

УДК: 616.155.392.2 – 036.12

DOI: 10.15587/2519-4798.2019.179628

ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ZAP70 ЯК ПРОГНОСТИЧНОГО МАРКЕРА ПЕРЕБІГУ ХРОНІЧНОЇ ЛІМФОЦИТАРНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

О. Я. Виговська, Н. В. Пеленьо, І. Є. Дзісь, Т. О. Городиська, О. І. Бойко, Л. В. Шевченко

Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) - це клінічно і біологічно гетерогенне захворювання. Деякі пацієнти живуть протягом десятиліть без будь-якої терапії, інші гинуть через кілька років після діагностики, незважаючи на застосування різних ліній терапії. Досягнуто значних успіхів у вивченні патогенезу ХЛЛ, проте протягом останніх двох десятиліть відбувався інтенсивний пошук нових біомаркерів, які можуть передбачати прогноз, а також приймати рішення щодо лікувальної тактики. В умовах, коли проведення складних генетичних досліджень є дорівартичним і недоступним для рутинного аналізу, визначення ZAP70 залишається актуальним та досить доступним для прогнозування перебігу ХЛЛ.

Мета дослідження: оцінити прогностичну значимість рівня експресії ZAP70 та його залежності від стадії хвороби у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію.

Матеріали і методи дослідження: під нашим спостереженням знаходилось 68 хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію в різних стадіях захворювання, серед них 24 жінок у віці 40–84 роки (медіана 65 років) та 44 чоловіків у віці 43–84 роки (медіана 63 роки). 51 пацієнту проводилось адекватне лікування. Імунофенотипове дослідження популяції лімфоїдних клітин та ZAP70 проводили за допомогою проточної цитометрії.

Результати дослідження: показники експресії ZAP70 у хворих на різних стадіях хвороби суттєво не відрізнялись. Загальне виживання в групі хворих з експресією ZAP70 < 20 % було суттєво вище у порівнянні з хворими з експресією ZAP70 > 20 %.

Висновки: у хворих на ХЛЛ рівень експресії ZAP70 є стабільним, не залежить від стадії хвороби і не змінюється в процесі прогресії хвороби. Рівень експресії ZAP70 > 20 % клітин є поганим прогностичним маркером перебігу хвороби і свідчить про високий ризик хвороби

Ключові слова: хронічна лімфоцитарна лейкемія, ZAP70, прогностичний маркер, стадія хвороби, лікування, виживання

Copyright © 2019, O. Vyhovska, N. Pelenyo, I. Dzis, T. Horodyska, O. Boyko, L. Schevchenko.
This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

1. Вступ

Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) є моноклональною лімфопроліферативною хворобою, яка характеризується накопиченням дозрілих морфологічно, але несправних функціонально лімфоцитів В у периферичній крові, кістковому мозку, лімфатичних вузлах та селезінці. Не дивлячись на імунофенотипову однорідність ХЛЛ клінічний перебіг хвороби сильно варіює від швидкого прогресування, що вимагає раннього лікування до виживання впродовж десятиліть з мінімальним лікуванням [1]. У зв'язку з цим, в останні роки, крім загально прийнятих (стадія хвороби за Rai чи Binet, час подвоєння лімфоцитів та інші) впроваджуються нові прогностичні чинники [2] – активність тимідиनावої кінази, експресія CD38, ZAP70, рівень β_2 -МГ [3], стан мутації IGHV та цитогенетичні ознаки лейкемічних клітин: del (13q), del (17p), del (11q) [4], мутації NOTCH 1, SF3B1, BIRC 3 та інші [5, 6].

Одним з основних маркерів, що лежать в основі гетерогенності ХЛЛ є статус мутації важких ланцюгів імуноглобулінів IGHV [7]. У залежності від присутності чи відсутності соматичної гіпермутації IGHV генів хворих на ХЛЛ розділено на дві групи. Немутований IGHV асоціюється з високим ризиком і коротким виживанням [8]. Визначення IGHV є

технічно складним і тому були запропоновані інші прогностичні маркери. Одним із них є ZAP70. Встановлено асоціацію між високим рівнем експресії ZAP70 та немутованим IGHV. Згідно даних деяких дослідників висока експресія ZAP70 є сильнішим провісником прогресії хвороби ніж немутований IGHV [2]. Встановлено, що ZAP70 «+» > 20 % випадки прогресують швидше ніж ZAP70 «-» випадки.

Прогностичні індикаторні системи стають все більш складнішими та дороговартісними. Тому, серед всіх можливих прогностичних маркерів доцільно визначити найбільш достовірні та широко доступні методи в практичній медицині.

Мета дослідження – оцінити прогностичну значимість рівня експресії ZAP70 та його залежності від стадії хвороби у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію.

2. Матеріали і методи

Дослідження проводилось на базі консультативної поліклініки та гематологічного відділення ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», м. Львів в період 2012–2018 рр. Під спостереженням знаходилось 68 хворих на ХЛЛ, серед них 24 жінок у віці 40–84 роки (медіана

65 років) та 44 чоловіків у віці 43–84 роки (медіана 63 роки). Діагноз ХЛЛ встановлювали на основі результатів клінічного обстеження, інструментального та лабораторного дослідження, зокрема, виявлення в периферичній крові та кістковому мозку лейкоцитів з характерними імунофенотиповими ознаками: CD5+, CD19+, CD23+.

За результатами оцінки етичних та морально-правових аспектів комісія з біоетики Державної установи «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» вважає роботу такою, що відповідає принципам Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини та відповідних Законів України (протокол № 03/12, від 27.03.2019 р.).

Імунофенотипове дослідження популяції лімфоїдних клітин та ZAP70 проводили за допомогою протокової цитометрії. Статистичний аналіз матеріалу виконали за допомогою пакетів прикладних програм STATISTICA for Windows 6.0 № ліцензії АУУР111В366927А60. Порівняння динаміки параметричних показників в межах групи здійснювали за допомогою непараметричного методу – парного критерію Вілкоксона та подавали їх як медіану (мінімум, максимум, нижній–верхній квартилі). Достовірною різницею вважалось значення $p < 0,05$.

3. Результати дослідження

Під час обстеження пацієнти знаходились на різних стадіях ХЛЛ. В табл. 1 представлений розподіл хворих за стадією хвороби та статтю.

Таблиця 1

Розподіл хворих на ХЛЛ за стадією хвороби та статтю

Стадія Rai	Чоловіки	Жінки
0	9	1
I	5	6
II	12	3
III	7	11
IV	11	3

В табл. 2 представлений рівень експресії ZAP70 у хворих на ХЛЛ в залежності від стадії хвороби.

Таблиця 2

Рівень експресії ZAP70 у хворих на ХЛЛ в залежності від стадії хвороби

Стадія (Rai)	Кількість хворих	Рівень ZAP70	
		медіана	нижній – верхній квартиль
0	10	20,0	5–25
I	11	19,2	15–18
II	16	17,6	14–18
III	18	19,2	12,0–27
IV	14	26,3	17–35

Як видно з даних табл. 2, у більшості хворих рівень експресії ZAP70 вперше визначався на пізніх стадіях захворювання. Медіана експресії ZAP70 у хворих 0–III стадій ХЛЛ не перевищувала 20 % і суттєво не відрізнялась в окремих стадіях. Тільки у більшості хворих з IV стадією хвороби виявлені високі показники експресії ZAP70 – медіана склала 26,3 %. Однак, виявлено значні коливання нижніх і верхніх квартилів, особливо у хворих на III та IV стадії. Різниця в експресії ZAP70 у хворих на III та IV стадії ХЛЛ статистично недостовірною ($p=0,08$). Встановити залежність експресії ZAP70 від стадії хвороби важко. Так, уже на стадії 0 та I у 5-х хворих виявлено високий рівень експресії ZAP70 (25 %, 32 %, 35 %). При ретроспективному аналізі встановлено, що у одного із них протягом року подвоїлось число лімфоцитів, у другого хворого крім ХЛЛ, діагностовано супутню еритремію (комбінація двох хвороб), а інші хворі спостерігаються (час спостереження за цими пацієнтами від 18 до 38 місяців). Одночасно у 20 хворих в стадії III–IV за Rai встановлені рівні експресії ZAP70 < 20 %, тобто прогностично сприятливі. При ретроспективному перегляді встановлено, що у 17 із них захворювання поволі прогресувало (більше 4 років), але визначення рівня ZAP70 раніше не проводилось, визначено лише в III та IV стадії, коли приєдналась анемія чи тромбоцитопенія.

У 51 хворих проводилось адекватне лікування. Ми розподілили хворих на 2 групи в залежності від експресії ZAP70. У 34 хворих показники експресії ZAP70 були < 20 %. Схему RFC (ритуксимаб, флударабін, циклофосфамід) отримали 10 хворих, 10 хворим проводилась схема FC (флударабін, циклофосфамід), 7 хворих отримали RCHOP (ритуксимаб, вінкрестин, доксорубіцин, циклофосфамід, преднізолон) чи RCOP (ритуксимаб, вінкрестин, циклофосфамід, преднізолон), 3 хворих COP (вінкрестин, циклофосфамід, преднізолон), монотерапія ритуксимабом – 1 хворий, та хлорамбуцилом – 3 хворих. Всі пацієнти відповіли на лікування з різною тривалістю покращення чи ремісії. Час спостереження за хворими від 6 до 189 місяців. Сім хворих із цієї групи померли. Двоє із них на 6 та 12 місяців від діагностики ХЛЛ. Причиною смерті у них була важка пневмонія на фоні цитопенії 4 ст після курсової терапії FC. У одного хворого захворювання ускладнилось важкою аутоімунною гемолітичною анемією на схему RFC, що послужило причиною летального наслідку (34 місяців від часу діагностики хвороби). У цього хворого було виявлено делецію del (11q) хромосоми. Ще у одного пацієнта причиною смерті на 45 місяці від діагностики ХЛЛ була перфорація тонкого кишківника. Троє хворих померли на 73, 82 та 132 місяці від встановлення діагнозу ХЛЛ.

Делеція (11q) була виявлена ще у двох хворих при показниках ZAP < 20 %, час спостереження за цими хворими 63 і 134 місяці. Ще у одного хворого виявлено del (11q) та del (17p). Час спостереження за цим хворим 21 місяць.

У 17 хворих показники експресії ZAP70 були $>20\%$. У 2-х хворих лікування проводилось за схемою RFC, 4 хворих отримали схему FC, 4 хворих – RCHOP, 2 хворих – COP і 5 хворих лікувались тільки лейкоераном. Відповіли на лікування 10 хворих з різною тривалістю ремісії чи покращення. 13 хворих померли на 12–69 місяців від діагностики ХЛЛ. У одного із них виявлена del(17p) (помер на 6 місяці від діагностики ХЛЛ, (хворому проводилась терапія за схемою FC). Четверо хворих цієї групи знаходяться під нашим спостереженням (час спостереження 22, 28, 70 та 72 місяці від діагностики ХЛЛ).

На рис. 1 представлені криві загального виживання хворих на ХЛЛ в залежності від рівня експресії ZAP70.

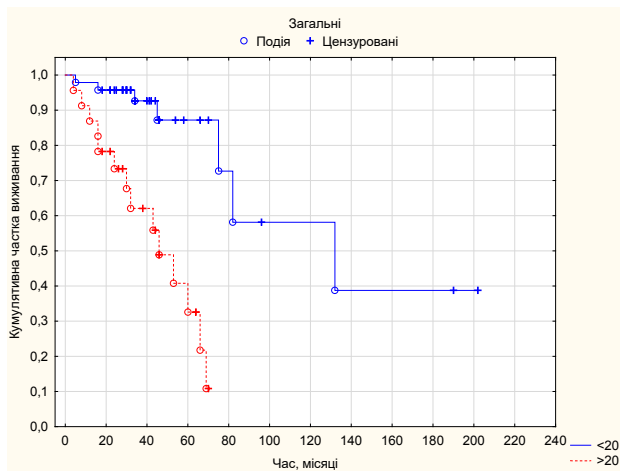


Рис. 1. Загальне виживання хворих на ХЛЛ в залежності від рівня експресії ZAP70

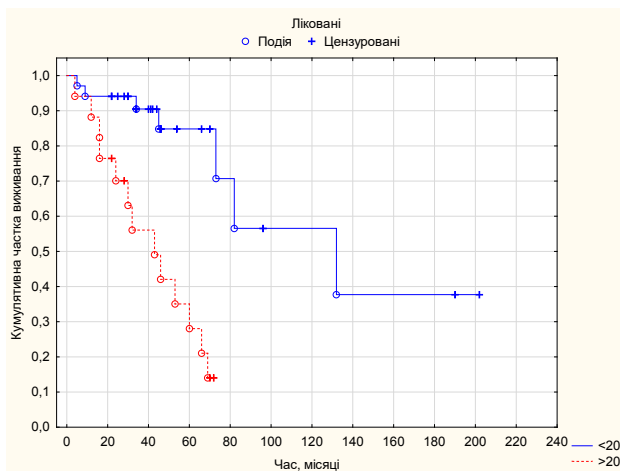


Рис. 2. Загальне виживання хворих на ХЛЛ в залежності від рівня експресії ZAP70 (ліковані хворі)

Як видно з даних рис. 1, загальне виживання хворих на ХЛЛ, у яких експресія ZAP70 була $<20\%$ значно краще ніж у хворих з ZAP70 $>20\%$ (медіана виживання 130 місяців та 45 місяців відповідно). Подібні дані спостерігались і у хворих, які отримували лікування (рис. 2): медіана виживання у хворих з ZAP70 $<20\%$ – 130 місяців, у пацієнтів з ZAP70 $>20\%$ – 40 місяців.

4. Обговорення результатів дослідження

ZAP70 є білковою тирозиною кіназою, кодованою через ген злокалізований в хромосомі 1. В нормі виявляється на клітинах T-NK, не експресується на дозрілих лімфоцитах В [9]. Виявлено кореляцію експресії ZAP70 з експресією CD38, особливо серед хворих без мутації генів IGHV [10]. Однак у деяких хворих спостерігається розбіжність цих показників. В дослідженні [10] проведено аналіз в групі хворих, у яких виявлялась розбіжність в експресії ZAP70 та CD38. Встановлено, що значна більшість хворих виявляла фенотип ZAP70 «+» / CD38 «-», що думку авторів підтверджує більш вагоме клінічне значення експресії ZAP70. Згідно даних [11] ZAP70 є стабільним маркером В-лімфоцитів, на протилежність експресії CD38, яка може змінюватись в процесі хвороби [12], а також β_2 -МГ, рівень якого корелює зі стадією хвороби та розміром пухлинної маси [13, 14]. Хоча, вчені [12] показали можливість зміни експресії ZAP70, під впливом IL2 та мікросередовища. В дослідженні [15] виявлено зростання експресії ZAP70 з від'ємної на додатню у 4 із 33 хворих на ХЛЛ з прогресією хвороби. Одночасно у 2 із 27 хворих в процесі хвороби виявлено зміни експресії ZAP70 з додатньої на від'ємну, що автори пояснюють застосуванням стероїдних гормонів. Отримані нами дані свідчать про відсутність залежності експресії ZAP70 від стадії ХЛЛ. Крім того, виявлення високої експресії ZAP70 у окремих хворих (0 – I), та показників ZAP70 $<20\%$ у частини хворих на пізніх стадіях (III–IV) може свідчити про стабільність експресії ZAP70 у хворих на ХЛЛ.

Ці дані дозволяють підтвердити, що експресія ZAP70 не змінюється при прогресії хвороби залежно від стадії захворювання, а є прогностичним показником важкості перебігу хвороби.

В подальших дослідженнях низки авторів встановлено, що рівень повних ремісій, отриманих після лікування флударабіном як перша лінія терапії, корелював зі ступенем експресії ZAP70 та CD38 [10]. Це стало основою для застосування цих чинників як еventуальних маркерів чутливості до хіміотерапії.

Наші спостереження за хворими, які отримували адекватне лікування, показали, що кумулятивне виживання в групі хворих з експресією ZAP70 $<20\%$ було суттєво вище у порівнянні з хворими з експресією ZAP70 $>20\%$. Тобто, одержані нами дані підтверджують прогностичну цінність експресії ZAP70 і свідчать про стабільність цього показника в процесі хвороби.

Визначення маркерів прогнозу перебігу ХЛЛ є, поза сумнівом, актуальним на етапі сучасної медицини. Протягом останніх 5-ти років розробляються інтегровані прогностичні системи оцінювання, які включають клінічні, біологічні та генетичні характеристики в єдину оцінку ризику, і вони підвищують точність прогнозування для пацієнтів. Використання нових біологічних маркерів є дуже

дорогим і недоступним для рутинного аналізу. В той час, коли ZAP70 залишається простішим, значно дешевшим, але не менш важливим предиктором виживання у хворих на ХЛЛ.

5. Обмеження дослідження

Не дивлячись на обмежену кількість хворих, результати досліджень в динаміці хвороби статистично достовірні. Що дозволяє показник ZAP70 рекомендувати для широкого застосування.

6. Перспективи подальших досліджень

Слід відзначити, що в добу нових медикаментів значення окремих маркерів прогнозу ХЛЛ може змінюватись. У зв'язку з цим запропоновано новий прогностичний індекс, розроблений на основі спостереження за 2475 хворими, які отримували імунохіміотерапію, ібрутиніб, іделалізіб та венетоклакс. Оцінка включала: рівень $\beta 2$ -МГ, рівень ЛДГ,

вміст гемоглобіну та час від початку останньої терапії [16].

Враховуючи стабільність експресії ZAP70 в перебігу ХЛЛ, в перспективі подальших досліджень є актуальним включення показника ZAP70 в нові прогностичні індекси.

7. Висновки

1. Рівень експресії ZAP70 у хворих на ХЛЛ не залежить від стадії хвороби.

2. У хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію рівень експресії ZAP70 є стабільним і не змінюється в процесі прогресії хвороби.

3. Рівень експресії ZAP70 більше 20 % клітин є поганим прогностичним маркером перебігу хвороби і свідчить про високий ризик хвороби.

Конфлікт інтересів

Відсутній конфлікт інтересів.

Література

1. Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H. et. al. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131 (25), 2745–2760. doi: <http://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806398>
2. Truger, M. S., Jeromin, S., Weissmann, S., Dicker, F., Kern, W., Schnittger, S. et. al. (2014). Accumulation of adverse prognostic markers worsens prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 168 (1), 153–156. doi: <http://doi.org/10.1111/bjh.13077>
3. Gribben, J. (2014). Prognostic and predictive factors in chronic lymphocytic leukemia. *EHA Learning Center Hematology Education*, 8 (1), 59–74.
4. Shindiapina, P., Brown, J. R., Danilov, A. V. (2014). A new hope: novel therapeutic approaches to treatment of chronic lymphocytic leukaemia with defects in TP53. *British Journal of Haematology*, 167 (2), 149–161. doi: <http://doi.org/10.1111/bjh.13042>
5. Cortese, D., Sutton, L.-A., Cahill, N., Smedby, K. E., Geisler, C., Gunnarsson, R. et. al. (2013). On the way towards a “CLL prognostic index”: focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia*, 28 (3), 710–713. doi: <http://doi.org/10.1038/leu.2013.333>
6. Gaidano, G., Rossi, D. (2017). The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology*, 2017 (1), 329–337. doi: <http://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.329>
7. Sagatys, E. M., Zhang, L. (2012). Clinical and Laboratory Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Control*, 19 (1), 18–25. doi: <http://doi.org/10.1177/107327481201900103>
8. Berquet, L., Valleron, W., Grgurevic, S., Quelen, C., Zaki, O., Quillet-Mary, A. et. al. (2015). Small nucleolar RNA expression profiles refine the prognostic impact of IGHV mutational status on treatment-free survival in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 172 (5), 819–823. doi: <http://doi.org/10.1111/bjh.13544>
9. Pede, V., Rombout, A., Vermeire, J., Naessens, E., Vanderstraeten, H., Philippé, J., Verhasselt, B. (2013). Expression of ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia activates NF- κ B signalling. *British Journal of Haematology*, 163 (5), 621–630. doi: <http://doi.org/10.1111/bjh.12588>
10. Del Principe, M., Del Poeta, G., Buccisano, F. et. al. (2006). Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 108 (3), 853–861. doi: <http://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4986>
11. Vroblova, V., Smolej, L., Krejsek, J. (2012). Pitfalls and limitations of ZAP-70 detection in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*, 17 (5), 268–274. doi: <http://doi.org/10.1179/1607845412y.0000000015>
12. Deaglio, S., Vaisitti, T., Serra, S., Audrito, V., Bologna, C., D’Arena, G. et. al. (2011). CD38 in Chronic Lymphocytic Leukemia: From Bench to Bedside? *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11 (6), 503–507. doi: <http://doi.org/10.2174/138955711795843338>
13. Späti, B., Child, J. A., Kerruish, S. M., Cooper, E. H. (1980). Behaviour of Serum $\beta 2$ -Microglobulin and Acute Phase Reactant Proteins in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Acta Haematologica*, 64 (2), 79–86. doi: <http://doi.org/10.1159/000207215>
14. Виговська, О. Я. (2017). Визначення рівня $\beta 2$ -мікроглобуліну як прогностичного маркеру перебігу хронічної лімфоцитарної лейкемії. *ScienceRise: Medical Science*, 1 (9), 35–39. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4798.2017.91280>

15. Poulain, S., Benard, C., Daudignon, A., Le Baron, F., Morel, P., Duthilleul, P. (2007). Is ZAP-70 expression stable over time in B chronic lymphocytic leukaemia? *Leukemia & Lymphoma*, 48 (6), 1219–1221. doi: <http://doi.org/10.1080/10428190701286488>
16. Soumerai, J. D., Ni, A., Darif, M., Londhe, A., Xing, G., Mun, Y. et. al. (2019). Prognostic risk score for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia treated with targeted therapies or chemoimmunotherapy: a retrospective, pooled cohort study with external validations. *The Lancet Haematology*, 6 (7), e366–e374. doi: [http://doi.org/10.1016/s2352-3026\(19\)30085-7](http://doi.org/10.1016/s2352-3026(19)30085-7)

Рекомендовано до публікації д-р мед. наук, професор Виговська Я. І.

Received date 16.04.2019

Accepted date 17.09.2019

Published date 30.09.2019

Виговська Ольга Ярославівна, молодший науковий співробітник, лікар-гематолог, відділення гематології з лабораторною групою, ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, Україна, 79044
E-mail: oljavygovska@gmail.com

Пелень Наталія Володимирівна, кандидат медичних наук, старший науковий співробітник, лікар-гематолог, відділення гематології з лабораторною групою, ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, Україна, 79044
E-mail: nataliya.knysh27@gmail.com

Дзись Іван Євгенович, кандидат медичних наук, старший науковий співробітник, лікар-гематолог, відділення гематології з лабораторною групою, ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, Україна, 79044
E-mail: ivandzis@gmail.com

Городиська Тетяна Омелянівна, молодший науковий співробітник, лікар-гематолог, відділення гематології з лабораторною групою, ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, Україна, 79044
E-mail: tetyanazozulya86@gmail.com

Бойко Ольга Ігорівна, кандидат медичних наук, старший науковий співробітник, відділення гематології, ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, Україна, 79044
E-mail: olyaboyko1411@gmail.com

Лариса Володимирівна Шевченко, лікар-гематолог, консультативна поліклініка, ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, Україна, 79044