

Н.А. Голярник,
І.В. Абраменко,
З.В. Мартина,
І.С. Дягіль,
А.А. Чумак,
Д.А. Базика

Національний науковий центр
радіаційної медицини
НАМН України, Київ, Україна

Ключові слова: хронічна лімфо-
цитарна лейкемія, експресія
антигену CD38, мутаційний
статус IGHV генів

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.03.175>

ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ АНТИГЕНУ CD38 ПРИ ХРОНІЧНІЙ ЛІМФОЦИТАРНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ: ДОСВІД РОБОТИ ВІДДІЛУ КЛІНІЧНОЇ ІМУНОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОГО НАУКОВОГО ЦЕНТРУ РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ

Експресія антигену CD38 є маркером негативного прогнозу перебігу хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ). Залишається невизначеним питання, який граничний рівень експресії антигену CD38 на В-клітинах вважати прогностично значущим. **Мета:** оцінити оптимальний рівень граничної експресії антигену CD38 у первинних хворих на ХЛЛ, у яких діагноз встановлено вперше, для оцінки прогнозу перебігу хвороби та асоціації з мутаційним статусом генів варіабельних ділянок важких ланцюгів імуноглобулінів (IGHV генів). **Об'єкт і методи:** для дослідження використані зразки периферичної крові 106 первинних хворих на ХЛЛ, яким раніше не проводили лікування. Проведено імунофенотипування методом протокової цитометрії та визначення мутаційного статусу IGHV генів методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним секвенуванням. Оцінювали тривалість періоду до початку терапії, безрецидивного періоду та загальної виживаності методом Каплана–Мейєра та за допомогою регресії Кокса. **Результати:** для оцінки прогнозу перебігу хвороби доцільно вибирати в якості граничного рівня експресію антигену CD38 $\geq 20\%$ або $\geq 30\%$. Граничний рівень експресії антигену CD38 $\geq 7\%$ не має прогностичного значення. Підгрупи хворих з рівнем експресії антигену CD38 $< 5\%$ або 5–30% не розрізняються за прогнозом перебігу захворювання. Специфічність орієнтовної оцінки мутаційного статусу IGHV генів за показниками експресії антигену CD38 низька, оскільки майже в половині випадків ХЛЛ з немутованими IGHV генів рівень експресії не відрізнявся від випадків ХЛЛ з мутованими IGHV генами. **Висновки:** підтверджена доцільність визначення експресії антигену CD38 в якості маркера прогнозу перебігу ХЛЛ на початкових стадіях захворювання (A0–A1), передусім для оцінки тривалості загальної виживаності.

Імунофенотипування лейкоцитних клітин при хронічній лімфоцитарній лейкемії (ХЛЛ) має велике значення як для діагностики захворювання, так і для виявлення маркерів, асоційованих з прогностично несприятливими ознаками перебігу захворювання. Лейкоцитні клітини ХЛЛ характеризуються коекспресією антигенів CD19, CD5 і CD23; зниженою, порівняно з іншими лімфо-проліферативними захворюваннями, експресією В-клітинних антигенів маркерів (CD20, CD79b, CD81, поверхневих імуноглобулінів), відсутністю експресії CD79a, FMC7; високим рівнем експресії CD43, CD200; негативною реакцією з моноклональними антитілами (мкАТ) проти антигенів CD10, CD103, CD123, а також Т-клітинних (крім

CD5) та мієлоїдних маркерів [1]. Значна увага приділяється визначенню експресії антигену CD38.

CD38 відноситься до класу гідролаз, які каталізують деградацію коферментів NAD та NADP (NAD фосфат) з утворенням циклічної аденозиндифосфатрібози та нікотинаміді. На поверхні В-клітин при ХЛЛ CD38 знаходиться у складі комплексу з антигенами CD19, CD81, рецептором хемокінів CXCR4, молекулами адгезії (CD49a). Зв'язування антигену CD38 призводить до активації кіназ ZAP-70, ERR1/2 з наступною активацією внутрішньоклітинних шляхів передачі сигналу та підвищенням рівня проліферації клітин. Крім ферментативної функції, CD38 взаємодіє з гіалуроновою кислотою та антигеном CD31 (білок

ендотелію судин), що зумовлює його участь в процесах адгезії В-клітин з мікрооточенням та отримання додаткових стимулів для виживання і проліферації [2].

В одній з першій робіт, присвячених прогностичному значенню експресії антигену CD38 у хворих на ХЛЛ, при співставленні мутаційного статусу генів варіабельних ділянок важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGHV* генів) та імунофенотипових ознак 37 хворих встановлено, що всі хворі з мутуваними генами *IGHV* мали рівень експресії CD38 < 30%, а 17 із 20 хворих з немутуваними генами *IGHV* — вище за 30%. Крім того, хворі з високим рівнем експресії CD38, так само, як і з немутуваними *IGHV* генами, мали гіршу відповідь на лікування та більш короткий період загальної виживаності [3]. В подальшому, ці дані були підтверджені та уточнені. Згідно рекомендаціям Національної комплексної онкологічної мережі США (NCCN), Міжнародної робочої групи з питань ХЛЛ (iwCLL) та Європейської асоціації медичної онкології (ESMO) визначення експресії антигену CD38 в якості маркера негативного прогнозу перебігу ХЛЛ є доцільним [4–6].

Залишається невизначеним питання, який граничний рівень експресії антигену CD38 на В-клітинах вважати прогностично значущим. Більшість авторів використовують рівень експресії $\geq 30\%$ як маркер негативного прогнозу. Інші автори пропонують використовувати в якості граничного рівень експресії 20% [7]. За даними [8], 7% CD38-позитивних клітин дозволяють оцінити прогноз перебігу ХЛЛ. Іншими дослідниками проведена оцінка кількості CD38-позитивних клітин (до 5%; 5–30%; $\geq 30\%$) та характеру експресії за піками на гістограмі (унімодальна негативна; бімодальна з низькою експресією більш ніж на 50% клітин; бімодальна з високою експресією більш ніж на 50% клітин; унімодальна з низьким рівнем експресії та унімодальна з високим рівнем експресії) [9]. Вони прийшли до висновку, що зменшення загальної виживаності хворих є характерним для експресії антигену CD38 на $\geq 30\%$ клітин, а також за бімодальної і унімодальної експресії з високою CD38-позитивністю. Однак, пацієнти з проміжними показниками (кількість CD38-позитивних клітин в межах 5–30%) або унімодальною слабкою експресією антигену також мали гірші показники загальної виживаності порівняно з хворими, у яких експресія антигену CD38 визначена менш ніж на 5% лейкоцитів клітин.

Метою нашого дослідження було оцінити оптимальний рівень граничної експресії антигену CD38 у первинних хворих на ХЛЛ, у яких діагноз встановлено вперше, для оцінки прогнозу перебігу хвороби та асоціації з мутаційним статусом генів варіабельних ділянок важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGHV* генів).

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проаналізовано дані імунофенотипування зразків периферичної крові 106 первинних хворих на ХЛЛ (81 чоловік та 25 жінок, середній вік склав $57,3 \pm 1,7$ років, медіана — 57,5 року). Хворі перебували на лікуванні в Державній установі “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України” (ННЦРМ) та дали дозвіл на використання даних обстеження в наукових цілях. Дослідження схвалено комітетом з медичної етики ННЦРМ. Стадію захворювання визначали за класифікаціями Rai та ін. [10, 11] та Binet та ін. [12].

Визначення фенотипу лейкоцитів клітин проводили за допомогою прямого імунофлуоресцентного тесту з використанням набору мкАТ виробництва Becton Dickinson (США) у комбінаціях: CD45/CD14; CD10/CD19; CD20/CD5; CD22/CD3; CD7/CD33; HLA-DR/CD13; CD4/CD8; CD19/CD23; CD25/CD38; CD3/CD16+56, які були кон'юговані з флуорохромами: FITC (флуоресцеїн-ізоціанат) та PE (фікоеритрин). Дослідження проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Визначення мутаційного статусу *IGHV* генів проводили, як описано раніше [13].

Статистичну оцінку отриманих результатів проводили в програмі SPSS 17.01 (США). Оцінювали тривалість періоду до початку терапії (time-to-treatment, TTT), безрецидивного періоду (progression-free survival, PFS) та загальну виживаність (overall survival, OS) за допомогою методів Каплана–Мейєра та регресії Кокса.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всі обстежені хворі розподілялись за стадіями ХЛЛ наступним чином:

- за класифікацією Binet: стадія А — 57 пацієнтів, стадія В — 37, стадія С — 12;
- за класифікацією Rai: стадія 0 — 11 пацієнтів, стадія I — 48, стадія II — 34, II — 9, стадія IV — 4.

Кількість CD38-позитивних клітин коливалась в межах від 0,08 до 88,1% і становила в середньому $23,6 \pm 2,5\%$ (медіана 8,8%). Спостерігали залежність між кількістю CD38-позитивних клітин та стадією захворювання. Така залежність була більш чіткою за граничного рівня CD38-позитивних клітин $\geq 20\%$ порівняно з граничним рівнем $\geq 30\%$ (табл. 1). При виборі граничного рівня 7% не спостерігали значущих розбіжностей. Суттєвих розбіжностей в розподілі кількості CD38-позитивних клітин за критеріями Boonstra та співавт. [9] також не виявлено ($p = 0,131$ при аналізі стадій за Binet та $p = 0,167$ при аналізі стадій за Rai).

Лейкемічні клітини 45 хворих мали мутовані (М), а 61 хворого — немутовані (UM) гени *IGHV*. У перших з них (М *IGHV*) кількість CD38-позитивних клітин

Таблиця 1

Залежність між кількістю CD38-позитивних клітин та стадією захворювання в групі обстежених первинних хворих на хронічну лімфоцитарну лейкомею

Стадія ХЛЛ	Кількість CD38-позитивних клітин			
	M ± m	Відсоток позитивних випадків за граничного рівня:		
		≥ 30%	≥ 20%	≥ 7%
за Binet				
A	18,0 ± 2,9	28,1	28,1	49,1
B	27,6 ± 4,8	35,1	34,9	59,5
C	38,2 ± 6,8	66,7	75,3	83,3
Вірогідність розбіжностей	0,023	0,039	0,008	0,06
за Rai				
0	16,6 ± 8,5	18,2	18,2	27,3
I	20,1 ± 3,2	33,3	33,3	56,2
II	24,5 ± 4,8	29,4	38,2	55,9
III	32,8 ± 8,3	55,6	66,7	77,8
IV	56,6 ± 4,7	100	100	100
Вірогідність розбіжностей	0,047	0,026	0,019	0,073

тивних клітин становила $11,4 \pm 2,4\%$, у других (UM *IGHV*) — $32,6 \pm 3,6\%$ ($p = 0,0001$). Переважна більшість (88,9%) лейкоемічних клітин з M *IGHV* генами експресували CD38 антиген в межах від 0,1 до 18,6%, однак у 5 випадках рівень експресії був вищим: від 25,4 до 88,1%. Чутливість визначення випадків ХЛЛ з M *IGHV* генами становила 88,9% за граничного рівня $\geq 20\%$ та 91,1% за граничного рівня $\geq 30\%$. У 25 пацієнтів з UM *IGHV* генами рівень експресії антигену CD38 був нижче за 20%, а у 28 — нижче за 30%. Таким чином, специфічність визначення випадків ХЛЛ з мутованими генами *IGHV* становила лише 59,0% за граничного рівня $\geq 20\%$ та 54,1% за граничного рівня $\geq 30\%$. Застосування граничного рівня $\geq 7\%$ знижувало чутливість тесту до 55,6% при специфічності 65,6%. Отримані дані свідчать, що за рівнем експресії антигену CD38 орієнтуватись стосовно мутаційного статусу *IGHV* генів недоцільно.

За період спостереження (медіана спостереження 76 міс.) 73 хворих на ХЛЛ отримали терапію

першої лінії, у 63 пацієнтів захворювання прогресувало, 55 хворих померло. При уніфакторному аналізі за допомогою методу Каплана–Мейєра значущими факторами, які впливали на тривалість періоду до початку терапії, безрецидивного періоду та загальну виживаність, визначені стадія захворювання, мутаційний статус *IGHV* генів, кількість CD38-позитивних клітин ≥ 20 або $\geq 30\%$ (табл. 2). Однак, при багатфакторному аналізі за допомогою регресії Кокса значущість впливу на ці показники зберігалась тільки для стадії захворювання та мутаційного статусу *IGHV* генів (якщо включати в аналіз всі переліковані фактори), або тільки для стадії захворювання (при виключенні з аналізу мутаційного статусу *IGHV* генів).

Тільки на початкових стадіях ХЛЛ (A0–AI) визначення кількості CD38-позитивних клітин дало змогу додатково стратифікувати хворих на групу сприятливого і відносно несприятливого перебігу. У хворих на ХЛЛ стадій A0–AI з вмістом CD38-позитивних клітин $< 20\%$, або $< 30\%$ (розбіжностей

Таблиця 2

Вплив окремих прогностичних факторів на показники TTT, PFS та OS (медіана тривалості, міс.)

Показники	Прогностичні фактори								
	Стадія за Binet			Мутаційний статус <i>IGHV</i> генів		Рівень вмісту CD38-позитивних клітин, %			
	A	B	C	M	UM	< 20	≥ 20	< 30	≥ 30
TTT	44	6	2	52	11	38	11	38	11
Вірогідність	0,0001			0,0001		0,01		0,01	
PFS	73	41	31	170	40	78	41	63	40
Вірогідність	0,001			0,0001		0,021		0,028	
OS	134	60	34	167	60	134	58	130	58
Вірогідність	0,0001			0,0001		0,001		0,007	

залежно від обраного граничного рівня не виявлено) порівняно з хворими з більшою кількістю CD38-позитивних клітин медіана тривалості OS становила 157 міс. проти 81 міс. ($p=0,035$); тривалості PFS – 80 міс. та 58 міс., відповідно (для обох показників $p=0,066$) та медіана ТТТ – 44 міс. та 24 міс., відповідно ($p=0,078$). Для хворих на ХЛЛ стадії ВІІ за вмістом CD38-позитивних клітин $<20\%$ або $\geq 20\%$ виявлені розбіжності в тривалості OS на рівні тенденції (медіана 80 міс. та 58 міс., відповідно; $p=0,051$). Додаткове виділення підгруп пацієнтів з рівнем експресії CD38 в межах $<5\%$, $5\text{--}30\%$ та $\geq 30\%$ не показало значущих розбіжностей між підгрупами, експресія CD38 в яких була $<5\%$ та $5\text{--}30\%$. Медіана тривалості OS у вказаних підгрупах становила відповідно 116 міс., 134 міс. та 58 міс.; тривалості PFS – 53 міс., 63 міс. та 40 міс.; тривалості ТТТ – 15 міс., 44 міс. та 11 міс.

ВИСНОВКИ

1. Визначення експресії антигену CD38 на лейкоцитних клітинах доцільно включати в панель маркерів для дослідження первинних хворих на ХЛЛ.
2. На початкових стадіях ХЛЛ (A0–A1) експресія антигену CD38 має прогностичне значення, передусім для оцінки загальної виживаності.
3. Специфічність орієнтовної оцінки мутаційного статусу *IGHV* генів за показниками експресії антигену CD38 є низькою, оскільки майже в половині випадків ХЛЛ з немутованими *IGHV* генами рівень експресії не відрізнявся від випадків ХЛЛ з мутованими *IGHV* генами.
4. Для оцінки прогнозу перебігу хвороби доцільно вибирати в якості граничного рівня експресію антигену CD38 $\geq 20\%$ або $\geq 30\%$. Граничний рівень експресії антигену CD38 $\geq 7\%$ не має прогностичного значення. Підгрупи хворих з рівнем експресії антигену CD38 $<5\%$ або $5\text{--}30\%$ не розрізняються за прогнозом перебігу захворювання.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms.

- Leukemia 2022; **36** (7): 1720–48. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2.
2. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, et al. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. Blood 2011; **118** (13): 3470–8. doi: 10.1182/blood-2011-06-275610.
3. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; **94** (6): 1840–7.
4. Wierda WG, Brown J, Abramson JS, et al. NCCN Guidelines® Insights: Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 3.2022. J Natl Compr Canc Netw 2022; **20** (6): 622–34. doi: 10.6004/jnccn.2022.0031.
5. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2021; **32** (1): 23–33. doi: 10.1016/j.annonc.2020.09.019.
6. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. Blood 2018; **131** (25): 2745–60. doi: 10.1182/blood-2017-09-806398.
7. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 2001; **98** (1): 181–6. doi: 10.1182/blood.v98.1.181.
8. Kröber A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002; **100** (4): 1410–6.
9. Boonstra JG, van Lom K, Langerak AW, et al. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. Cytometry B Clin Cytom 2006; **70** (3): 136–41. doi: 10.1002/cyto.b.20106.
10. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1975; **46**: 219–34.
11. Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. In: Gale RP, Rai KR, eds. CLL recent progress and future directions, vol. 59. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. New York: Alan R. Liss; 1987. p. 253.
12. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 1981; **48**: 198–206. doi: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1<198::aid-cncr2820480131>3.0.co;2-v.
13. Abramenko I, Bilous N, Chumak A, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl NPP accident — with focus on immunoglobulin heavy chain gene analysis. Leuk Res 2008; **32**: 535–45. doi: 10.1016/j.leukres.2007.08.013.

EVALUATION OF CD38 ANTIGEN EXPRESSION IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: THE EXPERIENCE OF CLINICAL IMMUNOLOGY DEPARTMENT, NATIONAL RESEARCH CENTER FOR RADIATION MEDICINE, NATIONAL ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE

N.A. Holyarnik, I.V. Abramenko, Z.V. Martina,
I.S. Dyagil, A.A. Chumak, D.A. Bazyka

National Research Center for Radiation Medicine,
NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. CD38 antigen is a negative prognostic marker of chronic lymphocytic leukemia (CLL). The question of what cut-off level of CD38 antigen expression should be considered as prognostically significant, remains debatable. **Aim:** to evaluate the optimal cut-off level for CD38 antigen in primary untreated CLL patients for the prognosis of disease and its association with the mutational status of immunoglobulin heavy chain genes (*IGHV* genes). **Objects and methods:** flow cytometric and molecular-genetic analysis (mutational status of *IGHV* genes using polymerase chain reaction followed by direct sequencing) were performed in the groups of 106 primary

previously untreated CLL patients. Time-to-treatment, progression-free survival and overall survival were evaluated using the Kaplan–Meier method and Cox regression.

Results: the prognostic value of cut-off level CD38 antigen expression $\geq 20\%$ or $\geq 30\%$ does not differ significantly. Lowering of cut-off level to 7% or 5% was insignificant. The specificity of the evaluation of the mutational status of IGHV genes based on CD38 antigen expression was low, since CD38 expression in almost half of CLL cases with unmutated IGHV genes not differ from CLL cases with mutated IGHV genes. **Conclusion:** the obtained data confirmed the prognostic value of CD38 antigen expression in patients at the initial stages

of disease (A0–AI), primarily for assessing the duration of overall survival.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, CD38 antigen expression, mutational status of IGHV genes.

Адреса для листування:

Н.А. Голярник
03115, Київ, пр. Берестейський 119/121
Національний науковий центр
радіаційної медицини НАМН України
E-mail: golyarnik@ua.fm

Одержано: 20.08.2023