

Yulia Y. Chuksina,
MD, researcher;

Viktor V. Yazdovskiy,
MD, professor;

Sergey V. Shevelev,
MD, researcher;

Elena V. Kataeva,
MD, researcher;

Anatolij K. Golenkov,
MD, professor,
SBIH of the Moscow region
"Moscow Regional Research Clinical Institute
named after MF. Vladimirskij"

State Budgetary Healthcare Institution of Moscow Region, Moscow Regional
Research and Clinical Institute M.F.Vladimirskiy's

Key Words: chronic lymphocytic leukemia, flow cytometry, peripheral blood lymphocytes, minimal residual disease

Annotation: *The article presents an analysis of the prognostic significance of tumor cell immunophenotypic markers clone in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia in the dynamics of ongoing immuno-chemotherapy - R-FC (rituximab, fludarabine, cyclophosphamide) in the evaluation of minimal residual disease. Expression of CD25 on B-lymphocytes can be a predictor of the quality of remission, progression or recurrence of the disease in patients with CLL.*

Введение. Для мониторинга лечения больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) в настоящее время исследователи используют классические цитогенетические маркеры (del 17p13, del 11q22 и др.), молекулярно-биологические, связанные с анализом первичной последовательности ДНК (мутационный статус вариабельных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов IgVh), а также суррогатные иммунофенотипические маркеры (экспрессия CD38 и ZAP-70). В литературе приводятся результаты обследования ранее не леченных или больных с рецидивирующим/рефрактерным ХЛЛ, ZAP-70- и CD38-позитивность которых были связаны с более короткой средней выживаемостью без прогрессирования (ВБП) (3, p. 2749; 5, p. 4968).

При данном подходе пациенты с заболеванием низкого риска могут подвергаться терапии хорошо переносимыми комбинациями препаратов, в то время как пациенты с неблагоприятным прогнозом могут получать более интенсивную терапию.

Одним из современных эффективных иммунотерапевтических режимов признан R-FC, включающий ритуксимаб, флюдарабин, циклофосфан, который позволяет добиваться более чем у 40% пациентов эрадикации заболевания (4). Ритуксимаб - химерное МАТ к антигену CD20, который экспрессируется на поверхности клеток-предшественников и зрелых В-лимфоцитов, но не на стволовых клетках, что дает возможность пулу В-клеток после терапии ритуксимабом восстанавливаться за счет нормального гемопоэза (2). В последние годы доказана роль минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов ХЛЛ как независимого прогностического фактора при выживаемости без прогрессирования. МОБ определяет качество ремиссии и показания к дальнейшей тактике лечения (1). При иммунофенотипическом исследовании на этапе диагностики нами была отмечена вариабельная экспрессия рецептора к ИЛ-2 (CD25) на В-лимфоцитах больных ХЛЛ, поэтому изучение возможной прогностической роли данного маркера у больных ХЛЛ в процессе лечения показалось нам актуальным.

Цель исследования: выявление прогностической значимости иммунофенотипических маркеров клеток В-ХЛЛ при оценке клинической эффективности программы R-FC у первичных и резистентных больных ХЛЛ.

Материалы и методы: Иммунофенотипическое исследование проводилось 60 больным ХЛЛ до начала лечения, в процессе и после проведения 6 курсов терапии R-FC. Клиническую эффективность лечения больных ХЛЛ оценивали по критериям NCI-WG (1996) как полную ремиссию (ПР), частичную ремиссию (ЧР), стабилизацию (СБ) и прогрессирование болезни (ПБ). Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови (ПК) на стадии диагностики проводилось методом 4-цветной проточной цитометрии ("Becton Dickinson", США) с использованием МАТ к антигенам CD3, CD19, CD20, CD22, CD5, CD16, CD56, CD23, CD25, HLA-DR, CD38 ("Becton Dickinson", США). Иммунофенотипическая диагностика минимальной остаточной болезни проводилась методом 4-цветной проточной цитометрии по стандартизированному европейско-американскому протоколу (1). Выраженность экспрессии антигенов оценивалась по параметру средней интенсивности флюоресценции (MFI).

Результаты. У 50% пациентов выявлена 2 стадия, у 35% пациентов – 3 стадия, у 15% пациентов – 4 стадия ХЛЛ. Высокое содержание CD20+dim В-лимфоцитов ПК установлено у 99% пациентов в диапазоне от 50 до 96% позитивных клеток.

До начала терапии R-FC больные в дебюте заболевания составили 35%, больные с рецидивом заболевания составили 65%. В процессе проведенного лечения из 60 пациентов СБ отмечалась у 7 пациентов, ПБ зарегистрирована у 7 пациентов, ЧР достигли 15 пациентов после 2-6 курсов, ПР определялась у 31 пациента, из них иммунофенотипическая ремиссия - у 30% к 5 - 6 курсам терапии.

Данные по сопоставлению фенотипических характеристик В-лимфоцитов периферической крови у пациентов ХЛЛ с показателями клинической эффективности терапии R-FC представлены в таблице 1.

Таблица 2. Фенотипическая характеристика В-лимфоцитов ПК у больных ХЛЛ в процессе терапии R-FC

Показатель (% позитивных клеток, MFI)	До лечения	Стабилизация Болезни 3-4 курса	Частичная Ремиссия 2-6 курсов	Полная Ремиссия 4-6 курсов	Прогрессирова- ние болезни 1-4 курса
Число пациентов	n=60	n=7	n=15	n=31	n=7
CD19+	90,2+-4,8	43,7+-10,8	24,7+-9,2*	1,5+-0,6*	86,5+-7,5
CD 20+	76,5+-7,9 dim	25,8+-15,6* dim / bright	8,8+-5,6* dim / bright	0,75+- 0,08*	44,2+-9,6dim
CD5+/CD19+	73, 5+-3,7	51,6+-12,9	16,9+-5,5*	0,5+-0,1*	58,9+-11,8
CD23+/CD19+	60,5+-3,5	33,4+-8,0	10,7+-4,4	0,05+-0,02	39,0+-6,8
CD38+/CD19+	37,4+-4,2	6,9+-3,2	0,94+-0,3	0,17+-0,07	2,5+-1,1
CD25+/CD19+	26,0+-4,4*	27,8+-15,3	11,5+- 4,14*	0,73+- 0,13*	42,6+-8,8*
Рестрикция по Карра-/Lambda- легким цепям иммуноглобулинов	У 100% пациентов	У 100% пациентов	У 46% пациентов	У 12% пациентов	У 100% пациентов

Примечания: * - статистически значимые различия между группами (p<0,05)

Dim / mod – цитометрически выявленное наличие гетерогенной экспрессии CD20 на В-лимфоцитах: 1-я популяция клеток со слабой экспрессией (Dim) и 2-ая популяция с промежуточной или яркой экспрессией (bright).

При сопоставлении иммунологических показателей с критериями клинической эффективности лечения пациентов было выявлено, что при стабилизации заболевания и в процессе достижения частичной ремиссии у пациентов на фоне снижения уровня В-клеток и постепенной элиминации опухолевого клона (CD5+/CD23+/CD19+) отмечалась нормализация содержания CD20+лимфоцитов, а цитометрически детектировалось появление 2-й популяции клеток с промежуточной (mod) или яркой (bright) экспрессией антигенов CD20+, определяемой по параметру MFI, что свидетельствовало о постепенном замещении клеток В-ХЛЛ на В-лимфоциты с «нормальной» мембранной экспрессией этого маркера.

Впоследствии была установлена прямая корреляция с достижением у данных больных частичной или полной клинико-гематологической ремиссии.

При прогрессировании болезни интенсивность экспрессии CD20+ оставалась слабой (dim).

Группа пациентов с ЧР оказалась неоднородной: у 45% пациентов была отмечена практически элиминация опухолевого клона из ПК после 4 - 6 курсов R-FC, у других 55% пациентов сохранялся клон клеток ХЛЛ в среднем на уровне 37,8±6,8%.

Клинико-гематологическая полная ремиссия была достигнута к 5-6 курсам терапии у 31 пациента, из них иммунофенотипическая (МОБ-отрицательная) ремиссия - у 22% пациентов.

В процессе достижения клинико-гематологической ремиссии уровень CD25+/CD19+ клеток достоверно ($p < 0,001$) снижался при достижении больными ЧР и ПР. При ПБ, наоборот, выявлено существенное ($p < 0,005$) увеличение числа CD25+В-лимфоцитов ($46,8 \pm 5,4\%$) по сравнению с уровнем до начала лечения ($23,5 \pm 6,5\%$).

При оценке уровня экспрессии известного прогностического фактора - CD38 на В-лимфоцитах больные были разделены на 2 группы: 1 – я группа - пациенты, у которых уровень CD38+клеток до проведения программы RFC был ниже 20% (диапазон 0,1-18%), во 2-ой группе уровень CD38+клеток был выше 20% (диапазон 20-88%), В группе с низкой экспрессией CD38+ общее число ответивших пациентов (достигших ЧР и ПР) было выше (93%), в группе с высокой экспрессией CD38+ общее число ответивших пациентов оказалось ниже – 73%, но достоверных различий между этими показателями выявлено не было. При достижении ЧР и ПР количество CD38-позитивных клеток достоверно снижалось в обеих группах пациентов и составило $0,52 \pm 0,04\%$ и $4,78 \pm 0,09\%$ соответственно.

Нами обнаружена вариабельная экспрессия CD25+ на В-лимфоцитах у больных ХЛЛ в дебюте заболевания (диапазон от 0,02% до 87% позитивных клеток). Появление на поверхности В-лимфоцитов R для ИЛ-2 (CD25) свидетельствует об усилении процессов их пролиферации, который запускается преимущественно Th2-лимфоцитами или их предшественниками (5).

Больные ХЛЛ были разделены на группы в зависимости от исходного уровня экспрессии CD25+/CD19+, определяемого на этапе иммунофенотипической диагностики: 1 группа – менее 20% позитивных клеток и 2 группа – более 20% позитивных клеток.

Таблица 2. Распределение CD38+и CD25+В-лимфоцитов у больных ХЛЛ до начала терапии RFC

Число пациентов / Показатель N= 60	Дебют, п (%)	Рецидив, п (%)
	21 (35%)	39 (65%)
Содержание CD38+/CD19+ клеток более 20%	9 (44%)	12 (31%)
Содержание CD25+/CD19+ клеток более 20%	8 (37%) *	36 (92%) *
Примечание: * $p = 0,000013$ (по Фишеру); Отношение шансов (OR=19,5)		

До начала терапии RFC высокое (более 20% позитивных клеток) содержание CD25+/CD19+лимфоцитов было отмечено у 92% пациентов, вышедших в рецидив после предшествующих курсов терапии, в то время как у пациентов в дебюте заболевания этот показатель составил 37%.

Проанализировав уровень CD25+В-лимфоцитов больных ХЛЛ в дебюте и рецидиве, было обнаружено, что при наличии **CD25+В-лимфоцитов более 20%** вероятность возникновения рецидива была достоверно выше, чем при отсутствии экспрессии CD25 на В-клетках ($p=0,000013$ по Фишеру; отношение шансов=19,5). Такой зависимости по экспрессии антигена CD38 на В-лимфоцитах установлено не было.

Был проведен анализ зависимости клинического эффекта терапии программы R-FC от исходного значения экспрессии CD25+/CD19+ у пациентов с ХЛЛ. Кроме того, у пациентов, достигших ПР, была проведена оценка МОБ. Данные анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3. Зависимость эффекта терапии R-FC от исходного значения CD25+ В-лимфоцитов у больных ХЛЛ

Показатели эффективности терапии	Число пациентов ХЛЛ, уровень CD25+клеток более 20% (n = 32)	Число пациентов ХЛЛ, уровень CD25+клеток менее 20% (n = 20)
Стабилизация болезни	3 (9,3%)	1 (5,0%)
Прогрессия болезни	5 (15,6%)	0 (0%)
Частичная ремиссия	11 (34,40%)	8 (40,0%)
Полная ремиссия, в том числе:	13 (40,6%)	11 (55,0%)
МОБ-позитивная	10 (77%) *	3 (27,3%) *
МОБ-негативная	3 (13 %) *	8 (72,7%) *
Примечание: * $p = 0,0377$ (по Фишеру); Отношение шансов (OR= 8,9)		

При сравнительной оценке эффективности терапии больных ХЛЛ в зависимости от исходного уровня CD25+ В-лимфоцитов было выявлено, что общее число ответивших на терапию (ЧР+ПР) существенно не отличалось в обеих группах пациентов, но прогрессирование болезни (5 пациентов) было зафиксировано только в группе с высоким исходным уровнем CD25+CD19+лимфоцитов, у пациентов с низким исходным уровнем экспрессии CD25+CD19+ прогрессии заболевания не отмечено.

При оценке МОБ у пациентов с полной клинико-гематологической ремиссией было обнаружено, что при наличии исходного уровня CD25+В-лимфоцитов более 20% вероятность достижения МОБ-негативной ПР была достоверно ниже, а вероятность достижения МОБ-позитивной ПР достоверно выше, чем у больных с отсутствием экспрессии CD25 на В-лимфоцитах ($p = 0,0377$ по Фишеру, отношение шансов 8,9).

Заключение.

1. Цитометрическая оценка интенсивности экспрессии (MFI) антигена CD20 в процессе терапии может служить прогностическим фактором стабилизации или ремиссии

заболевания (постепенного замещения пула опухолевых клеток на В-лимфоциты с нормальной мембранной экспрессией этого маркера).

2. Определен дополнительный иммунологический фактор неблагоприятного прогноза течения заболевания: увеличение экспрессии антигена CD25 на В-клетках может быть показателем прогрессирования и рецидива заболевания у пациентов ХЛЛ.

3. Уровень экспрессии CD25 на В-лимфоцитах при ХЛЛ уже на этапе первичной диагностики может быть маркером высокой вероятности рефрактерности к проводимому режиму терапии и низкого качества ремиссии заболевания;

4. Оценка МОБ позволяет определить качество ремиссии и выбрать индивидуальную тактику терапии.

References:

1. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Bottcher S, Ghia P, Zehnder JL, Lozanski G, Moreno C. et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic: Leukaemia, 2007, 21; 956-964.
2. Boye J, Elter T, Engert A. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab: Ann. Oncol 2003, 14; 520-535.
3. del Poeta G, del Principe MI, Irno Consalvo MA, Maurillo L, Buccisano F, Venditti A. et al. The addition of of rituximab to fludarabine improves clinical outcome in untreated patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukaemia: Cancer, 2005, 104; 2743-2752.
4. Hallek V, Fisher K, Fingerle-Rowson G. et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomized, open-label, phase 3 trial: Lancet, 2010, 376 (9747); 1164-74.
5. Pavlovsky C, Pavlovsky S, Pardo ML, Sapia S, MonrealM, Corrado C. et al. Therapy with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR) for relapsed or untreated progressive chronic lymphocytic leukaemia (CLL): Blood, 2006, 108; 4968.
6. Yarilin AA. Immunology. Moscow, GEOTAR-Media, 2010; 453.