

Ассоциация экспрессии pSTAT3, pAKT1 с выживаемостью пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Елена Викторовна Ванеева*, Виталий Анатольевич Росин,
Дмитрий Андреевич Дьяконов, Светлана Валерьевна Самарина

Кировский научно-исследовательский институт гематологии
и переливания крови Федерального медико-биологического
агентства, г. Киров, Россия

Реферат

Цель. Оценить связь изолированной и сочетанной экспрессии pSTAT3, pAKT1 в опухолевых клетках с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.

Методы. В исследование включены 100 пациентов с впервые диагностированной диффузной В-крупноклеточной лимфомой, находившихся под наблюдением в клинике института с 2010 по 2018 гг. и получавших стандартную полихимиотерапию 1-й линии по схеме R-CHOP. Определение относительного количества экспрессирующих pSTAT3 и pAKT1 опухолевых клеток проведено с помощью иммуногистохимического и морфометрического методов. С помощью ROC-метода оптимальный порог отсечения экспрессии опухолевых клеток для белка pSTAT3 установили на уровне 68%, для pAKT1 — 70%. С учётом этих значений всех пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой разделили на группы с высокой и низкой степенью экспрессии указанных маркёров. В результате группу с гиперэкспрессией pSTAT3 ($\geq 68\%$ опухолевых клеток) составили 53 пациента, с низкой степенью активности pSTAT3 ($< 68\%$ опухолевых клеток) — 47 больных. При корреляционном анализе использовали коэффициент корреляции Спирмена. Общую и бессобытийную выживаемость рассчитывали по методу Каплана–Мейера с графическим построением соответствующих кривых. Для подтверждения статистической достоверности полученных данных использовали логранговый критерий.

Результаты. 5-летняя общая выживаемость в группе с гиперэкспрессией pSTAT3 составила 55% — против 87% в группе с низким уровнем экспрессии белка ($p=0,015$). Значимые различия установлены при оценке бессобытийной выживаемости: 43% — в случаях с высокой экспрессией pSTAT3, 66% — с низкой ($p=0,011$). Выявлено статистически достоверное значение высокого уровня экспрессии pAKT1 для 5-летней общей и бессобытийной выживаемости ($p < 0,001$ и $p=0,003$). При низком уровне экспрессии pAKT1 общая выживаемость составила 81%, при высоком уровне экспрессии — 43%, бессобытийная — 64 и 41% соответственно. Также было отмечено, что пациенты с сочетанной гиперэкспрессией pAKT1⁺/pSTAT3⁺ характеризовались наиболее низкими показателями общей и бессобытийной выживаемости по сравнению с группой pAKT1⁻/pSTAT3⁻ ($p=0,001$; $p < 0,001$).

Вывод. Биомаркёры pSTAT3 и pAKT1 могут выступать в качестве дополнительных критериев прогноза при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома, pAKT1, pSTAT3, гиперэкспрессия.

Для цитирования: Ванеева Е.В., Росин В.А., Дьяконов Д.А., Самарина С.В. Ассоциация экспрессии pSTAT3, pAKT1 с выживаемостью пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Казанский мед. ж.* 2020; 101 (4): 501–506. DOI: 10.17816/KMJ2020-501.

Association of expression of pSTAT3, pAKT1 with the survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma

E.V. Vaneeva, V.A. Rosin, D.A. Dyakonov, S.V. Samarina

Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency, Kirov, Russia

Abstract

Aim. To assess the relationship between isolated and combined expression of pSTAT3, pAKT1 in tumor cells with the survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).

Methods. The study included 100 patients with the first diagnosed diffuse large B-cell lymphoma, observed in the institute's clinic between 2010 and 2018 who received standard first-line R-CHOP (rituximab + cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone) chemotherapy. The relative number of expressing pSTAT3 and pAKT1 tumor cells was determined by using immunohistochemical and morphometric methods. The optimal cut-off level of expression on tumor cells estimated by using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for pSTAT3 was 68% and for pAKT1 — 70%. Given these values, all patients with DLBCL were divided into groups with a high and low degree of expression of the biomarkers. As a result, 53 patients were enrolled in the pSTAT3 high expression group ($\geq 68\%$ tumor cells) and 47 patients to the pSTAT3 low expression group ($< 68\%$ tumor cells). Spearman's correlation coefficient was used to examine relationships. Overall survival and event-free survival were estimated by Kaplan–Meier curves. The log-rank test was used for groups comparison.

Results. The five-year overall survival rate in the pSTAT3 high expression group was 55% versus 87% in the low expression group, $p=0.015$. A significant difference was found in the assessment of event-free survival: 43% for the group of pSTAT3 high expression, 66% for the group of low expression, $p=0.011$. A statistically significant value of a high level of pAKT1 expression was revealed for 5-year overall and event-free survival ($p < 0.001$ and $p=0.003$). Overall survival rate was 81% for the pAKT1 low expression group and 43% for the high expression group while event-free survival rate was 64 and 41%, respectively. Also, patients with pAKT1⁺/pSTAT3⁺ (high level) co-expression had extremely low rates of overall and event-free survival rates compared with the pAKT1⁻/pSTAT3⁻ (low level) group ($p=0.001$; $p < 0.001$).

Conclusion. The pSTAT3 and pAKT1 biomarkers can be used as additional prognosis criteria for diffuse large B-cell lymphoma.

Keywords: diffuse large B-cell lymphoma, pAKT1, pSTAT3, hyperexpression.

For citation: Vaneeva E.V., Rosin V.A., Dyakonov D.A., Samarina S.V. Association of expression of pSTAT3, pAKT1 with the survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Kazan Medical Journal*. 2020; 101 (4): 501–506. DOI: 10.17816/KMJ2020-501.

Актуальность. Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) — одна из наиболее распространённых форм агрессивных лимфоидных неоплазий. Эта нозология включает разнородную группу неходжкинских лимфом, различающихся по морфологическим, молекулярно-генетическим и иммунофенотипическим критериям. Заболевание характеризуется вариабельным клиническим течением, ответом на терапию и прогнозом [1,2].

Существующие клинические системы оценки прогноза, такие как международные прогностические индексы, достаточно успешно применяют в клинической практике для ранней стратификации пациентов с ДВККЛ и выбора адекватного терапевтического подхода. Однако у 30–40% больных они не позволяют точно предсказать дальнейшее течение болезни, так как преимущественно опираются на клинические характеристики больных [2–4]. Это определяет необходимость поиска дополнительных молекулярно-биологических факторов прогноза.

Известно, что в патогенез ДВККЛ вовлечено множество патологически активированных сигнальных путей (JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTOR и др.). Степень экспрессии ключевых молекул-посредников этих путей влияет на биоло-

гическое поведение неопластических клеток и может определять прогноз заболевания. Кроме того, компоненты различных сигнальных каскадов служат потенциальными мишенями для средств таргетной терапии [5].

Протеин STAT3 — важный участник сигнального пути JAK/STAT3 [6]. Этот белок опосредует экспрессию множества генов в ответ на различные стимулы и таким образом регулирует важные клеточные процессы, включая цикл деления клетки и апоптоз. В некоторых зарубежных работах показано, что гиперэкспрессия данного транскрипционного фактора напрямую связана с активацией пролиферации и злокачественной трансформацией клеток. И напротив, подавление активности гена *STAT3* приводит к остановке клеточного цикла, апоптозу и регрессии опухоли [7].

Сигнальный белок pAKT1 участвует во многих жизненно важных клеточных процессах. В условиях онкогенеза дисрегуляция его экспрессии способствует прогрессированию опухоли, выживанию неопластических клеток и усилению ангиогенеза. Показано, что каскад PI3K/AKT/mTOR конститутивно активирован в 25–50% случаев ДВККЛ [8]. Вместе с тем, прогностическое значение экспрессии pSTAT3, pAKT1 при данной нозологии изучено недоста-

точно. Результаты опубликованных работ противоречивы [9, 10]. В отечественной научной литературе работ по этой теме не обнаружено.

Цель исследования — оценить связь изолированной и сочетанной экспрессии pSTAT3, pAKT1 в опухолевых клетках с выживаемостью больных ДВККЛ.

Материал и методы исследования. В ретроспективное исследование включены 100 больных ДВККЛ, состоявших на учёте в клинике ФГБУН КНИИГ и ПК ФМБА России за период с 2010 по 2018 гг. Критерием включения в исследование был морфологически и иммуногистохимически подтверждённый диагноз ДВККЛ, установленный в соответствии с классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения (2017). Все обследуемые получали стандартную терапию 1-й линии по схеме R-СНОР. Медиана возраста больных составила 58 лет (разброс 24–83 года). Исследование одобрено локальным этическим комитетом при ФГБУН КНИИГ и ПК ФМБА России (протокол №10 от 14.04.2020).

Гистологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследования проводили на архивном материале первичной биопсии лимфатических узлов/опухолевых образований больных ДВККЛ. ИГХ-анализ всем пациентам проводили до начала лечения. Идентификацию pSTAT3- и pAKT1-позитивных опухолевых клеток в биоптатах осуществляли с использованием антител к pSTAT3 (phosphoTyr705, GeneTex), pAKT1 (phosphoSer 473, GeneTex). Морфометрическую оценку относительного содержания опухолевых клеток выполняли визуально способом двойного «слепого» анализа на световом микроскопе AxioScore.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Подсчёт клеток проводили в 10 полях зрения для каждого образца с применением окуляров $\times 10$ и объектива $\times 100$.

Оптимальный порог отсечения для оценки уровня экспрессии белков вычисляли с помощью ROC-анализа. Общую (ОВ) и бессобытийную (БСВ) выживаемость рассчитывали по методу Каплана–Мейера с графическим построением соответствующих кривых. Вероятность развития неблагоприятного исхода заболевания оценивали по показателю отношения рисков (ОР) с указанием границ 95% доверительного интервала (ДИ). Сравнительный анализ выживаемости проводили с использованием логарифмического рангового критерия (log-rank test). В корреляционном анализе использовали коэффициент корреляции Спирмена (r). Статистическую обработку данных осуществляли

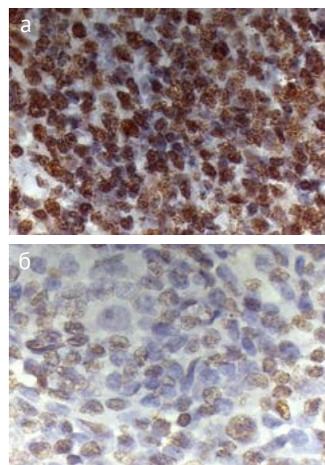


Рис. 1. Лимфатический узел. Иммуногистохимическая окраска опухолевых клеток антителом к pSTAT3: а — уровень ядерной экспрессии pSTAT3 $\geq 68\%$; б — уровень ядерной экспрессии pSTAT3 $< 68\%$, $\times 1000$

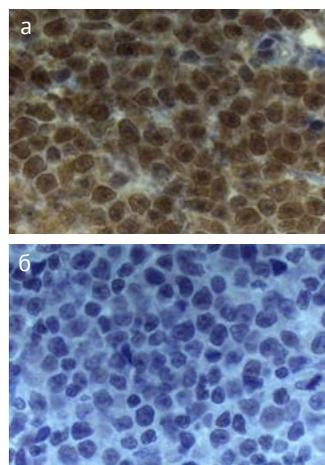


Рис. 2. Лимфатический узел. Иммуногистохимическая окраска опухолевых клеток антителом к pAKT1: а — уровень ядерной экспрессии pAKT1 $\geq 70\%$; б — уровень ядерной экспрессии pAKT1 $< 70\%$, $\times 1000$

с помощью программы SPSS, версия 19.0. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. С помощью ROC-метода оптимальный порог отсечения экспрессии опухолевых клеток для белка pSTAT3 установили на уровне 68%, для pAKT1 — 70%. С учётом этих значений всех пациентов с ДВККЛ разделили на группы с высокой и низкой степенью экспрессии указанных маркёров. В результате группу с гиперэкспрессией pSTAT3 ($\geq 68\%$ опухолевых клеток) составили 53 пациента, с низкой степенью активности pSTAT3 ($< 68\%$ опухолевых клеток) — 47 больных (рис. 1).

Группу с высокой степенью активности pAKT1 ($\geq 70\%$) составили 42 пациента, с низкой ($< 70\%$) — 58 больных (рис. 2).

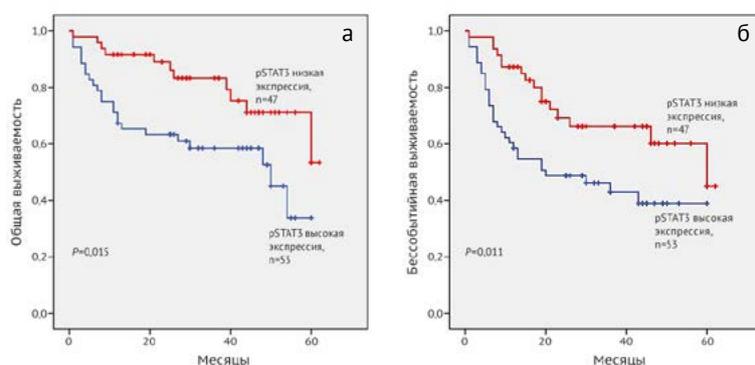


Рис. 3. Общая (а) и бессобытийная (б) выживаемость больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой в зависимости от степени экспрессии pSTAT3

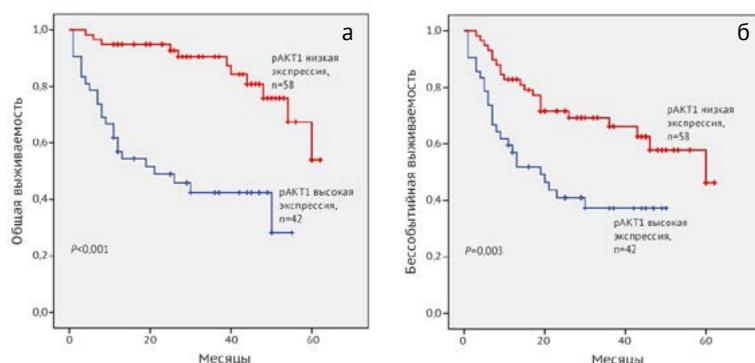


Рис. 4. Общая (а) и бессобытийная (б) выживаемость больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой в зависимости от степени экспрессии pAKT1

Оценены отдалённые результаты терапии больных ДВККЛ (ОВ и БСВ) с учётом разных уровней экспрессии белков pSTAT3, pAKT1. 5-летняя ОВ (рис. 3, а) в группе с гиперэкспрессией pSTAT3 соответствовала 55% (Me=50 мес) против 77% (Me не достигнута) у пациентов с низким уровнем экспрессии белка (ОР=2,3, 95% ДИ 1,16–4,87; $p=0,019$). При анализе БСВ (рис. 3, б) в случаях с высокой экспрессией pSTAT3 она соответствовала 43% (Me=20 мес), с низкой — 66% (Me=60 мес; ОР=2,2, 95% ДИ 1,17–3,96; $p=0,014$).

5-летняя ОВ у пациентов с высокой экспрессией pAKT1 (рис. 4, а) составила 43% (Me=21 мес), у больных с подпороговым уровнем экспрессии этого белка — 81% (Me не достигнута; ОР=5,3, 95% ДИ 2,51–11,25; $p < 0,001$). Такая же закономерность обнаружена при оценке БСВ (рис. 4, б): 41% (Me=19 мес) — в случаях с высокой экспрессией pAKT1, 64% — с низкой (Me=60 мес; ОР=2,3, 95% ДИ 1,31–4,23; $p=0,005$).

В результате проведённого корреляционного анализа установлена умеренная положительная связь ($r=0,368$; $p < 0,01$) между экспрессией

pSTAT3 и pAKT1. В связи с этим представляла интерес оценка влияния сочетанной экспрессии указанных маркёров на ОВ и БСВ больных ДВККЛ (рис. 5).

Приведённые данные свидетельствуют о том, что показатели 5-летней ОВ в группах больных имеют значимые различия ($p=0,001$). Наихудшая ОВ (32%; Me=12 мес; ОР=5,2, 95% ДИ 2,57–10,22; $p=0,001$) отмечена в группе пациентов, опухолевые клетки которых характеризовались одновременной гиперэкспрессией pSTAT3 и pAKT1. И напротив, наиболее высокая ОВ (85%) зарегистрирована у больных с низкой сочетанной экспрессией указанных маркёров. ОВ в группе больных с двойным позитивным статусом экспрессии pSTAT3/pAKT1 также была достоверно ниже аналогичных показателей в группах с изолированной гиперэкспрессией pSTAT3 и pAKT1: 32% против 69 и 72% соответственно ($p=0,001$).

При анализе БСВ также выявлены межгрупповые различия ($p < 0,001$). Этот показатель в группе больных с высокой степенью коэкспрессии опухолевыми клетками pSTAT3 и pAKT1 соответствовал 29% (Me=17 мес) и был

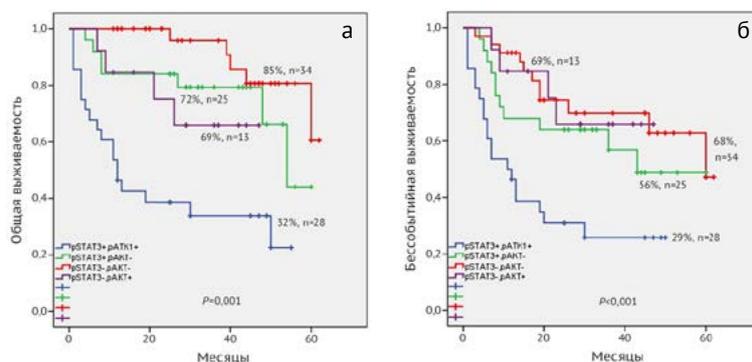


Рис. 5. Общая (а) и бессобытийная (б) выживаемость больных с различным сочетанием экспрессии pSTAT3 и pAKT1

значительно ниже значений БСВ остальных групп (OR=3,2, 95% ДИ 1,81–5,88; $p=0,001$).

Обсуждение. В ходе исследования выявлена ассоциация между степенью экспрессии белков pSTAT3 и pAKT1 в клеточном субстрате опухоли и выживаемостью пациентов с ДВККЛ, получавших стандартную полихимиотерапию 1-й линии. Установлено, что риск возникновения летального исхода был в 2,3 раза выше у больных ДВККЛ с гиперэкспрессией pSTAT3 в опухолевых клетках, чем у пациентов с низкой степенью экспрессии белка. Риск развития заболевания при анализе БСВ был в 2,2 раза выше у больных с высокой степенью экспрессии pSTAT3. Предположительно это связано с тем, что избыточный синтез данного транскрипционного фактора в неопластических клетках конститутивно стимулирует клеточный цикл, что ведёт к прогрессированию опухоли. Полученные нами данные согласуются с результатами отдельных зарубежных исследований, согласно которым бесконтрольная активация сигнального пути JAK/STAT3 коррелирует с низкой ОВ и БСВ пациентов с ДВККЛ [7]. Вместе с тем, некоторые научные работы не подтверждают этот факт [11].

Выявлено, что биомаркер pAKT1 — предиктор низкой выживаемости при ДВККЛ. У больных с надпороговым уровнем экспрессии этого белка ОВ была ниже в 1,9 раза, а риск смерти выше в 5 раз по сравнению с пациентами, имевшими низкую степень экспрессии pAKT1 в опухолевых клетках. Схожая закономерность установлена и в отношении БСВ. Полученные данные согласуются с рядом иностранных работ и подтверждают значимую роль дисрегуляции пути PI3K/AKT/mTOR в патогенезе ДВККЛ [10].

Установлено влияние сочетанной экспрессии pSTAT3 и pAKT1 на прогноз заболевания. У пациентов с одновременной надпороговой

экспрессией белков в опухолевой ткани показатели ОВ и БСВ были в среднем в 1,5 раза ниже, чем в группах больных с изолированной гиперэкспрессией pSTAT3 и pAKT1. Это может указывать на наличие тесной связи в функционировании различных сигнальных путей и существование синергических и модулирующих эффектов в отношении течения заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Надпороговые значения экспрессии pSTAT3 и pAKT ассоциируются с низкой общей и бессобытийной выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.

2. Сочетанная гиперэкспрессия pSTAT3 и pAKT в опухолевых клетках диффузной В-крупноклеточной лимфомы значительно увеличивает риск развития неблагоприятного исхода при лечении по протоколу R-СНОР.

3. Биомаркеры pSTAT3 и pAKT можно применять в качестве дополнительных критериев прогноза при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.

Участие авторов. В.А.Р. — научное руководство работой, разработка дизайна рукописи и её написание, анализ и интерпретация статистических данных; Е.В.В. — сбор данных, выполнение практической части исследования, анализ и интерпретация статистических данных, написание рукописи; Д.А.Д. — разработка научного направления, проверка критически важного интеллектуального содержания статьи; С.В.С. — сбор клинических данных по пациентам; И.В.П. — координация работы клиничко-лабораторных подразделений.

Источник финансирования. ФГБУН КНИИГ и ПК ФМБА России (государственная организация).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поддубная И.В. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома. В кн.: *Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфолиферативных заболеваний*. Под ред. И.В. Поддубной, В.Г. Савченко. М.: ООО «БукиВеди». 2018; 58–65. [Poddubnaya I.V. Diffuse large B-cell lymphoma. In: *Rossiyskie klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu limfoproliferativnykh zabolevaniy*. (Russian clinical recommendations on diagnostics and treatment of lymphoproliferative disorders.) Ed. by I.V. Poddubnaya, V.G. Savchenko. M.: ООО «BukiVedi». 2018; 58–65. (In Russ.)]
2. Sehn L.H., Gascoyne R.D. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015; 125 (1): 22–32. DOI: 10.1182/blood-2014-05-577189.
3. Расторгуев С.М., Королёва Д.А., Булыгина Е.С. и др. Клиническое и прогностическое значение молекулярных маркёров диффузной В-крупноклеточной лимфомы. *Клин. онкогематол.* 2019; 12 (1): 95–100. [Rastorguev S.M., Koroleva D.A., Bulygina E.S. et al. Clinical and prognostic value of molecular markers of diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical oncohematology*. 2019; 12 (1): 95–100. (In Russ.)] DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-1-95-100.
4. Капланов К.Д., Волков Н.П., Клиточенко Т.Ю. Результаты анализа регионального регистра пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой: факторы риска и проблемы иммунохимиотерапии. *Клин. онкогематол.* 2019; 12 (2): 154–164. [Kaplanov K.D., Volkov N.P., Klitochenko T.Yu. Analysis results of the regional registry of patients with diffuse large B-cell lymphoma: risk factors and chemomunotherapy issues. *Clinical oncohematology*. 2019; 12 (2): 154–164. (In Russ.)] DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-2-154-164.
5. Ling Dong, Huijuan Lv, Wei Li et al. Co-expression of PD-L1 and p-AKT is associated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma via PD-1/PD-L1 axis activating intracellular AKT/mTOR pathway in tumor cells. *Oncotarget*. 2016; 7 (22): 33 350–33 362. DOI: 10.18632/oncotarget.9061.
6. Rawlings J.S., Rosler K.M., Harrison D.A. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* 2004; 117 (8): 1281–1283. DOI: 10.1242/jcs.00963.
7. Wu Z.L., Song Y.Q., Shi Y.F. et al. High nuclear expressions of STAT3 is associated with unfavorable prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol.* 2011; 4: 31. DOI: 10.1186/1756-8722-4-31.
8. Xiaoxiao Wang-Xin Cao, Ruifang Sun. Clinical significance of *PTEN* deletion, mutation, and loss of *PTEN* expression in *de novo* diffuse large B-cell lymphoma. *Neoplasia*. 2018; 20 (6): 574–593. DOI: 10.1016/j.neo.2018.03.002.
9. Courtney K.D., Corcoran R.B., Engelman J.A. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 1075–1083. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.3641.
10. Jinfen Wang, Xu-Monette Z.Y., Jabbar K.J. et al. AKT hyperactivation and the potential of AKT-targeted therapy in diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* 2017; 187 (8): 1700–1716. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.04.009.
11. Chi Young Ok, Xu-Monette Z.Y., Tzankov A. et al. STAT3 expression and clinical implications in *de novo* diffuse large B cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP consortium program. *Blood*. 2013; 121 (20): 4021–4031. DOI: 10.1182/blood-2012-10-460063.