

И.А. Крячок
 Я.А. Степанишина
 А.Н. Грабовой
 С.А. Антонюк
 М.В. Иномистова
 О.И. Новосад
 Т.В. Скрипец
 Е.О. Ульянченко

Национальный институт
 рака, Киев, Украина

Ключевые слова: первичная
 медиастиальная
 В-крупноклеточная лимфома,
 с-МУС, транслокация t(8;14),
 FISH-метод.

ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ с-МУС ПРОГНОСТИЧЕСКИМ ФАКТОРОМ ПРИ ПЕРВИЧНОЙ МЕДИАСТИНАЛЬНОЙ (ТИМИЧЕСКОЙ) В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ?

Неблагоприятное влияние с-МУС на течение диффузной В-крупноклеточной лимфомы подтверждено во многих работах. Однако при подварианте первичной медиастиальной лимфомы подобные данные не получены. Цель: изучить прогностическую значимость экспрессии с-МУС и транслокации t(8;14) у пациентов с первичной медиастиальной В-крупноклеточной лимфомой. Объект и методы: на биопсийном материале 33 пациентов проведено иммуногистохимическое исследование для определения экспрессии белка с-тус, а также FISH-исследование для выявления транслокации t(8;14). Результаты: в 51,6% случаев отмечена выраженная и умеренная ядерная экспрессия с-тус. При проведении FISH-исследования у трети пациентов с положительной экспрессией с-тус выявлена транслокация t(8;14). Выводы: не отмечено различий в течении заболевания у пациентов с разной степенью экспрессии с-МУС, а также при наличии или отсутствии нарушений структуры с-МУС гена.

ВВЕДЕНИЕ

Экспрессия протоонкогена с-МУС нарушена при многих видах опухолей. Его избыточная экспрессия часто ассоциируется с плохим прогнозом заболевания [1–3]. Ген с-МУС расположен в группе 8q24, в субтерминальной части длинного плеча 8-й хромосомы и является представителем суперсемейства факторов транскрипции. Описано влияние с-МУС на пролиферативную активность клеток, выживаемость и трансформацию [3]. В человеческом организме активация с-МУС может происходить в результате прямых изменений (повреждений) гена (транслокация, амплификация) или при воздействии на сигнальные пути.

Индукцированный с-МУС лимфомогенез изучен при ряде лимфоидных новообразований, однако клиническое значение перестройки с-МУС при первичной медиастиальной В-крупноклеточной лимфоме (ПМВКЛ) окончательно не выяснено. Согласно данным доступной литературы, перестройки, ассоциированные с онкогеном с-МУС, играют существенную роль в формировании лимфомы Беркитта (ЛБ) [4]. Транслокации между с-МУС и генами тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов являются отличительной чертой ЛБ. В отличие от ситуации при ЛБ, при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ) и других видах лимфом реаранжировка с-МУС происходит в сочетании с повреждениями в других генах —

BCL6, BCL11A, PAX5 и ICAROS49. При ДВККЛ транслокация t(8;14) встречается в 5–17% случаев [5]. Амплификация с-МУС системно не изучалась, но существуют некоторые данные, свидетельствующие о редких случаях этой генетической аномалии. По информации А. Valera и соавторов [6], частота амплификации с-МУС не превышает 2%. Подобные транслокации приводят к более агрессивному течению и неудовлетворительному ответу на терапию по схеме R-CHOP [6]. Важно также, что в 60–80% случаев перестройка с-МУС ассоциируется с повреждениями Bcl2 или Bcl6 (double-hit-лимфомы), в таком случае прогноз заболевания более неблагоприятен [7].

Исследования, проводившиеся при ЛБ и ДВККЛ, показали корреляцию между выявляемой при иммуногистохимическом исследовании экспрессией белка с-тус и наличием аномалии его гена, оказывающую значительное влияние на клиническое течение [8]. Прогностическая значимость экспрессии с-МУС установлена при мантийноклеточной лимфоме [1]. При ПМВКЛ, как правило, прогноз благоприятный и ответ на лечение в основном достаточно хороший [9]. Однако у части пациентов (15–20%) отмечается неблагоприятное течение с прогрессированием заболевания, несмотря на проводимую терапию и ранние рецидивы [10]. При этом роль с-МУС как прогностического фактора у этой категории больных на сегодня остается неизвестной.

Существуют достаточно противоречивые данные относительно механизма повреждения гена *c-MYC* при ПМВКЛ. Например, согласно данным [11] реаранжировка гена *c-MYC* при указанной форме лимфомы не происходит или встречается крайне редко. А. Scarpa и соавторы [12] представили доказательства перестройки гена *c-MYC* в 3 из 6 наблюдавшихся случаев ПМВКЛ. Позднее Р. Tsang и соавторы [13] и А. Scarpa и соавторы [14] показали наличие аномалий *c-MYC* соответственно у 19 и 25% пациентов. Исследование [14] основано на результатах анализа с использованием саузерн-блоттинга и применения ДНК-зондов. В 8 из 32 биоптатов опухоли выявлены различные варианты перестройки гена *c-MYC*. У 6 больных отмечена транслокация $t(8;14)$ и у 2 — транслокации $t(2;8)$ и $t(8;22)$, имеющиеся также при эндемической форме ЛБ. Еще в двух случаях зафиксированы точечные разрывы в 1-м экзоне, характерные для спорадической ЛБ.

Р. Tsang и соавторы [13] провели исследование 16 образцов биопсийной ткани пациентов с ПМВКЛ и изучили изменения *bcl-2*, *bcl-6*, *c-myc*, *N-ras*, *K-ras*, *N-ras* и *p53*, используя комбинацию методов — саузерн-блоттинга и полимеразной цепной реакции. Перестройка гена *c-MYC* не была выявлена методом саузерн-блоттинга, однако после проведения полимеразной цепной реакции наличие мутации выявлено в 3 (19%) случаях. Обнаруженная перестройка оказалась аналогичной наблюдающейся при эндемической ЛБ (область 3 конца 1-го экзона) [13].

Группа американских исследователей Университетской клиники штата Юта опубликовала [15] результаты анализа клинико-патологических данных при ПМВКЛ. Специалисты изучали частоту экспрессии *c-MYC* опухолевыми клетками и наличие генетических аномалий *c-MYC*, а также предприняли попытку оценить влияние таких аномалий на результаты лечения пациентов. Исследовали 32 образца опухолевой ткани пациентов с ПМВКЛ. В большинстве случаев выявлена ядерная экспрессия белка *c-myc* разной степени интенсивности (5–60%). В 10 из 30 образцов выявлена выраженная экспрессия *c-MYC*. С помощью FISH-исследования определяли наличие перестройки гена *c-MYC*. Ни у одного больного ее не выявили, включая случаи с 60% иммуногистохимической экспрессией белка *c-myc*. Клинические данные были доступны для анализа только у 8 из 10 пациентов с выраженной и у 6 — с низкой экспрессией *c-MYC*. Преимущественно пациенты получали полихимиотерапию (ПХТ) по схеме R-СНОР с последующей лучевой терапией, у некоторых применяли режим R-da-ЕРОСН. При последующем наблюдении в течение 46 мес все пациенты оставались живы и не имели признаков заболевания [15]. В целом, сделать однозначные выводы о прогностической значимости перестроек гена

c-MYC и выраженной экспрессии кодируемого им белка не представилось возможным.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемую группу составили 33 пациента с впервые диагностированной ПМВКЛ, находившиеся на лечении в Национальном институте рака (Киев, Украина) с 2009 по 2015 г. У всех больных в патологоанатомическом отделении Национального института рака диагноз подтвержден согласно классификации Всемирной организации здравоохранения 2008 г. [16]. Для исследования использовали материалы трепанбиопсии, эксцизионной или инцизионной биопсии опухоли.

При иммуногистохимическом исследовании тканевые образцы фиксировали в забуференном 10% формалине (рН 7,4) 24 ч и заливали в парапласт с использованием гистиопротектора Histos-5 (Milestone, Италия). Из блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм на микротоме Microm HM325 (Thermo Scientific, Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимические реакции проводили с использованием мышиных антител против *c-myc* (Clone 9E10, Diagnostic Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя с применением системы детекции EnVision™ FLEX (Dako, Дания). Срезы докрашивались гематоксилином Gill. Препараты изучали и фотографировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse 80i с камерой DS-5SMc/L2 при стандартизованных условиях ($\times 400$, 1280×960 пикселей RGB). Оценку экспрессии *c-myc* проводили по наличию/отсутствию метки в ядрах клеток опухоли.

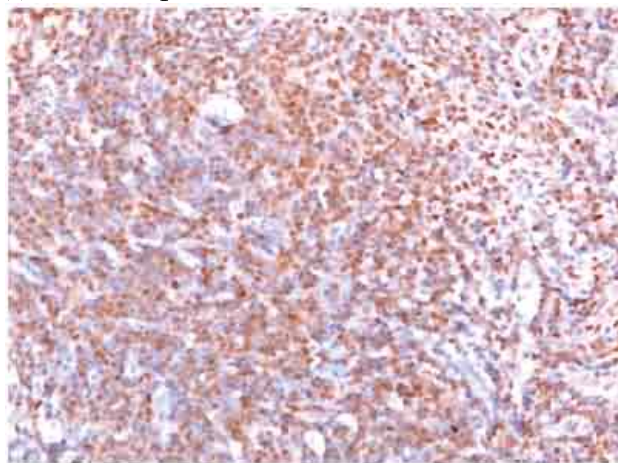
При оценке транслокации $t(8;14)$ *c-MYC* использовали FISH-метод. С каждого образца парафинированной ткани нарезали 4–8 срезов толщиной 3–6 мкм на 2 стекла Thermo Scientific Superfrost® Plus (производство Menzel-Gläser, Германия). Предгибридизационная обработка стекол со срезами парафинированной ткани проводили с помощью Paraffin Pretreatment Reagent Kit I (Abbott Molecular, США). Приготовление для флуоресцентной ДНК-пробы проводили с помощью Vysis LSI IGH/MYC/Vysis CEP 8 Tri-Color Dual Fusion Probe Kit (Abbott Molecular, США). Анализ результатов гибридизации проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager M1 (Zeiss, Германия). При диагностике реципрокной транслокации $t(8;14)(q24;q32)$, которая включает участки генов *IGH* и *MYC*, используя Vysis LSI IGH/MYC/Vysis CEP 8 Tri-Color Dual Fusion Probe Kit (Abbott Molecular, США), проба содержала метки для гена *IGH* (зеленую), *c-MYC* (оранжевую) и для α -сателлитной области 8-й хромосомы (голубая).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

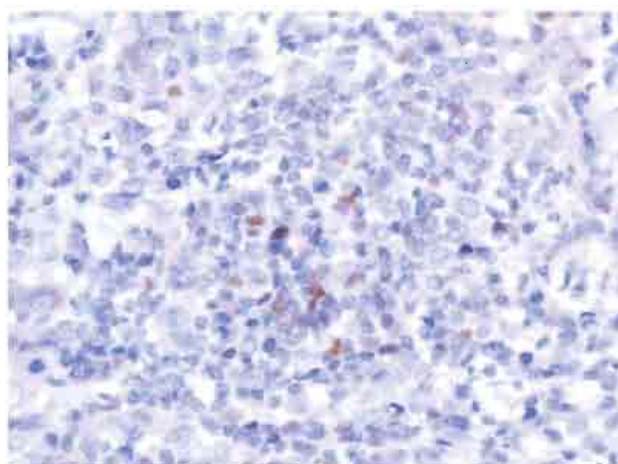
Средний возраст пациентов в обследованной группе составил $30,3 \pm 2,4$ года (21–72 года). Соот-

ношение мужчин и женщин — 1,7:1 (21 женщина, 12 мужчин). При определении экспрессии *c-MYC* и транслокации $t(8;14)/c-MYC$ информативный результат получен у 31 (93,9%) из 33 больных.

У 15 (48,4%) пациентов из 31 отмечена выраженная ядерная экспрессия белка *c-тус* (более 90% опухолевых клеток) и у 1 (3,2%) пациента — средний уровень экспрессии (45,0% опухолевых клеток) (рис. 1). Среди остальных 16 пациентов в 3 (9,7%) случаях зафиксирована незначительная экспрессия данного маркера (от 2 до 10% опухолевых клеток) и в 12 (38,7%) — полное отсутствие экспрессии *c-тус*. Все пациенты исследуемой группы получали ритуксимабсодержащие режимы ПХТ: 10 (32,3%) — ПХТ по схеме R-СНОР и 21 (67,7%) — по схеме R-da-ЕРОСН. Большинство пациентов (25 из 31) получали консолидирующую лучевую терапию на зону средостения в суммарной очаговой дозе 30–36 Гр.



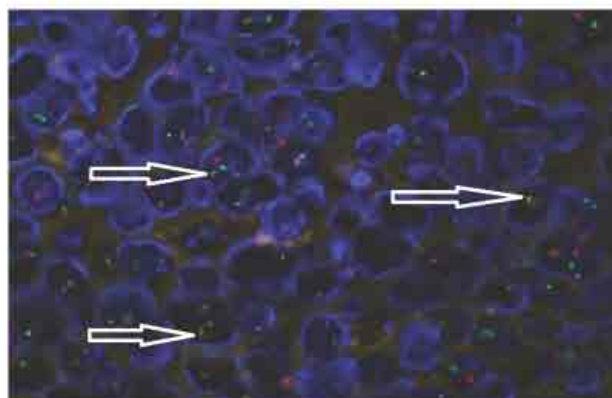
а



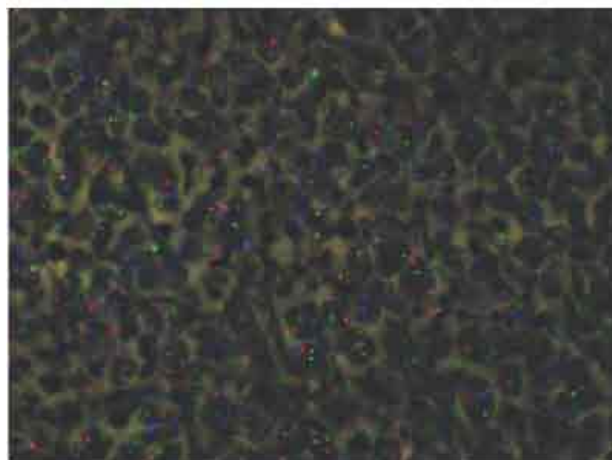
б

Рис. 1. Экспрессия *c-тус* в ядрах более 90% (а) и в ядрах 8% (б) опухолевых клеток. Микрофото, $\times 40$

При проведении FISH-исследования у 4 (26,6%) из 15 больных с положительной экспрессией *c-тус* выявлена *c-MYC* транслокация $t(8;14)$ (рис. 2). В одном случае констатирована перестройка (амплификация) генов *H*-цепей иммуноглобулинов (IgH).



а



б

Рис. 2. Транслокация $t(8;14)$ (указана стрелками) в опухолевых клетках пациентки В (а); образец без транслокации $t(8;14)$ (б). Микрофото, $\times 1000$

Сигналы зеленого цвета (SpGr) — *IGH* (14q32), сигналы красного цвета (SpO) — *c-MYC* (8q24), сигналы голубого цвета (Aqua) — α -satellite CEP 8 (8p11.1–q11.1), сигналы желтые слитые $t(8;14)$ (q24; q34)

Подгруппы с высоким и низким уровнем экспрессии *c-тус* были почти сопоставимы с учетом возрастного состава (средний возраст в группе *c-тус* (+) составил 33,2 года, а в группе *c-тус* (–) — 34,4 года). Среди мужчин повышенная экспрессия маркера отмечена чаще — у 8 (66,7%) из 12 больных. Среди женщин повышенный уровень экспрессии данного маркера зафиксирован лишь у трети из 19 обследуемых — у 7 (36,8%) участниц ($p < 0,05$).

Из общей группы пациентов у 6 (18,2%) диагностировано прогрессирование заболевания в процессе терапии или ранний рецидив заболевания. Только у одного из них интенсивно экспрессировался белок *c-тус* (более 90%) и еще у одного был выявлен средний уровень экспрессии данного маркера (около 45%). Ни в одном из этих случаев не отмечено аномалии гена *c-MYC*. Подавляющее большинство пациентов с выраженной экспрессией *c-тус* продемонстрировали чувствительность к проводимой терапии и находятся под наблюдением ≥ 36 мес. У всех пациентов с реаранжирован-

Клинические данные пациентов с наличием *c-MYC* транслокации t(8;14)

Возраст, лет/пол	Экспрессия <i>c-MYC</i> , %	Режим ПХТ	Лучевая терапия	Длительность наблюдения, мес	Статус заболевания
29/жен	> 95	R-da-EPOCH	+	42	ПО, ремиссия
35/муж	> 95	R-da-EPOCH	-	49	ПО, ремиссия
22/жен	> 95	R-da-EPOCH	+	43	ЧО, ПО
30/муж	> 95	R-CHOP	+	37	ПО, ремиссия
39/жен	99	R-da-EPOCH	-	36	ПО, ремиссия
21/жен	> 95	R-da-EPOCH	-	36	ЧО, ремиссия
45/жен	>95	R-CHOP	+	37	ЧО, ремиссия
38/муж	> 95	R-da-EPOCH	+	36	ПО, ремиссия
20/муж	> 95	R-da-EPOCH	+	38	ПО, ремиссия
33/жен	> 95	R-da-EPOCH	-	40	ПО, ремиссия
23/жен	98	R-da-EPOCH	+	38	ПО, ремиссия
42/жен	> 95	R-da-EPOCH	+	45	ЧО, ремиссия
32/муж	> 95	R-CHOP	+	72	ПО, ремиссия
28/муж	> 95	R-da-EPOCH	+	41	ПО, ремиссия
30/муж	45	R-CHOP	-	5	ПЗ, умер
20/муж	>95	R-da-EPOCH	+	39	ПО, ремиссия

ПО – полный ответ; ЧО – частичный ответ; ПЗ – прогрессирование заболевания.

ным геном *c-MYC* получены полный ответ на терапию и стойкая ремиссия.

Анализ 3-летней выживаемости пациентов в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии *c-myc*, выявляемой иммуногистохимическим методом, показал, что в указанных двух группах она практически не отличалась (87,2% в группе с *c-myc* (-) против 93,3% в группе с *c-myc* (+) статусом ($p > 0,05$) (рис. 3).

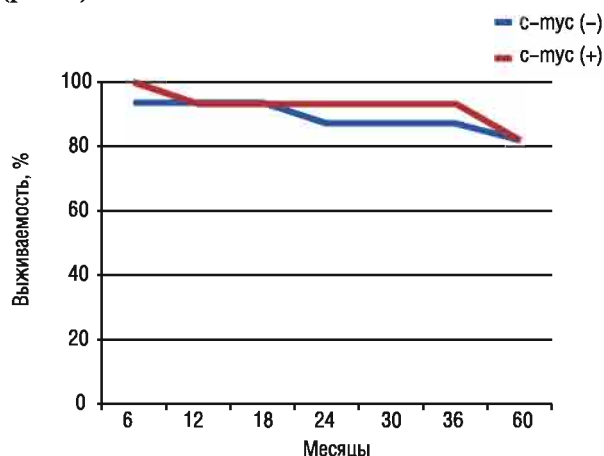


Рис. 3. Общая выживаемость пациентов с ПМВКЛ в зависимости от наличия и отсутствия экспрессии *c-myc*, выявляемой иммуногистохимическим методом

В таблице представлены некоторые данные о связи клинических признаков.

Одна из последних публикаций относительно иммуногистохимической оценки экспрессии *c-myc* у пациентов с ПМВКЛ принадлежит K.D. Li и соавторам [15] из отделения морфологии Университетской клиники штата Юта (США). По их данным, повышенная экспрессия *c-myc* была у 33% пациентов. Соответствующий показатель, по результатам нашего исследования, составил 48,4%. Перестройки гена *c-MYC* ни у кого из пациентов не выявлено. В нашей работе почти у трети больных отмечена транслокация t(8;14). В исследовании американских авторов максимальный уровень экспрессии белка *c-myc* составил 60%. Пациенты из нашей

группы с наличием перестройки гена *c-MYC* имели уровень экспрессии не ниже 90%.

Полученные нами данные в результате проведения молекулярно-генетического FISH-исследования коррелируют с данными A. Scarpa и соавторов [14], которые исследовали 32 образца ткани пациентов с ПМВКЛ и у 6 (18,7%) выявили транслокацию t(8;14), в исследовании нашего центра эта транслокация была у 4 (13,0%) из 31 пациента.

ВЫВОДЫ

Не выявлено различий в течении заболевания у пациентов с разной экспрессией белка *c-myc*, а также при наличии или отсутствии нарушений структуры гена *c-MYC*. При анализе результатов лечения пациентов, получавших разные режимы ПХТ (R-CHOP и R-da-EPOCH), также не прослежено связи с уровнем экспрессии исследуемого маркера. Отметим, что среди пациентов мужского пола повышенная экспрессия *c-myc* отмечена чаще. Клиническое значение этого факта пока остается неизвестным, он не продемонстрировал связи с показателем выживаемости. Приведенные нами результаты следует считать предварительными. Возможно, проведение в будущем исследований в этом направлении прояснит прогностическую роль молекулярно-генетических перестроек гена *c-MYC* при ПМВКЛ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oberley MJ, Rajguru SA, Zhang C, *et al.* Immunohistochemical evaluation of MYC expression in mantle cell lymphoma. *Histopathology* 2013; **63**: 499–508.
2. Savage KJ, Johnson NA, 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**: 3533–7.
3. Wolferer A, Wittner BS, Daniel Irimia, *et al.* MYC regulation of a «poor-prognosis» metastatic cancer cell state. *PNAS* 2010; **107** (8): 3698–703.
4. Campanero MR. Mechanisms involved in Burkitt's lymphoma tumor formation. *Clin Transl Oncol* 2008; **10**: 250.

5. Slack GW, Gascoyne RD. MYC and aggressive B-cell lymphomas. *Adv Anat Pathol* 2011; **18**: 219–28.

6. Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzman 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.

7. Aukema SM, Siebert R, Schuurin Ed. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011; **117**: 2319–31.

8. Tapia G, Lopez R, Munoz-Marmol AM, *et al.* Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology* 2011; **59**: 672–8.

9. Savage KJ, Al-Rajhi N, Voss N, *et al.* Favorable outcome of primary mediastinal large B-cell lymphoma in a single institution: the British Columbia experience. *Ann Oncol* 2006; **17**: 123–30.

10. Rieger M, Osterborg A, Pettengell R, *et al.* MabThera International Trial (MInT). Group Primary mediastinal B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: results of the Mabthera International Trial Group study. *Ann Oncol* 2011; **22** (3): 664–70.

11. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, *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**: 3871–9.

12. Scarpa A, Borgato L, Chilosi M, *et al.* Evidence of c-MYC gene abnormalities in mediastinal large B-cell lymphoma of young adult age. *Blood* 1991; **78**: 780–8.

13. Tsang P, Cesarman E, Chadburn A, *et al.* Molecular characterization of primary mediastinal B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 1996; **148**: 2017–25.

14. Scarpa A, Moore PS, Rigaud G, *et al.* Molecular features of primary mediastinal B-cell lymphoma: involvement of p16INK4A, p53 and c-myc. *Br J Haematol* 1999; **107**: 106–13.

15. Li KD, Miles R, Sheryl R, *et al.* Clinicopathologic evaluation of MYC expression in primary mediastinal (Thymic) large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2015; **143**: 598–604.

16. Gaulard P, Harris N, Pileri S, *et al.* Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC 2008; 250–3.

WHETHER c-MYC IS A PROGNOSTIC FACTOR IN PRIMARY MEDIASTINAL (THYMIC) LARGE B-CELL LYMPHOMA?

I.A. Kriachok, I.A. Stepanishyna, A.N. Grabovoy, S.A. Antoniuk, M.V. Inomistova, O.I. Novosad, T.V. Skrypets, K.O. Ulyanchenko

Summary. *The adverse impact of c-MYC for diffuse large B-cell lymphoma is confirmed by numerous studies. However, primary mediastinal lymphoma sub-options such data. Aim: to investigate the prognostic significance of c-MYC expression and translocations t(8;14) in patients with primary mediastinal large B-cell lymphoma. Materials and methods: immunohistochemical study to determine c-myc expression and FISH-analysys and to identify translocation t(8;14) were done on 33 tissue specimens. Results: in 51.6% of cases was strong and moderate nuclear expression of c-myc. Among these patients in one third of cases was revealed translocation t(8;14) by FISH-study. were identified some differences of marker's expression in women and men. Conclusion: there were no differences in the course of disease in patients with a different c-MYC expression status, as well as the presence or absence of disturbances of c-MYC structure.*

Key Words: primary mediastinal large B-cell lymphoma, c-myc expression, translocation t(8;14), FISH.

Адрес для переписки:

Степанишина Я.А.

03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43

Национальный институт рака

Тел.: (098) 517-77-67

E-mail: yankastep@yandex.ua

Получено: 24.01.2017