

Л.М. Ковалевська<sup>1</sup>  
Л.М. Шлапацька<sup>1</sup>  
О.М. Алексик<sup>2</sup>  
Г.Г. Бердова<sup>1</sup>  
І.А. Крячок<sup>2</sup>  
С.П. Сидоренко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

<sup>2</sup>Національний інститут раку МОЗ України, Київ, Україна

**Ключові слова:** лімфома з малих лімфоцитів, прогностичні маркери, РКСβІІ, PKD2, p53, маркер проліферуючих клітин IPO-38.

Сучасним напрямом терапії хворих зі злоякісними новоутвореннями є індивідуалізація лікування, що стимулює пошук молекулярних маркерів, які характеризують прогресування пухлинного процесу та прогноз перебігу захворювання. Діагностування на ранніх стадіях хвороби надає можливість своєчасного застосування оптимальних схем терапії, що сприяє підвищенню якості лікування. Спільні зусилля дослідників і клініцистів спрямовані на пошук клініко-біологічного індексу, який дасть можливість об'єднати індивідуальні клінічні характеристики хворих та молекулярно-біологічні особливості пухлин і встановити, які саме прогностичні фактори корелюють із перебігом захворювання. На сьогодні найбільш поширеною шкалою оцінки перебігу неходжкінських злоякісних лімфом (НХЛ) є міжнародний прогностичний індекс (International prognostic index — ІРІ), який обчислюють після стандартного обстеження хворого [1–3]. В ІРІ входять такі параметри: вік, загальний стан (ECOG), стадія за Ann-Arbor, рівень лактатдегідрогенази (ЛДГ) та кількість екстранодальних уражень (у тому числі селезінки, мигдаликів, кільця Вальдеєра). Прогностичні чинники виживання оцінюють в 0 або 1 бал, які після додавання дають можливість вивести ІРІ і розподілити хворих у такі групи ризику: низького (прогноз сприятливий), низького проміжного, високого проміжного, високого (прогноз несприятливий). Проте ІРІ не враховує низку факторів ризику при НХЛ, значущість яких на сьогодні має безперечне значення. Оскільки ІРІ не може охопити всю клінічну та біологічну гетерогенність НХЛ, впровадження методів імуні- і хіміотерапії потребує пошуку нових маркерів прогресування лімфом та інших прогностичних

## ВИВЧЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ ПРОГНОСТИЧНИХ МАРКЕРІВ ПРИ ЛІМФОМІ З МАЛИХ ЛІМФОЦИТІВ

**Мета:** визначити прогностичне значення експресії РКСβІІ, PKD2, p53 та маркера проліферуючих клітин IPO-38 при лімфомі з малих лімфоцитів (ЛМЛ). **Об'єкт і методи:** ЛМЛ, імуногістохімічні методи дослідження та статистичні методи обробки даних. **Виживаність** хворих оцінювали за методом Каплана — Мейєра. **Результати:** для визначення рівня експресії РКСβІІ, PKD2, p53 та маркера проліферуючих клітин IPO-38 проведено імуногістохімічний аналіз 25 пухлин пацієнтів із гістологічним діагнозом ЛМЛ. Виявлено суттєву варіабельність експресії аутофосфорильованої PKD2 у ЛМЛ. Показано, що рівень експресії аутофосфорильованої PKD2 не може бути використано як незалежний прогностичний маркер при ЛМЛ. Встановлено прогностичну значущість РКСβІІ, p53 та IPO-38 при ЛМЛ. Показано, що у пацієнтів із ЛМЛ із несприятливим перебігом захворювання пухлини були негативними за експресією РКСβІІ та p53-позитивними. Виявлено обернену кореляцію між кількістю IPO-38-позитивних клітин у пухлинах та загальною виживаністю хворих на ЛМЛ. **Висновок:** отримані результати свідчать про перспективність використання дослідженої панелі маркерів для прогнозу перебігу ЛМЛ.

критеріїв [4]. Стратегія пошуку маркерів прогресування та прогнозу перебігу захворювання базується на комплексному вивченні глобального профілю експресії генів, генетичних порушень та функціональних тестів для отримання вичерпного уявлення про молекулярний статус пухлин. Із використанням такого підходу запропоновано комплекс маркерів, який включає CD10, Bcl-6 та IRF4, що характеризує прогноз перебігу НХЛ.

Перспективним є вивчення маркерів, які характеризують сигнальні каскади, що задіяні у виживанні пухлинних клітин, наприклад активації фактора транскрипції NF-κB [5]. У цьому аспекті як потенційні регулятори сигнального каскаду NF-κB, привертають увагу протеїнкіназа СβІІ (РКСβІІ) та кінази родини серин-треонінових протеїнкіназ D (PKD), зокрема PKD2 [6]. У зв'язку з цим наші дослідження були сфокусовані на визначенні прогностичної цінності таких молекулярно-біологічних факторів, як РКСβІІ, PKD2, p53 та маркера проліферуючих клітин IPO-38 при лімфомі з малих лімфоцитів (ЛМЛ). Завданням роботи було дослідити особливості експресії цих маркерів з урахуванням виживаності пацієнтів із ЛМЛ.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні був використаний архівний біопсійний матеріал пухлин 25 хворих на ЛМЛ віком від 15 до 69 років, які проходили лікування в Національному інституті раку МОЗ України. Усі пацієнти були проінформовані про обстеження та дали згоду на використання біопсійного матеріалу в дослідницьких цілях. Для проведення досліджень отримано схвалення комітетів з біоетики Націо-

нального інституту раку МОЗ України та Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Гістологічний діагноз, стадія і ступінь злоякісності (Grade) пухлинного процесу визначали відповідно до класифікації Всесвітньої організації охорони здоров'я на основі стандартних морфологічних, клінічних та імуногістохімічних критеріїв. Гістологічну верифікацію пухлин виконував кандидат медичних наук М.М. Мельник. За клінічним перебігом захворювання всі пацієнти були поділені на дві групи: зі сприятливим ( $n=10$ ) та несприятливим ( $n=15$ ) прогнозом. У хворих групи зі сприятливим прогнозом рецидивів не відмічено протягом 3 років після встановлення діагнозу.

Експресію поверхневих і внутрішньоклітинних маркерів визначали за допомогою імуногістохімічного методу на зрізах біоптатів лімфатичних вузлів хворих, парафінових блоків біоптатів лімфатичних вузлів на мікромомі (MICKON-НМ-430 Zeiss, Німеччина). Отримували зрізи товщиною 2–4 мкм, які переносили на предметні скельця. Зрізи перед імуногістохімічною реакцією депарафінували в ксилолі та відмивали в розчині етилового спирту для видалення ксилолу, після чого промивали водою. Скельця зі зрізами поміщали в цитратний буфер (рН 5,2) і обробляли 2 рази по 5 хв у мікрохвильовій печі для демаскування антигенів. Після обробки зрізів у мікрохвильовій печі проводили їх охолодження до кімнатної температури і промивання фосфатно-буферним розчином (PBS; рН 7,2–7,4) для нормалізації рН. Ендогенну пероксидазу блокували розчином Peroxidase Block (DakoCytomation, Данія) протягом 20 хв. Неспецифічне зв'язування вторинних антитіл блокували 1% розчином альбуміну із сироватки крові бика (БСА) протягом 30 хв і подальшою інкубацією з імуноглобулінами кози в концентрації 20 мкг/мл. Потім на зрізи наносили антитіла в концентрації 10 мкг/мл і проводили інкубацію протягом 1 год при кімнатній температурі у вологій камері. З метою видалення антитіл, які не зв'язалися з антигеном, скельця тричі промивали PBS. Негативним контролем слугували зрізи, які інкубували з імуноглобулінами миші або кроля. Для виявлення зв'язування первинних антитіл з антигеном проводили інкубацію зрізів із системою візуалізації EnVision (DakoCytomation, Данія) протягом 30 хв при кімнатній температурі. Наступним кроком було виявлення активності пероксидази за допомогою розчину 3,3'-діамінобензидину (ДАБ) (DakoCytomation, Данія). Скельця ретельно промивали водою, дофарбовували гематоксиліном, додавали бальзам і накривали покривними скельцями. Реакцію вважали позитивною при виявленні гранулярного забарвлення коричневого кольору в місцях локалізації антигену. Для кількісного аналізу результатів визначали відсоток позитивних клітин. Візуалізацію та документацію результатів проводили за допомогою фотореєстрації даних мікроскопічного

дослідження структури пухлин та імуногістохімічного виявлення експресії досліджуваних антигенів. Мікрофотографування здійснювали за допомогою цифрової фотокамери Leica DM 1000 (на основі камери Canon Power Shot S80) та мікроскопа Leica DC 150 (Німеччина).

Як первинні антитіла використовували моноклональні антитіла проти CD5, CD10, CD19, CD20, CD22, CD27, CD38, CD45, CD54, CD150, CD95, p53, IPO-38 (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України). Крім того, досліджено експресію РКСβII (Santa Cruz Biotechnology, США), PKD2 (Calbiochem, США), аутофосфорильованої (активованої) PKD2 (Upstate, США). Оцінку виживаності хворих проводили за методом Каплана — Мейєра. Прогностичне значення факторів оцінювали за допомогою багатофакторного аналізу (регресійний аналіз Cox) з використанням  $\chi^2$ -тесту із застосуванням програм Statistica 8.0 та Prism 4.0. Результати вважали достовірними при  $p < 0,05$ .

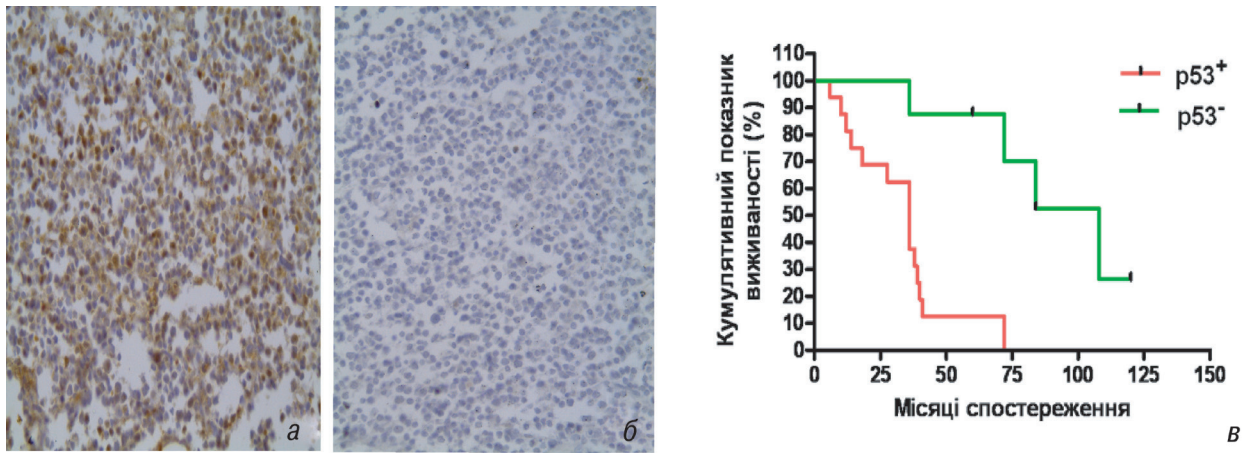
### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За 3-ю та 4-ю класифікаціями пухлин гемопоетичних і лімфоїдних тканин Всесвітньої організації охорони здоров'я (2001, 2008), ЛМЛ відносять до тієї самої нозологічної форми, що і хронічний лімфолейкоз. ЛМЛ морфологічно і за імунофенотипом подібна до хронічного лімфолейкозу, але характеризується відсутністю лімфоїдної інфільтрації кісткового мозку. У всіх досліджених нами випадках абсолютна кількість лімфоцитів у крові хворих на ЛМЛ не досягала  $5 \cdot 10^9/\text{л}$ .

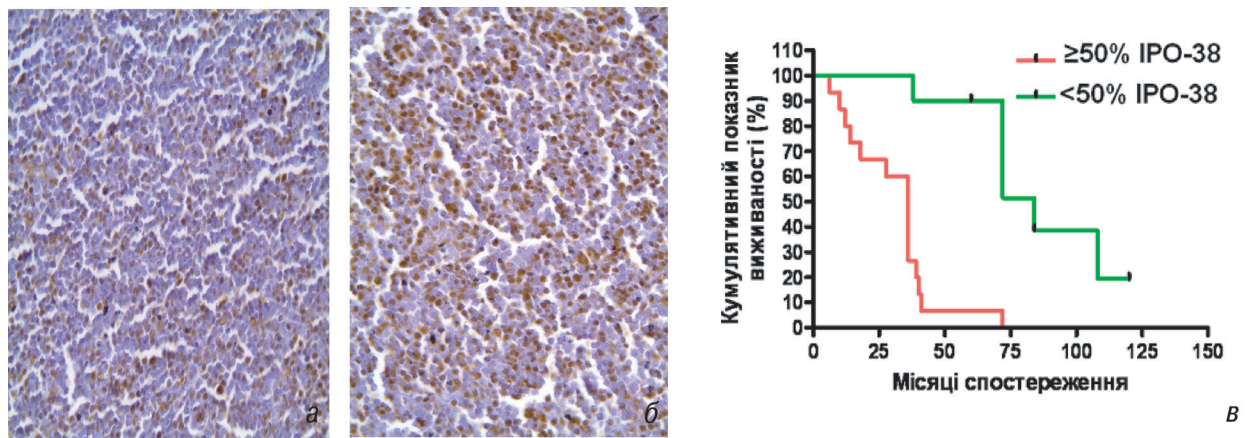
На першому етапі роботи було проведено імуногістохімічне дослідження імунофенотипу пухлинних клітин. У субстратних клітинах при ЛМЛ виявлено високу експресію IgM, однак вона була нижчою, ніж у нормальних В-лімфоцитах, внаслідок чого забарвлення зрізу пухлини при проведенні імуногістохімічної реакції виглядало менш інтенсивним порівняно з нормальним лімфатичним вузлом. Експресія В-клітинного маркера CD20 була добре виражена і визначалася майже на всіх клітинах, тоді як Т-клітинний антиген CD3 був виявлений на незначній кількості клітин (5–10%). Експресія антигену CD5 була характерна для більшості випадків ЛМЛ.

При визначенні експресії маркерів поряд із кількістю позитивних клітин ми враховували також інтенсивність та внутрішньоклітинну локалізацію продукту імуногістохімічної реакції. Інтенсивність реакції ми відзначали від слабкої до сильної. За отриманими даними, пухлинні клітини при ЛМЛ характеризувалися таким імунофенотипом: CD3<sup>-</sup>; CD5<sup>+</sup>; CD10<sup>-</sup>; CD19<sup>+</sup>; CD20<sup>+</sup>; CD22<sup>+</sup>; CD23<sup>+</sup>; CD45<sup>+</sup>; CD54<sup>-/+</sup>.

При дослідженні експресії p53 за допомогою антитіл, які виявляють p53 як дикого, так і мутантного типу, у 87% хворих, що мали несприятливий прогноз, відзначено ядерну локалізацію p53 (рис. 1, а),



**Рис. 1.** Імуногістохімічне виявлення експресії p53 при ЛМЛ: а – p53-позитивні клітини; б – p53-негативні клітини,  $\times 200$ ; в – загальна виживаність хворих на ЛМЛ відповідно до експресії p53 ( $\chi^2 = 9,97$ ;  $p = 0,0002$ )



**Рис. 2.** Імуногістохімічне виявлення IPO-38 при лімфомі з малих лімфоцитів: а – позитивна реакція в 30% клітин; б – позитивна реакція в 75% клітин,  $\times 200$ ; в – загальна виживаність хворих на ЛМЛ відповідно до експресії IPO-38 ( $\chi^2 = 11,4$ ;  $p = 0,0001$ )

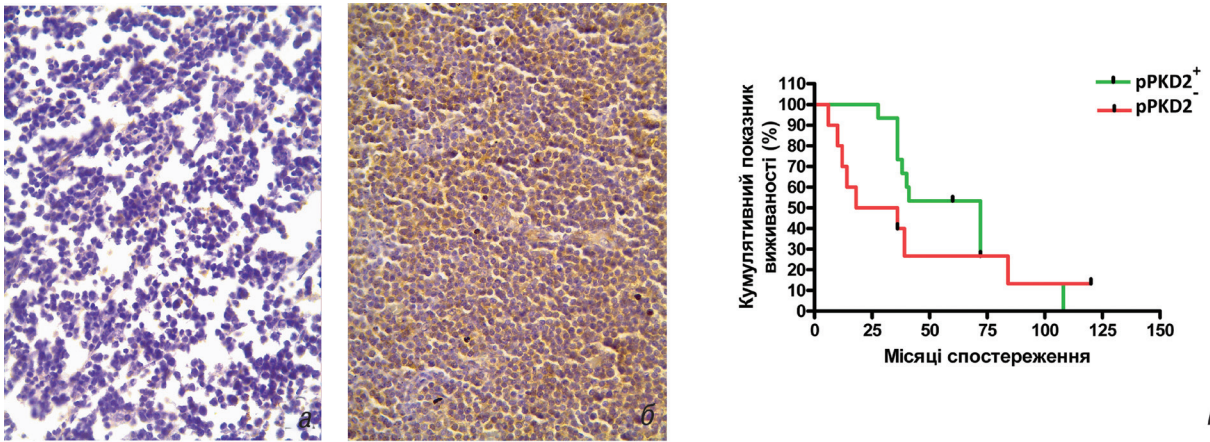
і лише у 2 із 15 пацієнтів відмічено позитивну реакцію одночасно і в ядрі, і в цитоплазмі пухлинних клітин. У 9 із 10 хворих групи зі сприятливим прогнозом пухлини були p53-негативними (рис. 1, б). Показано, що відсутність експресії p53 в пухлині є фактором сприятливого перебігу захворювання. Аналіз виживаності хворих на ЛМЛ дозволяє вважати, що p53 є прогностичним фактором (рис. 1, в), що підтверджує дані доступної літератури [7, 8].

При ЛМЛ кількість клітин, що експресували антиген IPO-38, варіювала від 10 до 90%. В усіх зразках групи хворих зі сприятливим прогнозом IPO-38 був виявлений в менше ніж 50% клітин, тоді як у групі з несприятливим прогнозом відмічено велику частку (50–75%) IPO-38-позитивних клітин (рис. 2, а, б). Встановлено, що високий відсоток IPO-38-позитивних клітин є фактором несприятливого перебігу ЛМЛ (рис. 2, в).

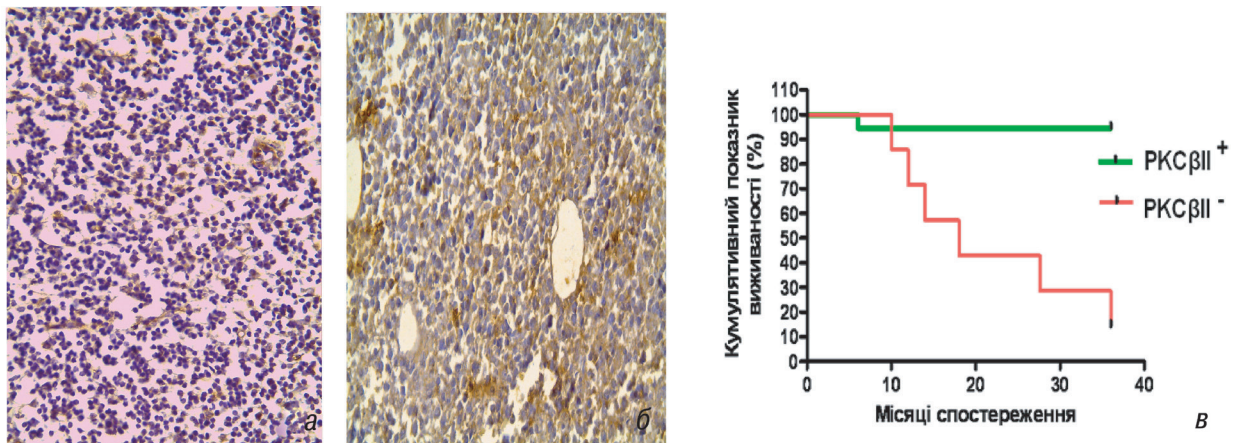
У всіх досліджених випадках ЛМЛ нами виявлено експресію pPKD2, причому лише в цитоплазмі клітин. Водночас відмічено, що випадки ЛМЛ були гетерогенні за рівнем експресії аутофосфорильованої/активованої pPKD2 (pPKD2) у пухлинних клітинах (рис. 3, а, б). Експресія pPKD2 виявлена у 78%

пацієнтів зі сприятливим прогнозом перебігу захворювання і 56% хворих із несприятливим прогнозом. Високу експресію pPKD2 відзначали в групі хворих із достовірно вищою 3-річною виживаністю порівняно з групою пацієнтів, у пухлинних клітинах яких pPKD2 не була фосфорильованою ( $p < 0,002$ ). Проте результати вивчення загальної 3-річної виживаності не дають можливості використання pPKD2 як незалежного прогностичного маркера при ЛМЛ (рис. 3, в).

Продемонстровано, що за рівнем експресії pKCBII у пухлинних клітинах досліджувана група хворих була гетерогенна. Зафіксовано випадки як з відсутністю реакції, так і з високою експресією pKCBII, причому виключно в цитоплазмі клітин. У 50% пацієнтів у групі з несприятливим прогнозом відзначено відсутність експресії pKCBII (рис. 4, а). У решти хворих 30–60% пухлинних клітин експресували pKCBII, причому інтенсивність імуногістохімічної реакції була помірною. У пухлинних клітинах усіх пацієнтів групи зі сприятливим прогнозом перебігу захворювання виявлено експресію pKCBII, але рівень імуногістохімічної реакції варіював від слабкої до сильної (рис. 4, б).



**Рис. 3.** Імуногістохімічне виявлення експресії аутофосфорильованої PKD2: *a* – негативна реакція; *б* – позитивна реакція,  $\times 200$ ; *в* – 3-річна виживаність хворих на ЛМЛ із рPKD2-негативними та рPKD2-позитивними пухлинними клітинами ( $\chi^2 = 0,001$ ;  $p = 0,9$ )



**Рис. 4.** Імуногістохімічне виявлення PKCβII при ЛМЛ: *a* – позитивна реакція в 30% клітин; *б* – позитивна реакція в 75% клітин,  $\times 200$ ; *в* – 3-річна виживаність хворих на ЛМЛ відповідно до експресії PKCβII ( $\chi^2 = 5,45$ ;  $p = 0,02$ )

Одним з етапів обстеження онкогематологічних хворих перед початком лікування є формування прогностичного профілю в межах встановленої нозологічної форми. Досягнення імунології, цитогенетики і молекулярної біології дозволяють виділяти специфічні субтипи лімфом, що відрізняються клінічним перебігом, відповіддю на терапію і прогнозом. Так, залежно від гістологічного варіанта НХЛ прогноз може варіювати від сприятливого (виживаність 10–20 років) до вкрай несприятливого (виживаність < 1 року) [9].

Існує низка підходів до визначення прогнозу перебігу патологічного процесу у хворих на НХЛ, проте вони не завжди достовірно прогнозують тривалість життя пацієнта, оскільки хронічні лімфопроліферативні захворювання відрізняються невизначеністю їх подальшого перебігу після встановлення діагнозу, навіть у межах однієї нозологічної одиниці [10, 11]. Насамперед це стосується хронічного лімфолейкозу, НХЛ різного ступеня злоякісності. Одним із критеріїв, який зберігає свою прогностичну значущість і актуальність, є стадія пухлинного процесу [12].

Новим підходом до класифікації лімфоїдних пухлин, в якій поряд із гістологічною характерис-

тикою пухлинного субстрату зазначено імунофенотипові особливості неопластичних клітин і наявність певних цитогенетичних аномалій, є сучасна класифікація Всесвітньої організації охорони здоров'я (2008) [13].

Визначення вмісту  $\beta_2$ -мікроглобуліну та рівня ЛДГ у крові хворих на неходжкінські злоякісні лімфоми використовуються як головні прогностичні чинники перебігу захворювання згідно з пропозицією Southwest Oncology Group (SWOG). За рівнем  $\beta_2$ -мікроглобуліну оцінюють об'єм пухлинної маси, тоді як проліферативну активність пухлини опосередковано визначають за рівнем ЛДГ [14].

ІРІ не враховує низку факторів ризику при НХЛ, значущість яких нині має безперечне значення. До них належать: підвищена концентрація  $\beta_2$ -мікроглобуліну в сироватці крові, наявність чи відсутність інтоксикаційних В-симптомів, анемія, ступінь ураження кісткового мозку, високий проліферативний індекс злоякісних клітин (наприклад підвищена експресія ядерного антигену Ki-67), наявність несприятливих хромосомних аберацій, експресія генів медикаментозної резистентності (t(14;18); t(3;v); t(8;14)) [15, 16].

Надійні молекулярні маркери прогресування пухлин і прогнозу перебігу захворювання можуть допомогти в ідентифікації нових мішеней для таргетної терапії та визначенні груп пацієнтів для використання альтернативних терапевтичних підходів. Нещодавнє впровадження ДНК-мікроарейних технологій дозволило краще зрозуміти біологію НХЛ і розробити нові діагностичні заходи для вдосконалення наявних моделей прогнозу перебігу хвороби [17, 18]. У той же час існує багато протиріч стосовно важливості окремих запропонованих біологічних маркерів прогресування та прогнозу захворювання і можливостей їх застосування у практичній медицині. Кількісна оцінка активності генів на рівні експресії мРНК за допомогою мікроарейної технології чи полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі потребує використання нативних або заморожених у рідкому азоті зразків пухлин, чим значно обмежує впровадження цих підходів у практику. Альтернативою є напівкількісна імуногістохімічна оцінка експресії генів на рівні білка із застосуванням парафінових зрізів. Крім того, використання імуногістохімічних методів дозволяє виявляти посттрансляційні модифікації білків та їх внутрішньоклітинну локалізацію. Тому стратегія пошуку маркерів прогресування та прогнозу перебігу патологічного процесу базується на комплексному вивченні глобального профілю експресії генів, генетичних порушень і функціональних тестів для створення вичерпного уявлення про молекулярний статус пухлин, що залежать від спільних сигнальних шляхів і вибору окремих або мінімальних комплексів маркерів, виявлення яких можливо на практиці. З використанням такого підходу було запропоновано маркери прогресування НХЛ, що характеризували їхнє клітинне походження та стадію диференціювання [19, 20], залежність пухлинних клітин від В-клітинного рецептора або залежність від імунних реакцій організму [20], а також маркери, пов'язані з мітохондріями, апоптозом і протеасомами [21]. Визнання того, що виживання та/або проліферація злоякісно трансформованих В-клітин залежить від їх взаємодій з іншими клітинами в мікрооточенні, експресії В-клітинного рецептора та антигенної стимуляції сприяло створенню концептуальної основи пошуку потенційних прогностичних маркерів і мішеней для спрямованої терапії при В-клітинних лімфомах. У першу чергу, ці дослідження спрямовані на виявлення сигнальних каскадів, що задіяні в регуляції процесів проліферації, виживання клітин та їхньої запрограмованої смерті. По-друге, виникає необхідність в ідентифікації ключових молекул (ферментів та адапторних білків), які забезпечують контроль ініціації та термінації сигнальних каскадів, а також баланс між сигнальними шляхами, що регулюють програми диференціювання та частку як нормальних, так і пухлинних клітин [22].

При хронічному лімфолейкозі мутації р53 пов'язують із негативним прогнозом перебігу захво-

рювання і поганою відповіддю на хіміотерапію [23]. Водночас прогностична значущість експресії р53 при ЛМЛ не була досліджена. Нами продемонстровано, що у пухлинах групи хворих на ЛМЛ зі сприятливим прогнозом перебігу злоякісного процесу у 90% випадків не відзначали р53-позитивної реакції. При цьому р53 виявлений в усіх зразках пацієнтів у групі з несприятливим прогнозом перебігу захворювання. Виявлення маркерів проліферації, таких як Ki-67, PCNA та IPO-38, широко використовується при визначенні проліферативного індексу для подальшого прогнозування перебігу хвороби різних локалізацій [15, 24]. За експресією IPO-38 всі досліджені випадки ЛМЛ були поділені на дві групи: 1 – кількість IPO-38-позитивних клітин < 50% і 2 – кількість IPO-38-позитивних клітин > 50%. Високий рівень експресії IPO-38 у пухлинних клітинах вказує на високу проліферативну активність пухлинних клітин і може бути фактором несприятливого перебігу захворювання. Дійсно, нами виявлено, що в групі пацієнтів із ЛМЛ із несприятливим прогнозом перебігу пухлинного процесу кількість IPO-38-позитивних клітин становила > 50%.

Нещодавно було визнано, що конститутивна активність NF-κB, яка сприяє виживанню та безперервній проліферації В-лімфоцитів, є критичним патогенетичним фактором при лімфомах [25]. При різних гістологічних варіантах лімфом виявлено активуючі порушення як дистальних, так і проксимальних ланок сигнального каскаду NF-κB [26, 27]. Крім того, широкий спектр аутокринних і паракринних факторів спричиняє активацію NF-κB у пухлинних клітинах. Однак роль активації NF-κB при деяких формах лімфом, ключові регулятори, а також механізми активації та термінації цього сигнального каскаду в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах ще повністю не розкриті. У цьому аспекті як потенційні регулятори сигнального каскаду NF-κB привертають увагу протеїнкінази РКСβII та кінази родини PKD, зокрема PKD2.

Одним із маркерів при дифузних В-великоклітинних лімфомах, запропонованим для оцінки перебігу захворювання, є РКСβII. На сьогодні думки авторів щодо РКСβII як прогностичного маркера при В-великоклітинних лімфомах розходяться. У всіх дослідженнях позитивна реакція на РКСβII не перевищувала 40% випадків [28]. У низці випадків відмічена позитивна кореляція експресії РКСβII з гіршою 5-річною виживаністю з низьким ІРІ-ризиком [29–32]. Проте в інших публікаціях не виявлено кореляції експресії РКСβII із загальною виживаністю хворих [33].

У роботах S.T. Abrams і співавторів [34] виявлено, що при ХЛЛ характерна варіабельність рівня експресії РКСβII, яка становить від 0,06 до 1,12 при середньому 0,55, що вказує на гетерогенність групи хронічного лімфолейкозу. Однак при найнижчому рівні експресії РКСβII клінічний перебіг захворювання був агресивним.

Аналіз прогнозу перебігу хвороби показав, що у пацієнтів із ЛМЛ, пухлинні клітини яких експресують РКСβII, як 3-річна, так і загальна виживаність була достовірно вищою, ніж у хворих із РКСβII-негативними пухлинними клітинами, що корелює з даними літератури [34].

Активність кінази родини PKD також пов'язана з регуляцією сигнальних каскадів при диференціюванні В-лімфоцитів. Порушення в ключових сигнальних шляхах призводить до активації проліферації в пухлинних клітинах. PKD задіяна в передачі сигналу від В-клітинного рецептора та бере участь у NF-κB-сигнальному каскаді [35–38]. Нами показано кореляцію між експресією аутофосфорильованої PKD2 та 3-річною виживаністю хворих. Також відмічено кореляцію із загальною виживаністю, але вона не була статистично достовірною.

Оскільки маркери прогнозу перебігу пухлинної хвороби є потенційними мішенями для таргетної та індивідуалізованої терапії при злоякісних новоутвореннях, виявлення нових потенційних молекулярних маркерів не тільки має прогностичну цінність, але й дозволить запропонувати нові підходи зі зміщення балансу між процесами проліферації, диференціювання та апоптозу у бік елімінації клітин з небажаними мутаціями та генними транслокаціями. Таким чином, ключові компоненти сигнальних каскадів, через які може проходити перемикання біологічних програм у пухлинних клітинах, є перспективними мішенями для таргетної терапії при злоякісних новоутвореннях. Додаткове виявлення та аналіз експресії таких антигенів, як p53, IPO-38, кінази РКСβII та аутофосфорильованої PKD2, може сприяти прогнозуванню перебігу захворювання.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; **329** (14): 987–94.
2. Lee WJ, Won KH, Won CH, *et al.* Secondary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma has a higher International Prognostic Index score and worse prognosis than diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *Acta Derm Venereol* 2015; **109** (10): 235–41.
3. Damaj G, Ivanoff S, Coso D, *et al.* Concomitant systemic and central nervous system non-Hodgkin's lymphoma: the role of consolidation in terms of high dose therapy and autologous stem cell transplantation. A 60-case retrospective study from LYSA and the LOC network. *Haematologica* 2015; **100** (9): 1199–206.
4. Hoffmann C, Tiemann M, Schrader C, *et al.* AIDS-related B-cell lymphoma (ARL): correlation of prognosis with differentiation profiles assessed by immunophenotyping. *Blood* 2005; **106** (5): 1762–9.
5. Jing H, Lee S. NF-κappaB in cellular senescence and cancer treatment. *Mol Cells* 2014; **37** (3): 189–95.
6. Guha S, Tanasanvimon S, Sinnott-Smith J, *et al.* Role of protein kinase D signaling in pancreatic cancer. *Biochem Pharmacol* 2010; **80** (12): 1946–54.
7. Sellmann L, Carpinteiro A, Nuckel H, *et al.* p53 protein expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012; **53** (7): 1282–8.
8. Seo JY, Jin EH, Jo HJ, *et al.* Clinicopathologic and molecular features associated with patient age in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015; **21** (22): 6905–13.

9. Gascoyne RD, Rosenwald A, Poppema S, *et al.* Prognostic biomarkers in malignant lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2010; **51** (Suppl 1): 11–19.

10. Sehn LH. Optimal use of prognostic factors in non-Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 295–302.

11. Salles G, de Jong D, Xie W, *et al.* Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood* 2011; **117** (26): 7070–8.

12. Gleissner B, Kuppers R, Siebert R, *et al.* Report of a workshop on malignant lymphoma: a review of molecular and clinical risk profiling. *Br J Haematol* 2008; **142** (2): 166–78.

13. Глузман ДФ, Скляренко ЛМ, Надгорная ВА. Диагностическая онкогематология. Киев: ДИА, 2011. 256 с.

14. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005; **90** (3): 391–9.

15. Schaffel R, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, *et al.* Prognostic impact of proliferative index determined by quantitative image analysis and the International Prognostic Index in patients with mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 2010; **21** (1): 133–9.

16. Leich E, Zamo A, Horn H, *et al.* MicroRNA profiles of t(14;18)-negative follicular lymphoma support a late germinal center B-cell phenotype. *Blood* 2011; **118** (20): 5550–8.

17. Takahashi H, Usui Y, Ueda S, *et al.* Genome-wide analysis of ocular adnexal lymphoproliferative disorders using high-resolution single nucleotide polymorphism array. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; **56** (6): 4156–65.

18. Song, JY, Yu J, Chan WC. Gene expression profiling in non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Treat Res* 2015; **165**: 97–123.

19. Kuppers R, Dührsen U, Hansmann ML. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of composite lymphomas. *Lancet Oncol* 2014; **15** (10): e435–46.

20. Kuppers R. Genomic imbalances in Hodgkin lymphoma. *Blood* 2010; **116** (3): 309–11.

21. Erter J, Alinari L, Darabi K, *et al.* New targets of therapy in T-cell lymphomas. *Curr Drug Targets* 2010; **11** (4): 482–93.

22. Irish JM, Myklebust JH, Alizadeh AA, *et al.* B-cell signaling networks reveal a negative prognostic human lymphoma cell subset that emerges during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107** (29): 12747–54.

23. Hassab AH, Elbordiny MM, Elghandour AH, *et al.* The study of different chromosomal aberrations, CD38 and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia patients. *Egypt J Immunol* 2010; **18** (2): 77–93.

24. Franchi G, Manzoni MF. Cytological Ki-67 in pancreatic endocrine tumors: a new «must»? *Gland Surg* 2014; **3** (4): 219–21.

25. Gasparini C, Celeghini C, Monasta L, *et al.* NF-κappaB pathways in hematological malignancies. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71** (11): 2083–102.

26. Lim KH, Yang Y, Staudt LM. Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF-κappaB in lymphoid malignancies. *Immunol Rev* 2012; **246** (1): 359–78.

27. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-κappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2** (6): a001019.

28. Friedberg JW. New strategies in diffuse large B-cell lymphoma: translating findings from gene expression analyses into clinical practice. *Clin Cancer Res* 2011; **17** (19): 6112–7.

29. Shipp M. New concepts in treatment approaches and prognostic factors in aggressive NHL. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006; **4** (2): 107–9.

30. Shipp MA. Molecular signatures define new rational treatment targets in large B-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; **1** (1): 265–9.

31. Espinosa A, Zock J, Benavente Y, *et al.* Occupational exposure to immunologically active agents and risk for lymphoma: the European Epilymph case-control study. *Cancer Epidemiol* 2013; **37** (4): 378–84.

32. Bosch R, Dieguez-Gonzalez R, Moreno MJ, *et al.* Focal adhesion protein expression in human diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* 2014; **65** (1): 119–31.

33. Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ, *et al.* Building an outcome predictor model for diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2004; **164** (2): 613–22.

34. Abrams ST, Lakum T, Lin K, *et al.* B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase C $\beta$ 2. *Blood* 2007; **109** (3): 1193–201.

35. Ковалевська ЛМ, Михалап СВ, Шлапацька ЛМ та ін. Протеїнкіназа D2 (PKD2) бере участь в TCR-опосередкованому каскаді активації ядерного фактора транскрипції NF- $\kappa$ B. *Укр журн гематол трансфузіол* 2008; **8** (4): 15–19.

36. LaValle CR, George KM, Sharlow ER, *et al.* Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1806** (2): 183–92.

37. Fu Y, Rubin CS. Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO Rep* 2011; **12** (8): 785–96.

38. Михалап СВ, Шабел'ник М, Сидоренко С. Protein kinases of PKD family as a potential object of translational research in oncology. *Ukr Biokhim Zh* 1999; **82** (4): 18–32 (in Ukrainian).

### STUDY OF POTENTIAL PROGNOSTIC MARKERS IN SMALL LYMPHOCYTIC LYMPHOMA

L.M. Kovalevska, L.M. Shlapatska, O.M. Alekseyk, H.H. Berdova, I.A. Kriachok, S.P. Sidorenko

**Summary.** *Aim of this study was to estimate prognostic value of PKC $\beta$ II, PKD2, p53, and IPO-38 expression*

*in small lymphocytic lymphoma (SLL). Objects and methods: in our work we used immunohistochemistry analysis of PKC $\beta$ II, PKD2, p53, and IPO-38 expression levels in 25 cases of SLL with statistical analysis of obtained data, including Kaplan — Meier survival analysis. Results: we revealed variability in the expression of autophosphorylated PKD2 in SLL. The level of expression autophosphorylated PKD2 can not be used alone as an independent prognostic marker in SLL. At the same time we showed prognostic significance of PKC $\beta$ II, p53 and IPO-38 expression in SLL. In SLL patients with unfavorable course of the disease, tumors were PKC $\beta$ II negative and positive for p53 expression. The number of IPO-38 positive cells inversely correlated with life expectancy of patients. Conclusion: our results showed that tested panel of markers has a prognostic potential for SLL.*

**Key Words:** small lymphocytic lymphoma, prognostic markers, PKC $\beta$ II, PKD2, p53, marker of proliferating cells IPO-38.

#### Адреса для листування:

Ковалевська Л.М.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: krey1@yahoo.com

Одержано: 28.11.2015