-генов (стратификация по Z. Davis и соавт.). * $p = 0,464$; ** $p = 0,051$.

Fig. 5. The event-free (A) and overall (B) survival rates in CLL patients with different mutation status of IGHV genes (stratification according to Z. Davis et al.). * $p = 0.464$; ** $p = 0.051$.

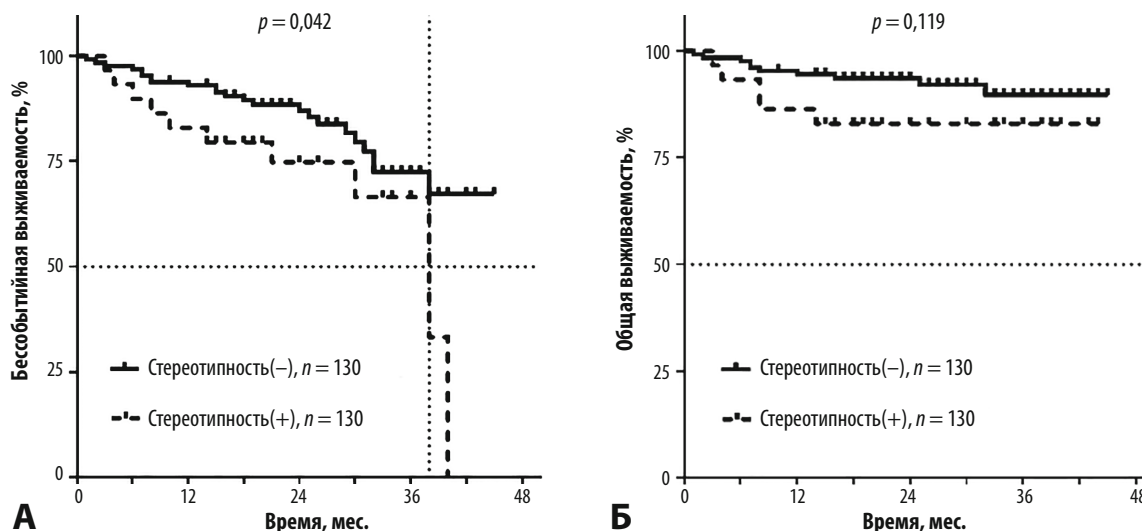


Рис. 6. Бессобытийная (А) и общая (Б) выживаемость в наблюдениях с различной стереотипностью

Fig. 6. The event-free (A) and overall (B) survival rates in observations with different stereotypy

Исследование гена IGHV3-21 не влияло на время до начала терапии ($p = 0,675$, критерий Манна—Уитни), БСВ ($p = 0,752$) и ОВ ($p = 0,776$). При сравнении показателей выживаемости в IGHV3-21-позитивных случаях со стереотипным (11/14) и нестереотипным (3/14) вариантами гена существенных различий также не было обнаружено.

При однофакторном регрессионном анализе отмечено ухудшение показателей БСВ у пациентов в возрасте 75 лет и старше (отношение рисков [ОР] 2,909; 95%-й доверительный интервал [95% ДИ] 1,21–6,993; $p = 0,017$), в случаях с массивной внутрибрюшной и забрюшинной лимфаденопатией (ОР 2,564; 95% ДИ 1,303–5,045; $p = 0,006$), при не менее 98 % идентичности герминальной последовательности клональных перестроек IGHV-гена (ОР 4,002; 95% ДИ 1,406–11,389; $p = 0,009$), а также у всех больных со стереотипным строением BCR (ОР 2,119; 95% ДИ 1,007–4,457;

$p = 0,048$). При включении всех перечисленных выше факторов в модель многофакторного анализа только мутационный статус IGHV-генов и массивное поражение внутрибрюшных и забрюшинных лимфатических узлов сохранили статистическую значимость ($p = 0,039$ и $p = 0,01$) (табл. 4).

Таблица 4. Многофакторный анализ для бессобытийной выживаемости

Фактор прогноза	Отношение рисков	95% ДИ	p
Возраст ≥ 75 лет	2,112	0,716–6,229	0,175
Массивная внутрибрюшная и забрюшинная лимфаденопатия	2,614	1,254–5,45	0,010
Немутированный ХЛЛ	3,081	1,06–8,952	0,039
Наличие стереотипности BCR	1,703	0,8–3,625	0,167

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация BCR (сигналинг) играет важную роль в биологии ХЛЛ, что подтверждается наличием большого количества случаев с почти идентичным строением рецептора, его специфичностью к широко распространенным аутоантигенам, феноменом автономной активации, а также высокой эффективностью таргетных ингибиторов ВТК, PI3K и SYK [1, 22, 23].

Одной из наиболее важных характеристик BCR при ХЛЛ является его мутационный статус. Действительно, во многих работах указывается на то, что гетерогенность течения ХЛЛ и различная эффективность иммунохимиотерапии в значительной степени обусловлены типом строения BCR. В то же время прогностическая значимость этого показателя при применении режима BR изучена недостаточно.

В настоящей работе показано, что у больных ХЛЛ, имеющих признаки активности заболевания,IGHV-немутированный вариант встречается примерно в 2 раза чаще, чем мутированный. При этом не наблюдается корреляции со стадией заболевания по Binet. CD38 не является надежным суррогатным маркером мутационного статуса, поскольку экспрессия этого антигена может наблюдаться в части случаев мутированного ХЛЛ.

По нашим данным, мутационный статус IGHV-генов не влияет на частоту достижения полного ответа и эрадикацию МОБ при использовании режима BR, однако он является наиболее важным предиктором ОВ и БСВ. Использование порога не менее 98 % идентичности герминальному IGHV-гену представляется наиболее целесообразным, т. к. такой подход позволяет прогнозировать течение заболевания лучше, чем вариант, предложенный Z. Davis и соавт.

В крупной выборке российских больных примерно 19 % имели признаки стереотипности, что согласуется с другими работами. В случаях ХЛЛ, имеющих стереотипный BCR, отмечалась более низкая экспрессия важного диагностического маркера CD23. Наиболее распространенными оказались стереотипные группы № 2 и 1, характеризующиеся преобладанием немутированного варианта BCR. В стереотипных группах № 8 и 7 выявлена более высокая частота прогностически неблагоприятных мутаций, а также большой опухолевой массы.

В целом при использовании режима BR в первой линии терапии необходимо проводить анализ мутационного статуса IGHV-генов, поскольку генотипирование немутированного варианта является предиктором худшей выживаемости. Дополнительный рутинный анализ полученной последовательности на наличие признаков стереотипности, а также использование гена IGHV3-21 не представляются целесообразными, поскольку эти показатели не имеют самостоятельного прогностического значения. Результаты работы подчеркивают необходимость разработки новых подходов к терапии IGHV-немутированного варианта ХЛЛ.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке компании «Астеллас Фарма Юроп Б.В.».

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: В.В. Стругов, Е.А. Стадник, А.Ю. Зарицкий.

Сбор и обработка данных: В.В. Стругов, Е.А. Стадник, А.М. Румянцев, Т.О. Андреева, Ю.В. Вирц.

Предоставление материалов исследования: А.М. Румянцев, Ю.В. Миролюбова, П.А. Бутылин.

Анализ и интерпретация данных: В.В. Стругов, Е.А. Стадник.

Подготовка рукописи: В.В. Стругов.

Окончательное одобрение рукописи: А.Ю. Зарицкий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность всем пациентам — участникам исследования VEN-001, а также врачам-гематологам Л.В. Анчуковой, Е.Н. Бабич, Н.Б. Булиевой, Т.Е. Бялик, О.А. Васильевой, Е.М. Володичевой, А.Н. Гавриленко, Н.Н. Глопиной, Д.А. Горностаеву, А.В. Губкину, И.Л. Давыдкину, Ж.А. Давыдовой, Н.Б. Есефьевой, В.А. Жеребцовой, К.Д. Капланову, Т.С. Капорской, Е.Г. Кирилловой, Т.С. Константиновой, Т.И. Ксензовой, Г.Б. Кучме, А.Б. Логинову, И.Б. Лысенко, В.Я. Мельниченко, А.А. Мясникову, Е.А. Османову, О.Е. Очировой, О.А. Рукавицыну, О.С. Самойловой, Т.М. Сычевой, А.В. Пройдакову, Т.В. Шелеховой, С.С. Шкляеву, А.Н. Унжековой.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Duhren-von Minden M, Ubelhart R, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signaling. *Nature*. 2012;489(7415):309–12. doi: 10.1038/nature11309.
2. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(2):246–59. doi: 10.1016/j.ccr.2011.06.029.
3. Damm F, Mylonas E, Cosson A, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*. 2014;4(9):1088–101. doi: 10.1158/2159-8290.cd-14-0104.
4. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415–21. doi: 10.1038/nature12477.
5. The International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):779–90. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30029-8.
6. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *Lancet Haematol*. 2014;1(2):e74–84. doi: 10.1016/S2352-3026(14)00005-2.
7. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):928–42. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30051-1.
8. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2012;30(26):3209–16. doi: 10.1200/JCO.2011.39.2688.
9. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*. 2012;119(19):4467–75. doi: 10.1182/blood-2011-11-393694.

- 10.** Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007;21(5):956–64. doi: 10.1038/sj.leu.2404584.
- 11.** Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840–7.
- 12.** Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848–54.
- 13.** Bomben R, Dal Bo M, Zucchetto A, et al. Mutational status of IgV(H) genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia and prognosis: percent mutations or antigen-driven selection? *Leukemia*. 2005;19(8):1490–2. doi: 10.1038/sj.leu.2403830.
- 14.** Hamblin TJ, Davis ZA, Oscier DG. Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated chronic lymphocytic leukaemia – long-term follow up of patients with different percentages of mutations. *Br J Haematol*. 2008;140(3):320–3. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06928.x.
- 15.** Davis Z, Forconi F, Parker A, et al. The outcome of Chronic lymphocytic leukaemia patients with 97% IGHV gene identity to germline is distinct from cases with <97% identity and similar to those with 98% identity. *Br J Haematol*. 2016;173(1):127–36. doi: 10.1111/bjh.13940.
- 16.** Kryachok I, Abramenko I, Bilous N, et al. IGHV gene rearrangements as outcome predictors for CLL patients: experience of Ukrainian group. *Med Oncol*. 2012;29(2):1093–101. doi: 10.1007/s12032-011-9872-5.
- 17.** Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*. 2005;105(4):1678–85. doi: 10.1182/blood-2004-07-2606.
- 18.** Ghia EM, Jain S, Widhopf GF 2nd, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood*. 2008;111(10):5101–8. doi: 10.1182/blood-2007-12-130229.
- 19.** Marinelli M, Ilari C, Xia Y, et al. Immunoglobulin gene rearrangements in Chinese and Italian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(15):20520–31. doi: 10.18632/oncotarget.7819.
- 20.** Jackson L, Cady CT, Cambier JC. TLR4-mediated signaling induces MMP9-dependent cleavage of B cell surface CD23. *J Immunol*. 2009;183(4):2585–92. doi: 10.4049/jimmunol.0803660.
- 21.** Dinkel A, Aicher WK, Haas C, et al. Transcription factor Egr-1 activity down-regulates Fas and CD23 expression in B cells. *J Immunol*. 1997;159(6):2678–84.
- 22.** Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(25):2425–37. doi: 10.1056/NEJMoa1509388.
- 23.** Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2016;31(2):282–91. doi: 10.1038/leu.2016.322.

