КУНЕВИЧ ЕВГЕНИЙ ОЛЕГОВИЧ

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРОГНОЗА И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ

3.1.28. Гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медикобиологического агентства»

Научные руководители:

Сидоркевич Сергей Владимирович – доктор медицинских наук

Мартынкевич Ирина Степановна – доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Рукавицын Олег Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, начальник гематологического центра Федерального государственного бюджетного учреждения «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, главный гематолог Министерства обороны Российской Федерации

Моисеев Иван Сергеевич – доктор медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной работе Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ученый секретарь диссертационного совета 68.1.007.01 доктор медицинских наук

Т.В. Глазанова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Фолликулярная лимфома (ФЛ) — неходжкинская В-клеточная лимфома, возникающая из клеток герминальных центров лимфатических фолликулов. Занимает второе место по частоте встречаемости в структуре всех неходжкинских лимфом. Около 20% случаев характеризуются рецидивирующим и рефрактерным течением, а 2% ФЛ в год подвергается трансформации в агрессивные варианты В-клеточных лимфом [Криволапов Ю.А. и др., 2006, Smith A. et al., 2015; Рукавицын О.А. и др., 2017; Cerhan J.R. et al., 2020]. Таким образом, идентификация молекулярно-генетических изменений, которые приводят к рецидивированию, рефрактерности к лекарственному воздействию и трансформации, является ключом к лучшему пониманию биологии данных процессов и поиску путей их преодоления.

Ключевым цитогенетическим маркером ФЛ является реципрокная транслокация t(14;18)(q32.3;q21.3), выявляемая у 80–85% пациентов. В результате данной аберрации протоонкоген *BCL2* попадает под регуляцию промотора гена тяжелой цепи иммуноглобулина (*IGH*), что приводит к конститутивной гиперэкспрессии гена *BCL2*. Эктопическая гиперэкспрессия *BCL2* дает преимущество в выживании t(14;18)-позитивных В-лимфоцитов [Tsujimoto Y. et al., 1984; Hockenberry D. et al., 1990; Roulland S. et al., 2011]. Однако по имеющимся данным для развития ФЛ также необходимы дополнительные генетические события. Было показано, что мутации в генах *КМТ2D*, *CREBBP* и *EZH2*, контролирующих процессы эпигенетической регуляции транскрипции, являются дополнительными факторами, предрасполагающими к неконтролируемой лимфопролиферации и канцерогенезу [Biagi J.J. et al., 2002; Hoglund M. et al., 2013; Okosun J. et al., 2014; Sungalee S. et al., 2014; Bouska A. et al., 2017; Горбунова А.В. и др., 2021].

Мутации гена *EZH2* встречаются с частотой 15–28% у пациентов с ФЛ и связаны с усилением ферментативной активности продукта гена. Подавляющее число мутаций представляет собой единственную аминокислотную замену в каталитическом SET-домене фермента [Morin R.D. et al., 2010; Bodor C. et al., 2011; Bodor C. et al., 2013], которые приводят к неконтролируемой пролиферации В-клеток герминальных центров и образованию злокачественного клона [Sneeringer C.J. et al., 2010; Yap D.B. et al., 2011; Sahasrabuddhe A.A. et al., 2015; Brooun A. et al., 2016]. Недавно разработанный прогностический индекс m7-FLIPI, включающий мутационный статус 7 генов (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP*, *CARD11*), продемонстрировал, что мутации в гене *EZH2* являются благоприятным прогностическим фактором у пациентов с ФЛ, получающих ритуксимаб в комбинации с СНОР или CVP [Pastore A. et al., 2015; Jurinovic V. et al., 2016; Davids M.S., 2017; Jurinovic V. et al., 2019; Lockmer S. et al., 2020].

Изменение парадигмы терапевтических подходов при Φ Л, включение новых таргетных препаратов [Kimby E. et al., 2016; Marcus R. et al., 2017; Flinn I.W. et al., 2019] в программы лечения рецидивирующих и/или рефрактерных форм заболевания предполагает выявление новых предикторов эффективности терапии, таких как мутационный статус гена EZH2. Разработанный недавно селективный ингибитор EZH2 (таземетостат) продемонстрировал высокую эффективность как в исследованиях *in vitro*, так и в рамках клинических испытаний [Morschhauser F. et al., 2020; Izutsu K. et al., 2021]. Всё вышеизложенное позволяет считать мутации гена EZH2 возможным предиктором эффективности стандартной иммунохимиотерапии (ИХТ) и одной из основных мишеней терапевтического воздействия у больных Φ Л.

Несмотря на достигнутые успехи в диагностике и лечении, ФЛ остается крайне неоднородным заболеванием с различными вариантами течения [Ambinder A.J. et al., 2012; Smith A. et al., 2015]. Стратификация пациентов в одну из групп риска при постановке диагноза является важной задачей определения прогноза и выбора соответствующей терапии. Оценка риска поможет свести к минимуму токсичность избыточного лечения, повысить качество

жизни у пациентов с благоприятным прогнозом, объективизировать применение новых терапевтических средств и в конечном итоге улучшить показатели выживаемости.

Специфическими для пациента параметрами, связанными с особенностями течения ФЛ, являются опухолевая нагрузка [Solal-Celigny P. et al., 2004; Nooka A.K. et al., 2013; Meignan M. et al., 2016], гистологический тип и стадия [Wahlin B.E. et al., 2021], а также опухоль-ассоциированные маркеры [Press O.W. et al., 2013; Kridel R. et al., 2016; Bachy E. et al., 2018; Qu X. et al., 2019; Sohani A.R. et al., 2021]. Клинические прогностические показатели, такие как Международный прогностический индекс фолликулярной лимфомы (FLIPI) [Solal-Seligny P., 2004] и FLIPI-2 [Federico M. et al., 2009] не учитывают биологические параметры опухоли, обуславливающие ее эволюцию, и сами по себе недостаточны для учета наблюдаемых различий в выживаемости у отдельных пациентов. Исследования экспрессии генов [Okosun J. et al., 2014; Bouska A. et al., 2017] установили важность микроокружения опухоли в определении прогноза заболевания, а работы по секвенированию следующего поколения (NGS) выявили многочисленные мутационные события, возникающие в различные моменты времени в геноме ФЛ и оказывающие влияние на результаты терапии. До недавнего времени применение биологических факторов риска для оценки прогноза ФЛ было невозможным в клинических условиях по ряду причин. Растущий объем литературных данных позволил обнаружить новые и более точные предикторы выявления пациентов низкого и высокого риска как при постановке диагноза, так и во время рецидива [Pastore A. et al., 2015; Huet S. et al., 2018; Mondello P. et al., 2021]. Однако до настоящего времени не существует проверенных прогностических шкал, учитывающих как биологические, так и клинические параметры опухоли, что делает актуальным продолжающийся поиск новых прогностических параметров и разработку систем стратификации пациентов с ФЛ.

Степень разработанности темы

К настоящему времени опубликовано большое количество работ, посвященных изучению факторов риска у пациентов с ФЛ. Разработаны прогностические системы, применяемые как в рутинной практике, так и в клинических исследованиях (FLIPI, FLIPI-2, PRIMA-PI) [Solal-Seligny P. et al., 2004; Federico M. et al., 2009; Bachy E. et al., 2018]. Полученные данные о влиянии микроокружения опухоли на ее эволюцию находят применение в создании биологических моделей прогноза (Bio-FLIPI, m7-FLIPI) [Pastore A. et al., 2015; Mondello P. et al., 2021]. Большинство изначально предложенных прогностических систем было разработано на основании ретроспективных данных в период до внедрения терапевтических моноклональных антител (МКАТ), что потребовало их последующей модификации для применения в настоящее время. Использование в клинических исследованиях в качестве первичной конечной точки общей выживаемости (ОВ), частоты полных ответов (ПО) и частоты объективных ответов (ЧОО) приводит к разработке моделей с низкой прогностической способностью [Federico M. et al., 2009; Bachy E. et al., 2018; Alig S. et al., 2019; Mir F. et al., 2020], так как в современных реалиях для большинства пациентов с ФЛ характерно длительное бессобытийное течение заболевания [Smith A. et al., 2015].

Внедрение в клиническую практику технологий NGS позволило исследователям идентифицировать множество повторяющихся соматических мутаций, которые раскрыли новые механизмы молекулярного патогенеза ФЛ [Okosun J. et al., 2014; Bouska A. et al., 2017]. Благодаря NGS получены данные о прогностической роли мутаций генов, определены вероятные мишени для таргетной терапии [Green M.R. et al., 2013; Li H. et al., 2014; Green M.R. et al., 2015; Devan A. et al., 2018; Meyer S.N. et al., 2019]. Недавно был одобрен для использования в клинической практике ингибитор продукта гена *EZH2* — таземетостат, применяемый у пациентов с ФЛ во второй и более линии терапии [Morschhauser F. et al., 2020; Izutsu K. et al., 2021]. Однако до сих пор не существует однозначного мнения в отношении влияния мутаций гена *EZH2* на прогноз и течение ФЛ при различных вариантах терапии [Pastore A. et al., 2015; Jurinovic V. et al., 2019; Lockmer S. et al., 2020; Rai S. et al., 2021]. Использование в алгоритмах лечения данных молекулярно-генетических исследований позволит не только более эффективно стратифицировать пациентов на группы риска,

но и учесть биологические предикторы прогрессии и/или рецидива ФЛ. Вышеописанные данные определили цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования

Оптимизация стратификации и алгоритма лечения пациентов с фолликулярной лимфомой на основании оценки генетических и клинических факторов прогноза.

Задачи исследования

- 1. Определение частоты встречаемости перестроек генов *BCL2*, *BCL6*, *TP53* и мутаций гена *EZH2* у пациентов с фолликулярной лимфомой, оценка их прогностического значения.
- 2. Исследование мутационного статуса генов у больных фолликулярной лимфомой методом секвенирования следующего поколения и разработка интегрального прогностического показателя, учитывающего мутационную сигнатуру опухоли.
- 3. Оценка прогностической роли наиболее значимых клинических факторов риска и их влияния на эффективность применяемых программ иммунохимиотерапии и поддерживающего лечения у больных фолликулярной лимфомой.
- 4. Создание прогностической модели оценки риска фолликулярной лимфомы для использования в клинической практике.
- 5. Разработка алгоритма терапии первой линии пациентов с фолликулярной лимфомой на основе выявленных генетических и клинических факторов риска.

Научная новизна

В настоящем исследовании впервые:

- определена частота встречаемости мутаций генов у пациентов с $\Phi \Pi$ с применением методов секвенирования по Сэнгеру и NGS. Доказана прогностическая роль мутаций гена EZH2 у пациентов с $\Phi \Pi$ в независимости от проводимой терапии. Показано, что пациенты с сочетанием перестроек генов BCL2 и BCL6 обладают достоверно худшими показателями выживаемости в сравнении с больными без данной ассоциации;
- разработана методика оценки опухолевой мутационной нагрузки (TMB) у пациентов с ФЛ, доказана ее прогностическая значимость;
- доказано преимущество применения режима иммунохимиотерапии R-CHOP у t(14;18)-позитивных пациентов по сравнению с RB. В то же время у t(14;18)-негативных больных режим R-CHOP не оказывает преимущества в выживаемости по сравнению с RB;
- разработана новая модель оценки риска (FLIPI-2 mod.) с лучшей предсказательной ценностью в отношении всех показателей выживаемости на базе прогностического индекса FLIPI-2;
- разработан комплексный алгоритм терапии первой линии, учитывающий данные молекулярно-генетических исследований, у некоморбидных пациентов с II—IV стадией $\Phi \Pi$ в возрасте до 70 лет.

Теоретическая и практическая значимость

Оценена распространенность перестроек генов *BCL2*, *BCL6*, *TP53* и мутаций гена *EZH2* в когорте больных ФЛ, проживающих в г. Санкт-Петербурге и Ленинградской области. Представлены научные данные о прогностической значимости мутаций гена *EZH2*. Продемонстрирована актуальность применения NGS для стратификации пациентов в прогностические группы на основании величины TMB. Показаны возможности применения NGS для исследования сигнальных клеточных путей, вовлеченных в лимфомагенез. Установлена эффективность поддерживающей терапии анти-CD20-MKAT после основных режимов индукционной терапии при достижении объективного ответа. Модифицированный прогностический индекс FLIPI-2 mod. позволяет оптимизировать стратификацию пациентов на две группы риска вместо трех, что существенно облегчает принятие решения в отношении дальнейшей тактики ведения больных. Разработанный алгоритм терапии первой линии у некоморбидных пациентов с II–IV стадией ФЛ возрастом до 70 лет внедрен в работу клинических подразделений ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Методология и методы исследования

Методология исследования основывается на системном подходе и принятых в настоящее время суждениях об этиологии, патогенезе и принципах лечения лимфопролиферативных новообразований. В работе использованы клинико-лабораторные и молекулярно-генетические методы исследования, а также методы статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

- 1. Мутация гена EZH2 (р.Y646X) является благоприятным прогностическим фактором, а наличие ассоциации перестроек генов BCL2 и BCL6 ухудшает прогноз у пациентов с $\Phi \Pi$.
- 2. Данные о наличии мутаций в генах, ассоциированных с патогенезом лимфропролиферативных новообразований и выявляемые методом NGS, могут использоваться как интегральный прогностический параметр опухолевая мутационная нагрузка. Пациенты с высокой ТМВ характеризуются более низкими показателями выживаемости.
- 3. Разработанный индекс FLIPI-2 mod., стратифицирующий больных на две группы риска, обладает лучшей прогностической ценностью в сравнении с базовым FLIPI-2 и является достоверным в отношении всех показателей выживаемости.
- 4. Режим иммунохимиотерапии R-CHOP имеет большую эффективность чем RB у пациентов с наличием транслокации t(14;18) по сравнению с t(14;18)-негативными больными. Применение поддерживающей терапии анти-CD20-MKAT после достижения полного или частичного ответа значимо улучшает прогноз у пациентов с ФЛ вне зависимости от варианта индукционного режима терапии и глубины полученного ответа.
- 5. Современный алгоритм терапии ФЛ, учитывающий данные молекулярногенетических исследований, позволяет эффективнее использовать терапевтические опции, основываясь на более совершенной стратификации пациентов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов проведенного исследования определяется использованием современных методов сбора и обработки информации, репрезентативным объемом выборки включенных в исследование пациентов (144 пациента с ФЛ, получающих современную лекарственную терапию), применением информативных и адекватных поставленным задачам методик исследования, обработкой полученных результатов с применением параметрических и непараметрических методов статистики. Выводы диссертации обоснованы и логически вытекают из полученных результатов.

Основные теоретические и практические положения диссертации представлены в виде устных докладов на российских и международных конференциях: ІІ научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (2021), VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (2023), ІІІ научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (2023).

Результаты исследования были представлены в виде тезисов на российских и международных конференциях: II научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (2021), VI Конгрессе гематологов России и III Конгрессе трансфузиологов России (2022), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (2022), II Московской международной гематологической школе молодых ученых и врачей (2023), ЕНА2023 Hybrid Congress (2023), VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (2023), III научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (2023), XX Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (2023).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови. Результаты проведённого исследования соответствуют области исследования специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови, а именно: п. 6 и п. 13.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую и научноисследовательскую работу клинического отделения гематологии, химиотерапии и трансплантации костного мозга с блоком интенсивной терапии ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Публикации

По результатам исследования опубликовано 8 научных печатных работ, в том числе 2 научные статьи в российских и международных журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования $P\Phi$.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического списка. Библиографический список включает 251 источник литературы, в том числе 22 на русском и 229 на иностранных языках. Работа содержит 51 рисунок и 20 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Характеристика исследуемой группы. В исследование включено 144 пациента (111 (77,1%) проспективно, 33 (22,9%) ретроспективно) старше 18 лет с общесоматическим статусом ЕСОБ 3 и более и морфологически подтвержденной ФЛ, имеющих показания для начала специфической терапии (GELF-критерии) в период с января 2007 по апрель 2023 гг. Средний возраст больных составил 54,6 лет (95% ДИ: 52,2–56,9). Медиана наблюдения равнялась 34,3 месяца.

Эффективность ИХТ оценивалась по динамике изменения таргетных очагов в соответствии с рекомендациями Лугано (2014). Проточная цитометрия лимфоцитов была выполнена 65 пациентам, анализ миелограммы — 82. Исследование перестроек гена *BCL2* методом FISH было выполнено у 105 пациентов, перестройки гена *BCL6* и del17p/*TP53* были оценены у 99 и 93 пациентов соответственно. Анализ мутаций гена *EZH2* методом секвенирования по Сэнгеру был выполнен у 111 больных. Общая характеристика исследуемой группы пациентов до начала терапии первой линии представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Общая характеристика пациентов с ФЛ

Характеристика	Значение (n = 144)	
Возраст, лет	54,6 (95% ДИ: 52,2-56,0)	
Пол мужской/женский	45 (34,0%)/99 (66,0%)	
Состояние по шкале ECOG ≥ 2	32 (22,3%)	
Цитологический тип 1-2/3A-3B	101 (70,1%)/43 (29,9%)	
Поражение костного мозга	76 (52,8%)	
Экстранодальные очаги	38 (26,4%)	
Стадия I–II/III–IV	11 (7,6%)/133 (92,4%)	
Лейкоциты, х 10^9 /л (10 и 90 процентили)	6,2 (3,5; 14,5)	
ЛДГ, Ед/л (10 и 90 процентили)	221 (142; 430)	
β2-MΓ, мг/л (10 и 90 процентили)	5,18 (2,03; 9;35)	

Примечание: ЛДГ – лактатдегидрогеназа, β2-МГ – бета-2-микроглобулин

Лечение пациентов проводилось в соответствии с Национальными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению ФЛ, а также с учетом международных стандартов (NCCN, ESMO), принятых в период лечения больных. В качестве терапии первой линии ИХТ протоколу R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, преднизолон) была проведена у 72 (50,0%) пациентов, RB (ритуксимаб, бендамустин) – у 45 (31,3%), ритуксимаб в моно-режиме – у 12 (8,3%), GB (обинутузумаб, бендамустин) – у 8 (5,6%), другие схемы терапии (R-CVP, G-CVP, FCR, RFMD, R-Chl) применялись у 7 (4,9%) больных. Поддерживающая терапия проводилась у 84 (58,3%) пациентов (у 80 больных применялась поддерживающая терапия ритуксимабом, у 4 - обинутузумабом). ПО был достигнут у 94 (65,3%) пациентов, частичный ответ (ЧО) – у 34 (23,6%), стабилизация отмечалась у 3 (2,1%) пациентов, при этом у 13 (9,0%) больных не удалось достичь объективного ответа. Частота прогрессирования заболевания (ПЗ) составила 20,1% (n = 29), частота рецидивов -16.7% (n = 24), трансформации отмечались у 2.8% (n = 4) пациентов. Медиана количества линий терапии равнялась 1 (максимум 4). Терапия второй линии была проведена у 38 (26,4%) пациентов, наиболее часто используемыми режимами во второй линии были: RB – 15 (40%), R-CHOP – 7 (18%), GB – 7 (18%), другие схемы (R-DHAP, R-GDP, R-Duvelisib и др.) применялись у 9 (24%) больных.

Лабораторные и молекулярно-генетические методы исследования. Клинический анализ крови выполнялся с помощью гематологического анализатора Sysmex XN-1000 с последующим подсчетом лейкоцитарной формулы на микроскопе. Забор костного мозга при аспирационной биопсии и трепанобиопсии осуществлялся с помощью игл типа Jamshidi цитологическим, ИЗ подвздошной кости последующим гистологическим иммуногистохимическим исследованиями. Иммунофенотипирование проводилось И на проточном цитофлуориметре NAVIOS (Beckman Coulter) в десятицветном анализе с использованием МКАТ Beckman Coulter.

Для FISH исследования использовали суспензию клеток, приготовленную для стандартного цитогенетического исследования или мазок периферической крови на предметном стекле. Подготовка материала для FISH исследования проводилась в два этапа. При исследовании каждого зонда анализировали 200 интерфазных ядер. Интерпретация патологии кариотипа и полученных результатов производилась в соответствии с Международной номенклатурой (ISCN, 2020) [McGowan-Jordan J. et al., 2020].

Мутационный статус 16 экзона гена *EZH2* оценивали с помощью секвенирования по Сэнгеру в три этапа: выделение геномной ДНК из периферической крови, амплификация 16 экзона гена *EZH2*, секвенирование по Сэнгеру на автоматической капиллярной системе MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences, Великобритания). Полученный результат секвенирования анализировался в программах Vector NTI и UGENE.

Секвенирование следующего поколения проводилось на платформе NextSeq парно-концевого чтения. Образцы методом ДНК из периферических мононуклеаров крови с применением Ficoll-Paque градиентного метода. Для пробоподготовки была использована методика гибридизационного селективного обогащения фрагментами ДНК, относящимися к кодирующим областям 118 исследуемых генов, с использованием кастомной панели зондов производства Roche (таблица 2), согласно протоколу производителя. Обработка данных секвенирования проведена с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (hg37), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов нуклеотидной последовательности (здесь и далее «варианты») и фильтрацию вариантов по качеству. Целевая глубина прочтения составила 1000х. При анализе полученных данных применялся 2% порог частоты встречаемости аллеля (VAF). Клиническая значимость выявленных мутаций оценивалась с помощью баз данных COSMIC, ClinVar, gnomAD с применением in silico анализа (Cscape, Cancer Genome Interpreter, SNPs&Go). Интерпретация значимости предположительно соматических вариантов на основании рекомендаций AMP (Association for Molecular Pathology) [Li M.M. et al., 2017], герминальных вариантов на основании рекомендаций ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) [Richards S. et al., 2015]. В конечном итоге выявленные варианты нуклеотидной последовательности распределялись на пять групп: патогенный, вероятно патогенный, неопределенного значения, вероятно доброкачественный, доброкачественный [Рыжкова О.П. и др., 2019].

Таблица 2 – Лимфоидная таргетная NGS панель

ABL1	AKT3	ALK	APC	ARID1A	ASXL1	ATM	ATRX	B2M
BCL2	BCOR	BCORL1	BCR	BIRC3	BRAF	BRCA1	BRCA2	BTK
CALR	CARD11	CBL	CCND1	CD58	CD79B	CDKN2A	CDX2	CEBPA
CIITA	CREBBP	CSF3R	CUX1	DDX3X	DEK	DIS3	DNMT3A	EP300
ETV6	EZH2	FAT1	FBXW7	FLT3	GATA1	GATA2	GJB2	GNA13
GNAS	H1-1	HRAS	ID3	IDH1	IDH2	IKZF1	IKZF3	IRF4
ITPKB	JAK2	JAK3	KDM6A	KDR	KIT	KLF2	KMT2A	KMT2C
KMT2D	KRAS	MAP2K1	MEF2B	MGA	MPL	MSN	MYC	MYD88
NF1	NOTCH1	NOTCH2	NPM1	NRAS	NSD2	PDGFRA	PHF6	PIK3CB
PIM1	PKHD1	PLCG2	POT1	PRDM1	PTCH1	PTEN	PTPN11	PTPRD
RAD21	RB1	RHOA	RPS15	RUNX1	RYR1	SAMHD1	SETBP1	SF3B1
SH2B3	SMARCA4	SMC1A	SMC3	SOCS1	SRSF2	STAG2	STAT3	STAT6
SUZ12	SYK	TENT5C	TET2	TNFAIP3	TP53	U2AF1	WT1	XPO1
ZRSR2								

Статистические методы. Полученные данные анализировались с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 26.0.0.0 (macOS), Microsoft Excel 16.75.2 (for Mac), R version 4.2.2, Morpheus (https://software.broadinstitute.org/morpheus). Анализ обогащения набора генов (GSEA) проводился с помощью Metascape (https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1) и g:Profiler (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost).

Все количественные переменные проверены на нормальность распределения по критериям Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Параметрические данные анализировались с помощью t-критерия Стьюдента, непараметрические — с помощью U-критерия Манна-Уитни и H-критерия Краскела-Уоллиса. Независимые категориальные данные сравнивали с использованием критерия χ^2 -квадрат Пирсона, в случае малых выборок — точного двустороннего теста Фишера, зависимые категориальные переменные анализировались с использованием двухфакторного рангового критерия Фридмана. Пороговые значения количественных переменных определялись с помощью ROC-анализа.

Парный корреляционный анализ в случае нормального распределения проводили методом Пирсона, в иных случаях — методом Спирмена. В качестве метода классификации использовался иерархический кластерный анализ, в качестве метода снижения размерности — факторный анализ. Для прогнозирования значения бинарной переменной проводили анализ логистической регрессии с последующей оценкой модели методом ROC-анализа.

Анализ выживаемости проводили с использованием метода Каплана-Майера с применением лог-ранг теста для оценки достоверности различий. Зависимость времени дожития от независимых переменных оценивали с помощью однофакторного и многофакторного регрессионного анализа Кокса.

Количественные параметрические данные представлены в виде M с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ), непараметрические — в виде Me (10-й и 90-й процентили), частоты представлены в виде собственных значений с указанием 95% ДИ. Уровень значимости считали равным $p \le 0.05$. В анализе GSEA применялась поправка Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений (q-значение) [Hochberg Y. et al., 1990].

Общую выживаемость определяли со дня верификации диагноза (даты биопсии) до даты смерти от любой причины. Точкой отсчета для беспрогрессивной (ВБП) и бессобытийной (БСВ) выживаемости считали дату первого дня первого цикла терапии, для безрецидивной выживаемости (ВБР) – дату достижения полной ремиссии. В анализе БСВ событием считали ПЗ, рецидив, трансформацию или смерть от любой причины. В качестве первичной контрольной точки исследования считали ОВ и ВБП, в качестве вторичных точек – ВБР и БСВ.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА У ПАЦИЕНТОВ С ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ

Прогностическая значимость перестроек генов BCL2, BCL6 и del17p/TP53

FISH исследование было проведено у 105 пациентов. Аберрации гена BCL2 выявлены с частотой 41,0% (43/105), BCL6-14,1% (14/99), del17p/TP53 была определена в 14,0% (13/93) случаев. У пациентов с перестройками гена BCL2 уровень лейкоцитов и лимфоцитов в дебюте был значимо выше, чем у пациентов с нормальным геном $-7.6 \times 10^9/\pi$ (3,7; 36,4) против 5,7 х $10^9/\pi$ (3,2; 10,1), p=0.029 и 2,5 х $10^9/\pi$ (0,9; 31,9) против 1,4 х $10^9/\pi$ (0,6; 3,1), p=0.001 соответственно. Перестройки гена BCL2 ассоциированы с более частым поражением костного мозга, отношение шансов (ОШ) составило 2,28 (95% ДИ: 1,01–5,13), p=0.049 и с более высокой частотой del17p/TP53, ОШ равнялось 3,56 (95% ДИ: 0,99–12,76), p=0.067, однако различия недостоверны.

Наличие перестроек в исследуемых генах не оказывало какого-либо влияния на пятилетнюю ОВ, p>0.5. Двухлетняя ВБП у пациентов с перестройками гена BCL2 составила 59,4% (95% ДИ: 43,3–73,7), а у пациентов без изменений гена — 69,2% (95% ДИ: 55,7–80,1), p=0.296. В однофакторном регрессионном анализе относительный риск (ОР) равнялся 1,43 (95% ДИ: 0,73–2,80), p=0.299. Изменения в генах BCL6, del17p/TP53 также не оказывали значимого влияния на показатели выживаемости, p>0.4.

C прогностической точки зрения наиболее неблагоприятной группой является сочетание аномалий в генах BCL2 и BCL6 (таблица 3).

Таблица 3 — Выживаемость пациентов с Φ Л в зависимости от наличия перестроек генов BCL2, BCL6 и их сочетаний

Параметр	BCL2-BCL6-	BCL2+BCL6-	BCL2-BCL6+	BCL2+BCL6+		
выживаемость, % (95% ДИ)						
2-летняя ОВ	83,0 (69,8–92,5)1	88,6 (69,8–92,5) ²	87,5 (47,4–99,7) ³	40,0 (4,4–77,7) ^{1,2,3}		
2-летняя ВБП	64,9 (49,5–77,8)	65,9 (49,0–81,4)	$87,5 (47,4-99,7)^4$	$20,0 (0,4-64,1)^4$		

Примечание: $BB\Pi$ – выживаемость без прогрессирования, OB – общая выживаемость 1,2,3,4 – различия между группами достоверны (p = 0,014, 0,005, 0,045 и 0,015 соответственно)

Двухлетняя ОВ пациентов с перестройками генов BCL2 и BCL6 составила 40,0% (95% ДИ: 4,3–77,7, медиана 18,6 месяцев), что достоверно ниже, чем у пациентов без сочетания, p = 0,025. Аналогичные результаты получены в анализе двухлетней ВБП, которая в группе BCL2+BCL6+ составила 20,0% (95% ДИ: 0,4–64,1, медиана 18,6 месяцев), однако различия статистически незначимы, p = 0,12 (для всех четырех сравниваемых групп).

Для исследования эффективности терапии R-CHOP и RB у пациентов с транслокацией t(14;18) в анализ было включено 28 пациентов с 1–3А цитологическим типом, 17 (61%) из которых лечились по программе R-CHOP, 11 (39%) – по программе RB. Пятилетняя ОВ у пациентов в группе R-CHOP составила 94,7% (95% ДИ: 71,3–99,9), а в группе RB – 40,0% (95% ДИ: 10,9–69,2, медиана 14,7 месяцев), p = 0,0013. В отношении пятилетних ВБП и БСВ были получены схожие результаты, однако различия недостоверны, p = 0,219 и p = 0,126 соответственно. С другой стороны, аналогичный анализ t(14;18)-негативных пациентов t(14;18) не выявил различий в эффективности режимов R-CHOP и RB, t(14;18) (рисунок 1).

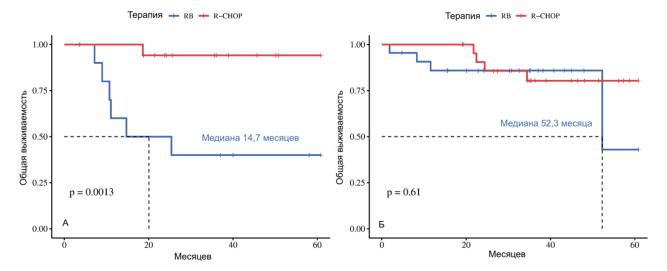


Рисунок 1 – Пятилетняя OB у пациентов с t(14;18) (A) и без t(14;18) (Б) в зависимости от варианта терапии первой линии (R-CHOP против RB)

Частота мутаций гена EZH2 и их прогностическая роль

Анализ мутаций гена EZH2 методом секвенирования по Сэнгеру был выполнен у 111 пациентов. Частота мутаций составила 17,1% (19/111). У всех больных отмечалась миссенс-мутация замены аминокислоты тирозин в 646 положении (р. Y646X). В зависимости от мутационного статуса гена EZH2 пациенты были разделены на две группы: группа с мутацией (n = 19) и группа дикого типа (контроль, n = 92). Частота встречаемости 3A–3B цитологического типа у пациентов без мутации составила 36,9%, что значимо выше, чем в контрольной группе – 10,6%, p = 0,025. Обе группы достоверно различались по уровню экспрессии CD10 (p = 0,036), а также в группе с мутацией отмечалась более низкая экспрессия Bc1-6 (p = 0,068). У пациентов с мутацией гена EZH2 чаще наблюдались перестройки гена BCL2 — 60,0% (95% ДИ: 24,5—71,1) против 39,0% (95% ДИ: 23,2—43,2) в группе дикого типа, однако различия статистически недостоверны, p = 0,159. По другим клинико-лабораторным параметрам значимые межгрупповые различия отсутствовали.

В группе дикого типа 42 (59,2%) пациентам проводилась терапия R-CHOP, у 29 (40,8%) больных — терапия RB, оставшиеся 21 человек лечились по другим схемам. В группе с мутацией 10 (55,6%) пациентов лечилось по схеме R-CHOP, 8 (44,4%) человек — по схеме RB. С целью сохранения однородности групп для дальнейшего сравнения в анализ включались только пациенты, получившие исключительно режимы RB и R-CHOP (71 пациент в группе дикого типа и 18 больных в группе с мутацией). Соотношение проводимой терапии (RB и R-CHOP) значимо не различалось в обоих группах, p = 0,795. У пациентов с мутацией гена *EZH2* отмечалась достоверно более высокая продолжительность ответов на терапию (p = 0,044) и более низкая частота неблагоприятных событий (p = 0,012).

различались ПО уровню группы значимо не риска в от прогностического индекса (FLIPI, FLIPI-2, FCG, FLIPI-L), p > 0,198. У пациентов с мутацией гена ЕZH2 отмечались достоверно лучшие показатели выживаемости (таблица 4). Общая двухлетняя выживаемость не различалась в обеих группах, р = 0,429, однако длительность двухлетних ВБП, ВБР и БСВ была достоверно выше в группе с мутацией гена ЕΖН2. В исследуемой группе двухлетняя ВБП составила 84,2% (95% ДИ: 60,4–96,6), что значимо выше, чем в группе дикого типа -45.8% (95% ДИ: 45.8-66.8), p = 0.04. Аналогичные результаты были получены в отношении ВБР, которая у пациентов с мутацией составила 92,9% (95% ДИ: 74,0-99,9), а в контрольной группе была 56,8% (95% ДИ: 45,8-66,8), p = 0,024. БСВ также значимо различалась между группами и у больных с мутацией гена ЕZH2 равнялась 84,2% (95% ДИ: 60,4-96,6) против 48,6% (95% ДИ: 38,3-59,6, медиана 23.1 месяца) в группе дикого типа, p = 0.011.

Таблица 4 – Выживаемость пациентов	с ФП в зависимости от мутаци.	онного статуса гена <i>F7H</i> 2
I domina - Dominacinocio magnetino	с Фл в зависимости от мутаци	

Параметр Дикий тип (n = 92)		Мутация (n = 19)	р		
Выживаемость, % (95% ДИ)					
2-летняя ОВ	81,7 (72,1–88,9)	89,5 (66,9–98,7)	0,429		
5-летняя ОВ	50,0 (39,4–60,6)	89,5 (66,9–98,7)	0,035*		
2-летняя ВБП	56,9 (45,8–66,8)	84,2 (60,4–96,6)	0,040*		
5-летняя ВБП	35,1 (25,2–45,4)	84,2 (60,4–96,6)	0,004*		
2-летняя ВБР ¹	56,8 (45,8–66,8)	92,9 (74,0–99,9)	0,024*		
5-летняя ВБР ¹	31,7 (22,2–42,0)	61,9 (38,4–83,7)	0,015*		
2-летняя БСВ	48,6 (38,3–59,6)	84,2 (60,4–96,6)	0,011*		
5-летняя БСВ	16,8 (9,4–25,5)	84,2 (60,4–96,6)	< 0,001*		

Примечание: БСВ — бессобытийная выживаемость, ВБП — выживаемость без прогрессирования, ВБР — выживаемость без рецидива, ОВ — общая выживаемость 1 — параметр оценивался только у 65 пациентов, которые достигли полного ответа, * — различия

между группами достоверны, $p \le 0.05$

Анализ пятилетней выживаемости продемонстрировал более высокую степень достоверности различий между исследуемыми группами. Так пятилетняя ВБР у пациентов из группы с мутацией EZH2 составила 61,9% (95% ДИ: 38,4–83,7), в группе дикого типа равнялась 31,7% (95% ДИ: 22,2–42,0, медиана 47,2 месяца), p = 0.015 (рисунок 2).

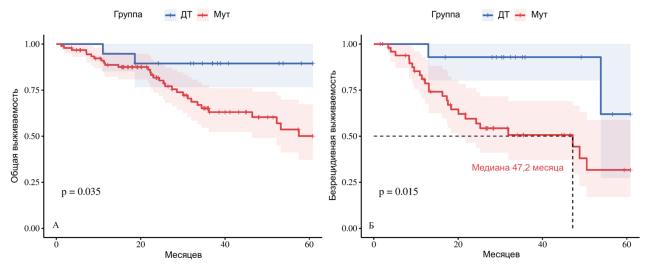


Рисунок 2 – Пятилетние ОВ (A) и ВБР (Б) в зависимости от мутационного статуса гена *EZH2* (ДТ – группа дикого типа; Мут – группа мутации)

В регрессионном анализе Кокса мутация гена *EZH2* в отношении показателей выживаемости выступала в качестве благоприятного прогностического признака (рисунок 3).

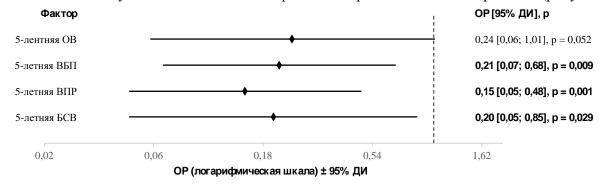


Рисунок 3 — OP для мутации гена EZH2 в отношении показателей пятилетней выживаемости (высокий риск > 1,0; низкий риск < 1,0)

Таким образом, была установлена частота встречаемости мутаций гена *EZH2*, выявлено, что у больных с мутацией гена *EZH2* (Y646X) отмечается достоверно лучший прогноз по результатам анализа выживаемости, а наличие данного фактора снижает риск смерти или иного неблагоприятного события более чем в четыре раза.

Возможности применения секвенирования следующего поколения (NGS) у больных фолликулярной лимфомой

Генетические аберрации отмечались у всех обследованных пациентов. В 88 генах из 118 было обнаружено 638 аллельных вариантов. Всего выявлено 134 мутации, имеющих клиническое значение, в 51 гене. Наибольшая частота мутаций отмечалась в генах: KMT2C - 50%, KMT2D - 50%, CREBBP - 31%, NOTCH2 - 31%, GNAS - 23%, FAT1, ITPKB и KDR - 10 по 19%, ATM - 15%, ARID1A - 12%. Миссенс-мутации встречались с частотой 84,3%, нонсенс – 5,2%, синонимичные – 4,5%, мутации со сдвигом рамки считывания – 3,8%, другие мутации регистрировались в 2,2% случаев. Медиана VAF составила 8,96% (3,83–36,77).

Среди мутаций гена ARID1A было выявлено два вероятно патогенных варианта нуклеотидной последовательности, в обоих случаях приводящих к преждевременной терминации синтеза белка и потере его функции. Это мутация c.5548dupG (p.D1850fsX4) со сдвигом рамки считывания и вариант c.1650dup (p.Y551Lfs*72), приводящий к образованию стоп-кодона. Пятилетняя ВБП у пациентов с мутацией гена ARID1A составила 0% (медиана 2,4 месяца), а у пациентов с вариантом гена дикого типа равнялась 29,1% (95% ДИ: 13,2—52,9, медиана 23,5 месяцев), p = 0.014 (рисунок 4).

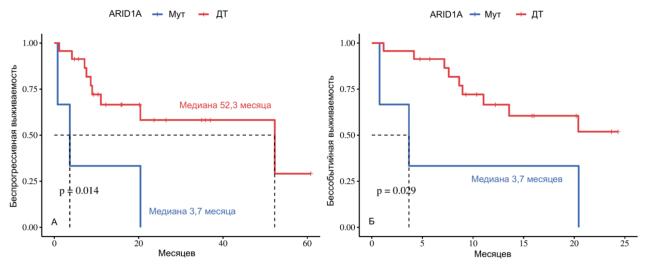


Рисунок 4 — Пятилетняя ВБП (A) и двухлетняя БСВ (Б) в зависимости от мутационного статуса гена ARID1A

Все диагностированные мутации гена EZH2 были сконцентрированы в 16 экзоне и представляют собой миссенс-мутацию замены тирозина на другую аминокислоту. Проведенный анализ выживаемости в зависимости от мутационного статуса генов KMT2C, KMT2D, CREBBP и EZH2 не выявил достоверных межгрупповых различий (p > 0,1).

Для определения прогностической значимости всех найденных мутаций у каждого пациента была рассчитана ТМВ, которая определялась как количество мутаций на 1 мегабазу (Мb) кодирующей последовательности. Длина экзонов всех 118 исследуемых генов составила 602917 пар оснований или 0,603 Мb. Медиана ТМВ равнялась 5,0 мутаций/Мb. С целью определения порогового значения опухолевой нагрузки в отношении предсказания исходов двухлетней ОВ и БСВ (в отношении ВБР и ВБП расчеты не проводились по причине малой выборки и низкой частоты событий), был проведен ROC-анализ (рисунок 5). Площадь под кривой (AUC) в анализе прогнозирования ОВ равнялась 0,735 (95% ДИ: 0,516–0,947), р = 0,035. Чувствительность модели при значении ТМВ, равном 5,8 мутаций/Мb, составила 75,0%, специфичность – 70,6%. По данным однофакторного регрессионного анализа ОР для

фактора высокой ТМВ равнялся 5,2 (95% ДИ: 0,6–46,9), p = 0,138. В отношении двухлетней БСВ были получены аналогичные результаты: AUC = 0,727 (95% ДИ: 0,518–0,936), p = 0,033, чувствительность при значении ТМВ 5,8 мутаций/Мb составила 72,7%, специфичность – 78,6%. В однофакторном регрессионном анализе OP для высокой ТМВ составил 3,8 (95% ДИ: 1,0–14,2), p = 0,052. Таким образом, с помощью ROC-анализа было определено пороговое значение ТМВ, в соответствии с которым все пациенты были разделены на две группы: пациенты с низкой мутационной нагрузкой (до 5 мутаций включительно на 1 Мb) – 14 (56%) больных, и пациенты с высокой ТМВ (6 и более мутаций на 1 Мb) – 12 (44%) больных.

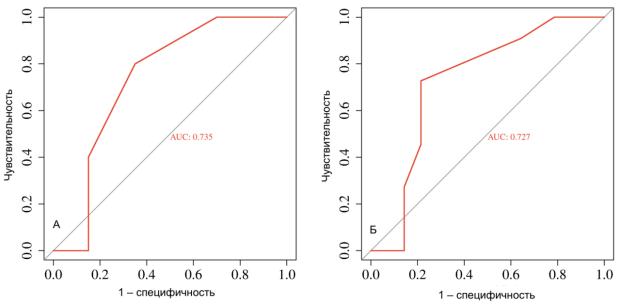


Рисунок 5 – ROC-кривые, полученные в отношении двухлетних OB (A) и БСВ (Б)

Обе группы достоверно не различались во возрасту (p=0,236) и лимфома-ассоциированным параметрам: лимфоциты (p=0,607), лактатдегидрогеназа (p=0,589), бета-2-микроглобулин (β 2-МГ) (p=0,607). Двухлетняя ОВ в группе с высокой ТМВ составила 62,3% (95% ДИ: 30,8–89,1) и была ниже, чем у пациентов с низкой ТМВ – 90,9% (95% ДИ: 66,1–99,8), p=0,098. Также группа с высокой ТМВ характеризовалась более низкой двухлетней ВБП – 36,4% (95% ДИ: 10,9–69,2, медиана 11,0 месяцев) и двухлетней БСВ – 27,3% (95% ДИ: 6,0–61,0, медиана 11,0 месяцев) по сравнению с больными с низкой ТМВ, у которых данные показатели составили 72,7% (95% ДИ: 41,9–91,6, p=0,071) и 72,7% (95% ДИ: 41,9–91,6, p=0,071) и 72,7% (95% ДИ: 41,9–91,6, p=0,071) и 72,7% (95% ДИ:

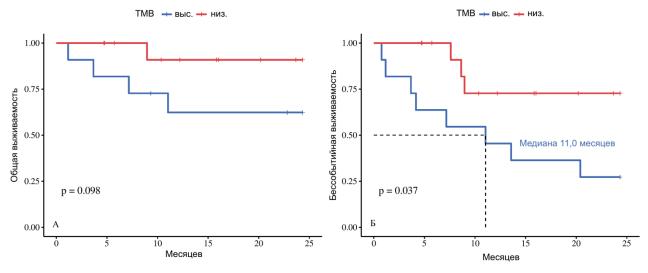


Рисунок 6 – Двухлетние OB (A) и БСВ (Б) в зависимости от величины TMB

идентификации биологических клеточных процессов, в лимфомагенез, у исследуемой выборки пациентов (n = 26), в отношении генов (n = 23), мутации которых наблюдались у двух и более пациентов (из анализа исключались мутации, выявленных только у одного больного, в связи с большой вероятностью случайности события), проводился анализ GSEA с применением следующих источников онтологий: Gene Ontology (GO) Biological Processes, KEGG Pathway, Reactome Gene Sets, Canonical Pathways и WikiPathways. Гены всего генома были использованы в качестве фона обогащения. Три и более гена с р-значением < 0.01 и коэффициентом обогащения > 1.5 (коэффициент обогащения представляет собой отношение между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами группируются распределения) собираются И В кластеры основе их функциональной принадлежности. В частности, р-значения вычисляются на основе кумулятивного гипергеометрического распределения [Zar J.H. et al., 1999], а значения q определяются с использованием поправки Бенджамини-Хохберга. Суммарно анализ GSEA выявил 271 возможный аннотируемый биологический процесс с вовлечением трех и более генов. Наиболее обогащенными путями, связанными с лимфомагенезом, по результатам GSEA являлись: регуляция клеточной активации ($-\log_{10}(q$ -значение) = 6,357), ремоделирование хроматина ($-\log_{10}(q$ -значение) = 5,707), модификация гистонов ($-\log_{10}(q$ -значение) = 4,569), общие пути при раке $(-\log_{10}(q-3) + \log_{10}(q-3))$, регуляция микроРНК при раке $(-\log_{10}(q-3))$ значение) = 2,960), JAK-STAT сигнальный путь ($-\log_{10}(q$ -значение) = 2,674) и другие.

Для визуализации ассоциаций между мутировавшими генами и клеточными путями, мы построили диаграмму Sankey (рисунок 7). Наибольший размер узлов левой половины графика имеют гены *МҮС*, *CREBBP*, *EZH2*, *KMT2D*. Ген *МҮС* представляет собой транскрипционный фактор, являющийся протоонкогеном и регулирующий процессы прогрессирования клеточного цикла, апоптоза и клеточной трансформации. Изменения гена *МҮС* характерны для большинства онкологических новообразований (около 70% всех известных форм рака) [Posternak V. et al., 2018], а его повышенная экспрессия наблюдается при вовлечении в онкогенез большого количества сигнальных клеточных путей. Гены *CREBBP*, *EZH2* и *KMT2D* являются ключевыми генами, вовлеченными в патогенез ФЛ и, как показано нами ранее, одними из наиболее часто мутирующих. Таким образом, мутации в генах *МУС*, *CREBBP*, *EZH2* и *KMT2D* могут приводить к дисрегуляции в нескольких внутриклеточных процессах, опосредуя более сложные молекулярные изменения при ФЛ.

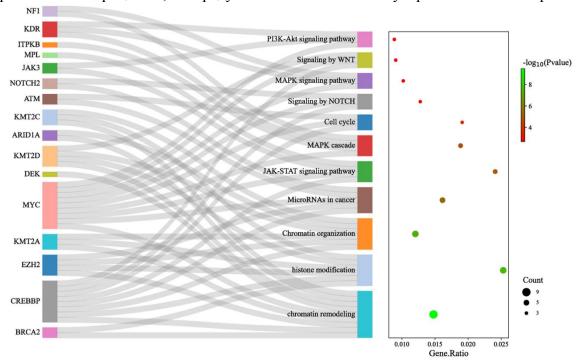


Рисунок 7 – Диаграмма Sankey, демонстрирующая вовлеченность мутировавших генов в основные онкогенные пути

Таким образом, с помощью NGS нами была оценена распространенность мутаций генов у пациентов с $\Phi \Pi$, разработан алгоритм оценки TMB и доказана ее прогностическая значимость.

КЛИНИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА У ПАЦИЕНТОВ С ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ

Сравнительная характеристика клинических факторов прогноза

Учитывая индолентный характер течения ФЛ в отношении анализа ОВ оценивали влияние факторов на пятилетнем интервале наблюдения, в отношении ВБП, ВБР и БСВ оценка факторов проводилась на двухлетнем временном промежутке. В однофакторном регрессионном анализе на пятилетнюю ОВ оказывали значимое влияние лейкемический состав крови (OP 3,43, p = 0.008), цитологический тип (в частности 3B, OP 6.51, p = 0.023), наличие экстранодального поражения (ОР 2,25, p = 0,027), уровень гемоглобина (ОР 3,33, р = 0,014) и некоторые другие, но с меньшим значением ОР. Анализ пятилетней ОВ в соответствии с прогностическими системами PRIMA-PI и RSM, включающих два и три фактора риска соответственно, не показал значимых различий (р > 0,05). Напротив, прогностические индексы с большим количеством факторов, стратифицирующие больных на три группы риска, FLIPI (p = 0.00052), FLIPI-2 (p = 0.0056), FLIPI-L (p < 0.001), FCG (p = 0.004) и на две группы – FLEX (p = 0.049), продемонстрировали достоверно значимое распределение пациентов на прогностические группы в анализе пятилетней ОВ. В многофакторном анализе ($\chi^2 = 26,123$, p = 0,001) значимое влияние на пятилетнюю OB оказывали лейкемический состав крови (OP 6,73 (95% ДИ: 1,93-23,53), p = 0,003) и 3В цитологический тип (OP 8,18 (95% ДИ: 0,91–73,50), p = 0,061).

Среди параметров, достоверно влияющих на двухлетнюю ВБП по данным однофакторного регрессионного анализа, были: лейкемический состав крови (OP 2,63, p=0,027) и наличие экстранодального поражения (OP 2,24, p=0,014). В отношении двухлетней ВБП статистическую достоверность продемонстрировали прогностические системы FLIPI-2 (p=0,0099), FCG (p=0,029) и FLEX (p=0,029). В многофакторном анализе ($\chi^2=13,376$, p=0,001) наличие экстранодальных поражений (OP 2,34, p=0,009) и лейкемический состав крови (OP 2,81, p=0,01) оказывали достоверно значимое влияние на двухлетнюю ВБП.

На длительность двухлетней БСВ значимо влияет распределение пациентов по прогностическим группам FLIPI-2 ($p=0{,}0095$) и FCG ($p=0{,}021$). В многофакторном анализе ($\chi^2=8{,}339,\ p=0{,}04$) в отношении прогнозирования двухлетней БСВ лейкемический состав крови был единственным достоверно значимым параметром (OP 2,64, $p=0{,}016$).

Среднее значение (5,54 мг/л) и медиана (5,18 мг/л) β 2-МГ значительно превышали верхний показатель (2,64 мг/л) референтного интервала. Учитывая данный аспект, мы провели ROC-анализ с целью определения прогностически значимого уровня β 2-МГ в отношении пятилетних ОВ и ВБП. При значении β 2-МГ, равном 4,59 мг/л, чувствительность составила 69,2% и 67,4%, специфичность была 51,1% и 52,0% соответственно. AUC равнялась 0,592 (95% ДИ: 0,456–0,727), p = 0,154 и 0,586 (95% ДИ: 0,474–0,698), p = 0,121 соответственно. Таким образом, все пациенты (n = 118) были разделены на две группы: пациенты с низким (< 4,59 мг/л) уровнем β 2-МГ – 53 (44,9%) больных и пациенты с высоким ($\ge 4,59$ мг/л) значением β 2-МГ составила 46,2% (95% ДИ: 33,7–59,0, медиана 54,1 месяца), в контрольной группе – 68,1% (95% ДИ: 53,7–80,1), p = 0,043.

Учитывая неудовлетворительные параметры стратификации пациентов из обследуемой выборки на группы риска с использованием различных прогностических шкал, в том числе FLIPI-2, а также определенное пороговое значение β 2-МГ (4,59 мг/л), нами была предпринята попытка модификации данной прогностической системы, согласно которой бал суммирования для β 2-МГ зависит от того, в какой из интервалов попадает его значение: 0–2,64 мг/л –

0 баллов, 2,65–4,58 мг/л − 0,5 баллов, \geq 4,59 мг/л − 1 балл. Использование шага суммирования 0,5 вместо 1 основано на двух аспектах. Во-первых, ОР в базовом FLIPI-2 для каждого из пяти факторов лежал в диапазоне от 1,38 до 2,04, то есть вклад каждого фактора в модель был соизмеримым. Использование 2-х бальной системы оценки для фактора β2-МГ искусственно повышает вклад данного параметра в общий исход. Во-вторых, проведенный нами ROC-анализ в отношении пятилетних ОВ и ВБП показал, что при кодировании β2-МГ значениями 0, 0,5 и 1 в индексе FLIPI-2 площадь под кривой составила 0,696 (95% ДИ: 0,599–0,793), р < 0,001 и 0,652 (95% ДИ: 0,554–0,749), р = 0,002 соответственно, а при кодировании значениями 0, 1 и 2 AUC равнялась 0,673 (95% ДИ: 0,568–0,777), р = 0,001 и 0,632 (95% ДИ: 0,532–0,733), р = 0,01 соответственно. Остальные параметры индекса FLIPI-2 и правила начисления баллов оставили без изменений.

Сравнивали шесть моделей (рисунок 8): 1) базовый FLIPI-2, 2) FLIPI-2 с распределением на две группы (FLIPI-2_2gr), 3) FLIPI-2 с интервальной оценкой β 2-микроглобулина (0, 1, 2 балла) и распределением на три группы (FLIPI-2_Int(0-2)_3gr), 4) FLIPI-2 с интервальной оценкой β 2-микроглобулина (0, 1, 2 балла) и распределением на две группы (FLIPI-2_Int(0-2)_2gr), 5) FLIPI-2 с интервальной оценкой β 2-микроглобулина (0, 0,5, 1 балл) и распределением на три группы (FLIPI-2_Int(0-1)_3gr) и 6) FLIPI-2 с интервальной оценкой β 2-микроглобулина (0, 0,5, 1 балл) и распределением пациентов на 2 группы риска (FLIPI-2_Int(0-1)_2gr).

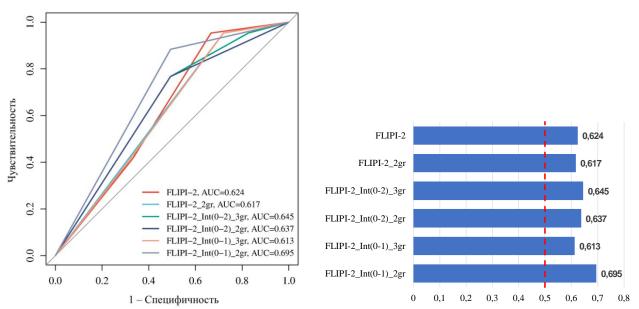


Рисунок 8 – ROC-кривые шести моделей (пояснение в тексте) в отношении пятилетней ВБП и общее качество модели (качественная модель характеризуется AUC > 0,5)

Таким образом, согласно результатам ROC-анализа наиболее качественной моделью прогнозирования риска является FLIPI-2 с интервальной оценкой β 2-микроглобулина (0, 0,5, 1 балл) и распределением больных на две группы (FLIPI-2_Int(0-1)_2gr – модифицированный FLIPI-2 или сокращенно FLIPI-2 mod.). Пятилетняя ВБП в группе низкого риска составила 87,6% (95% ДИ: 74,9–96,1), в группе высокого риска – 37,4% (95% ДИ: 24,0–46,5, медиана 34,4 месяца), р < 0,0001 (рисунок 9). Полученная модель продемонстрировала устойчивые результаты стратификации в том числе в анализе пятилетних ОВ (р < 0,0001), БСВ (р < 0,00025) и ВБР (р = 0,0062).

Таким образом, нами были выявлены наиболее значимые клинические параметры, определяющие прогноз у больных $\Phi \Pi$. Мы показали, что для пациентов с $\Phi \Pi$ значение $\beta 2$ -M Γ , равное 4,59 м Γ /л, имеет большую прогностическую роль, чем верхняя граница референтного интервала. Основываясь на полученных результатах, нами был разработан

прогностический индекс FLIPI-2 mod. с более дифференцированной оценкой β2-МГ и стратифицирующий пациентов на две группы риска.

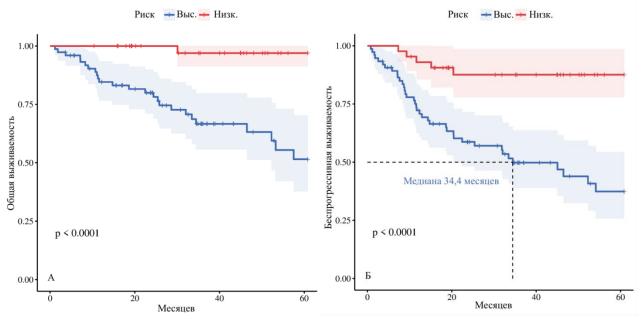


Рисунок 9 – Пятилетние OB (A) и ВБП (Б) в зависимости от группы риска FLIPI-2 mod.

Эффективность стандартных режимов иммунохимиотерапии у больных фолликулярной лимфомой

В сравнительный анализ оценки эффективности режимов терапии включено 117 пациентов, среди которых у 45 (38,5%) больных применялась схема RB, у 72 (61,5%) — режим R-CHOP. Обе группы были сопоставимы по абсолютному большинству исследуемых параметров, а достоверные межгрупповые различия отмечались в отношении возраста (p=0,001) и цитологического типа (p=0,005). Данное обстоятельство обусловлено тем, что у более молодых пациентов с ФЛ низкой степени клеточной дифференцировки (3A–3B цитологический тип) чаще отдавалось предпочтение режиму ИХТ R-CHOP, как более эффективному (лечение ФЛ 3B типа соответствует терапии диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы), а в старшей возрастной группе пациентов с ФЛ 1–2 цитологического типа чаще использовался режим ИХТ RB. Медиана времени, в течение которого сохранялся ЧО, в группе R-CHOP равнялась 20,1 месяцев (4,4; 72,2) и была достоверно выше, чем в группе RB – 8,5 месяцев (2,3; 24,2), p=0,03. Также режим R-CHOP характеризовался большей ЧОО (p=0,032). Отмечалась тенденция к улучшению пятилетней ОВ в группе R-CHOP, p=0,084.

Нами было показано, что поддерживающая терапия ритуксимабом после R-CHOP и после RB значительно улучшает показатели выживаемости (таблица 5).

Таблица 5 – Степень достоверности различий в анализе выживаемости в группах R-CHOP

и RB в зависимости от поддерживающей терапии (ПТ) или наблюдения

Параметр	R-CHOP +ПТ против RB +ПТ	R-CHOP +	R-CHOP +	R-CHOP + ΠΤ
		наблюдение против	наблюдение	против RB +
		RB + наблюдение	против RB + ПТ	наблюдение
5-летняя ОВ	p = 0.399	p = 0.704	p = 0.314	p = 0.003*
5-летняя ВБП	p = 0.751	p = 0,693	p = 0.046*	p = 0.001*
5-летняя ВБР	p = 0.463	p = 0,628	p < 0,001*	p < 0,001*
5-летняя БСВ	p = 0.287	p = 0,227	p < 0,001*	p = 0.022*

Примечание: БСВ — бессобытийная выживаемость, ВБП — выживаемость без прогрессирования, ВБР — выживаемость без рецидива, ОВ — общая выживаемость, * — различия между группами достоверны (р \leq 0,05)

АЛГОРИТМ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ

Клинические особенности и течение *BCL2*-негативной и CD23-позитивной фолликулярной лимфомы

Перестройки гена BCL2 и экспрессия CD23 были одновременно оценены у 95 пациентов, в группу BCL2—CD23+ вошло 40 (42,1%) больных, в контрольную группу (все оставшиеся варианты сочетаний BCL2 и CD23) – 55 (57,9%). Обе группы значимо не различались по половозрастному составу, p > 0,05. У пациентов из группы BCL2—CD23+ отмечалась более низкая частота лейкоцитоза в дебюте заболевания – 13,9% против 37,0%, p = 0,018. Обе группы значимо различались по количеству лимфоцитов и распространенности IV стадии, которые в группе BCL2—CD23+ были достоверно ниже, чем в контрольной группе, p = 0,008 и p = 0,033 соответственно. У пациентов из группы BCL2—CD23+ частота ПО и ЧОО были выше (67,5% и 92,5% соответственно), чем в контрольной группе (54,5% и 80,0% соответственно), однако различия недостоверны, p = 0,289 и p = 0,142 соответственно. Пятилетняя ОВ в группе BCL2—CD23+ составила 69,8% (95% ДИ: 53,5–83,4), в контрольной группе достигла 60,3% (95% ДИ: 45,9–73,0), p = 0,187. Пятилетняя ВБП также была лучше в группе BCL2—CD23+ и равнялась 62,8% (95% ДИ: 45,8–77,3) против 48,3% (95% ДИ: 35,4–62,9, медиана 46,5 месяцев) в контроле, p = 0,066.

Не было выявлено преимущества в использовании какого-либо из режимов ИХТ в первой линии в группе BCL2–CD23+. Показатели пятилетней OB (p = 0,663), ВБП (p = 0,645) и БСВ (p = 0,723) значимо не различались у пациентов из группы BCL2–CD23+, получивших в качестве индукционной терапии режим RB или R-CHOP.

Таким образом, нами были исследованы клинические особенности пациентов с BCL2-негативной CD23-позитивной ФЛ, определен прогноз в данной группе и проведена оценка эффективности ИХТ первой линии.

Разработка алгоритма лечения пациентов с фолликулярной лимфомой

Выявленные в ходе исследовательской работы закономерности использованы в разработанном алгоритме терапии первой линии у некоморбидных пациентов (значимая коморбидность в общей выборке с суммой баллов ≥ 4 по шкале Charlson отмечалась у 10,5% пациентов) с ФЛ возрастом до 70 лет (только 16,0% пациентов были старше 70 лет). Из алгоритма были исключены пациенты с I стадией (Ann Arbor) по причине низкой встречаемости (3/144) и невозможности провести сравнительный анализ (рисунок 10). Нами было оценено 30 пациентов с ФЛ 3А цитологического типа. Течение лимфомы в данной группе соответствовало течению заболевания у больных с 1-2 цитологическим типом. ДИ: 54,1-87,7; медиана не достигнута), Пятилетняя ОВ составила 73,0% (95% что соответствовало пятилетней ОВ у пациентов с 1-2 цитологическим типом - 74,3% (95% ДИ: 64,6-82,4; медиана не достигнута), p = 0,816, и была достоверно выше,чем у пациентов с 3В цитологическим типом (36,4%), p = 0,022. В анализе пятилетней ВБП были получены аналогичные результаты, уровень достоверности различий между группами составил р = 0,812 и р = 0,027 соответственно. С другой стороны, согласно нашим данным у пациентов с 3А цитологическим типом режим R-CHOP имел большую эффективность, чем RB. В группе R-CHOP двухлетняя OB составила 100% против 71,4% (95% ДИ: 29,0–96,3; медиана не достигнута) в группе RB, p = 0.015.

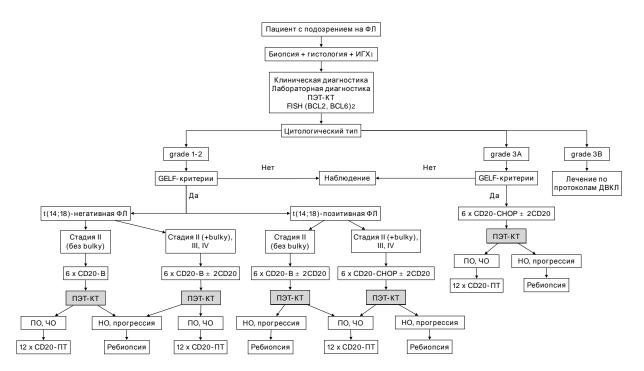


Рисунок 10 – Алгоритм выбора терапии первой линии у некоморбидных пациентов возрастом до 70 лет с II—IV стадией $\Phi \Pi^1$;

С прогностической точки зрения разделение пациентов на группы с наличием или отсутствием транслокации t(14;18) не является целесообразным, так как прогноз в обеих группах одинаковый. Однако, как было показано нами ранее, у t(14;18)-позитивных пациентов эффективность терапии R-CHOP достоверно выше, чем RB, p=0,0013. У t(14;18)-негативных больных оба режима имеют схожую эффективность, p>0,4. Следовательно, для пациентов с наличием t(14;18) или мутацией гена BCL2, а также с распространенными стадиями или с большой опухолевой массой мы предлагаем в качестве индукционной терапии использовать режим R-CHOP с двумя дополнительными введениями ритуксимаба.

Мы не стали выделять в отдельную группу пациентов с BCL2-негативной CD23-позитивной ФЛ, так как лечение данной категории больных соответствует терапии t(14;18)-негативных пациентов: использование R-CHOP в первой линии терапии не добавляет преимущества в выживаемости. Однако пациенты из группы BCL2-негативной CD23-позитивной ФЛ характеризуются незначительно лучшим прогнозом по сравнению с больными без t(14;18) у которых пятилетние OB и БСВ составили 44,6% (95% ДИ: 21,8–66,0, медиана 57,5 месяцев, p=0,101) и 38,5% (95% ДИ: 18,1–61,6, медиана 21,8 месяцев, p=0,077) соответственно. Также нами ранее было показано, что добавление поддерживающей терапии анти-CD20-МКАТ (ритуксимаб) как после RB, так и после R-CHOP достоверно улучшает результаты лечения пациентов с ФЛ, что и отражено в предлагаемом алгоритме.

Таким образом, разработан алгоритм терапии пациентов с ФЛ, учитывающий данные молекулярно-генетических исследований, что, несомненно, соответствует вектору развития таргетной и персонифицированной терапии в онкогематологии.

 $^{^1}$ Сокращения: НО – нет ответа (стабилизация), ПО – полный ответ, ЧО – частичный ответ, ПТ – поддерживающая терапия, GELF — критерии начала терапии ФЛ; CD20 — терапевтическое анти-CD20 антитело; Примечание: 1 — Используется ИГХ-панель следующих антител: CD5, CD10, CD20, CD23, Bcl-2 (124), Bcl-6, Cyclin D1, дополнительно: Bcl-2 (E17), HGAL, LMO2; 2 — При выявлении методом FISH перестроек гена *BCL6*, дополнительно необходимо оценить наличие реаранжировки гена *MYC*.

выводы

- 1. Определена частота встречаемости перестроек генов BCL2, BCL6 и del17p/TP53, которая по данным FISH-исследования составляет 41,0%, 14,1% и 14,0% соответственно. Прогностически наиболее неблагоприятной группой является сочетание изменений в генах BCL2 и BCL6 (p < 0,046). Частота мутаций гена EZH2 согласно результатам секвенирования по Сэнгеру составляет 17%, по данным секвенирования следующего поколения 12%. У пациентов с мутацией гена EZH2 (Y646X) отмечается достоверно лучший прогноз (p < 0,041), а наличие данного фактора снижает риск смерти или иного неблагоприятного события в четыре раза и более (p < 0,03).
- 2. Наибольшая частота мутаций выявлена в генах *КМТ2С*, *КМТ2D*, *СREBBP*, а более частые аберрации характеры в путях клеточной активации, ремоделирования хроматина и модификации гистонов по результатам анализа обогащения набора генов. Высокая опухолевая мутационная нагрузка как интегральный показатель, отражающий мутационный профиль опухоли, является статистически достоверным неблагоприятным прогностическим фактором у пациентов с фолликулярной лимфомой (р = 0,037).
- 3. Наиболее значимыми клиническими факторами риска фолликулярной лимфомы являются лейкоцитоз в дебюте заболевания и цитологический тип. Установлено, что у пациентов с t(14;18) эффективность режима R-CHOP достоверно выше, чем RB (p=0,0013). Поддерживающее лечение терапевтическими анти-CD20-моноклональными антителами, как после RB (p<0,02), так и после R-CHOP (p<0,023) достоверно улучшает выживаемость пациентов с фолликулярной лимфомой вне зависимости от глубины достигнутого ответа.
- 4. Создана модифицированная модель FLIPI-2 mod. для прогнозирования беспрогрессивной выживаемости на основе прогностического индекса фолликулярной лимфомы FLIPI-2, стратифицирующая пациентов на две группы риска (p < 0,0001) и имеющая высокую прогностическую ценность в отношении общей (p < 0,0001), безрецидивной (p = 0,0062) и бессобытийной (p = 0,00025) выживаемости у пациентов с фолликулярной лимфомой.
- 5. Разработан алгоритм терапии фолликулярной лимфомы, ключевой наличия транслокации особенностью которого является определение t(14;18), обуславливающей выбор влияющей на эффективность стандартных программ И иммунохимиотерапии (p = 0.0013).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1. В дебюте заболевания у пациентов с фолликулярной лимфомой важно определять наличие перестроек генов *BCL2* и *BCL6*, используя комплексный подход при генетической диагностике: в случае неинформативности стандартного цитогенетического анализа или FISH-исследования, применять более точные методы молекулярного обследования секвенирование по Сэнгеру или секвенирование следующего поколения.
- 2. Высокую опухолевую мутационную нагрузку, рассчитываемую по результатам секвенирования следующего поколения, следует использовать в качестве обоснования назначения более интенсифицированного лечения, а выявленный мутационный профиль для применения таргетных методов терапии.
- 3. С целью определения группы риска и прогнозирования выживаемости у пациентов с фолликулярной лимфомой целесообразно применять модифицированную шкалу FLIPI-2 mod. Разработанный прогностический индекс более удобен для рутинного применения так как стратифицирует пациентов на две группы риска (вместо трех) и имеет большую точность в сравнении с базовым индексом FLIPI-2.
- 4. У пациентов с II–IV стадиями заболевания рекомендуется применять предлагаемый алгоритм терапии первой линии, согласно которому при выявлении транслокации t(14;18) может применяться режим CHOP с добавлением таргетного анти-CD20-

моноклонального антитела. У пациентов с 3A цитологическим типом в качестве терапии первой линии может использоваться иммунохимиотерапия R- или G-CHOP на базе таргетного анти-CD20-моноклонального антитела. Согласно алгоритму, при достижении полного или частичного ответа показана поддерживающая терапия анти-CD20-моноклональными антителами.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты, полученные в рамках проведенного диссертационного исследования, послужат основой для продолжения изучения прогностических факторов и систем, учитывающих биологические параметры опухоли и пациента с целью совершенствования персонифицированного подхода к лечению больных фолликулярной лимфомой, а также разработки таргетной и эпигенетической терапии. Актуальными темами для дальнейшего изучения являются:

- 1. Изучение механизмов регуляции транскрипции генов с целью разработки более эффективной терапии.
- 2. Исследование функционирования сигнальных клеточных путей у пациентов с фолликулярной лимфомой при прогрессировании, рецидиве или трансформации.
- 3. Разработка унифицированного алгоритма определения опухолевой мутационной нагрузки у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, как значимого прогностического параметра и предиктора, обуславливающего необходимость эскалации терапии.
- 4. Изучение эффективности комбинации таргетной и эпигенетической терапии у пациентов с фолликулярной лимфомой.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1. Куневич, Е.О. Частота встречаемости и прогностическая значимость мутаций гена ЕZH2 у больных фолликулярной лимфомой / Е.О. Куневич, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич, С.Ю. Линников, А.Ю. Кувшинов, М.А. Михалева, С.В. Сидоркевич // Вестник гематологии. -2022. Т. 18, № 2. С. 63.
- 2. Куневич, Е.О. Прогностическая роль мутаций гена ЕZH2 при фолликулярной лимфоме / Е.О. Куневич, И.С. Мартынкевич, С.В. Волошин // Гематология и трансфузиология. -2022. T. 67, № S2. C. 237-238.
- 3. Kunevich, E.O. Study of genetic alterations using a custom lymphoid targeted NGS panel in patients with follicular lymphoma: a pilot study / E. Kunevich, I. Martynkevich, E. Motyko, M. Mikhaleva, S. Voloshin, S. Sidorkevich // Hemasphere. − 2023. − Vol. 7, № S.3. − P. 4545–4546. Doi: 10.1097/01.HS9.0000976272.40343.c1.
- 4. Kunevich, E.O. Evaluation of the efficacy of SARS-COV-2 vaccination in patients with follicular lymphoma during the era of the COVID-19 pandemic / E. Kunevich, I. Martynkevich, A. Kuvshinov, S. Voloshin, S. Sidorkevich // Hemasphere. − 2023. − Vol. 7, № S.3. − P. 1573. Doi: 10.1097/01.HS9.0000973168.29649.6a.
- 5. Куневич, Е.О. Оценка прогностической значимости мутаций гена ЕZH2 у больных фолликулярной лимфомой / Е.О. Куневич, И.С. Мартынкевич, Е.В. Мотыко, А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, С.Ю. Линников, И.И. Кострома, С.В. Сидоркевич // Вестник гематологии. -2023. Т. 19, № 2. С. 86-87.
- 6. Куневич, Е.О. Изучение мутационной нагрузки с использованием кастомной лимфоидной таргетной NGS-панели у пациентов с фолликулярной лимфомой: пилотное исследование / Е.О. Куневич, И.С. Мартынкевич, Е.В. Мотыко, М.А. Михалева, С.В. Волошин, С.В. Сидоркевич // Вестник гематологии. − 2023. − Т. 19, № 2. − С. 87–88.
- 7. Куневич, Е.О. EZH2 новая мишень таргентного воздействия при фолликулярной лимфоме: обзор литературы и собственные данные / Е.О. Куневич,

- С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич, Е.В. Мотыко, Д.В. Барам, А.Ю. Кувшинов, С.В. Сидоркевич // Medline.ru. 2023. Т. 24, статья 84. С. 1223–1236.
- 8. Куневич, Е.О. Прогноз у пациентов с фолликулярной лимфомой в зависимости от мутационного статуса гена EZH2 / Е.О. Куневич, И.С. Мартынкевич, С.В. Волошин, Е.В. Мотыко, Ю.А. Криволапов, А.Н. Богданов, С.В. Сидоркевич // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. 2023. Т. 9, № 3. С. 267—283. https://doi.org/10.34883/PI.2023.9.3.008.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БСВ -бессобытийная выживаемость

ВБП – выживаемость без прогрессирования

ВБР – выживаемость без рецидива

ДИ – доверительный интервал

ИХТ – иммунохимиотерапия

МКАТ – моноклональное антитело

ОВ – общая выживаемость

ОР – относительный риск

ОШ – отношение шансов

ПЗ – прогрессирование заболевания

ПО – полный ответ

ФЛ – фолликулярная лимфома

ЧО – частичный ответ

ЧОО – частота объективных ответов

AUC – area under curve (площадь под кривой)

FISH – fluorescence in situ hybridization (флюоресцентная in situ гибридизация)

FLIPI – follicular lymphoma international prognostic index (международный прогностический индекс фолликулярной лимфомы)

GSEA – gene set enrichment analysis (анализ обогащения набора генов)

Mb – Megabase (Мегабаза)

NGS – next generation sequencing (секвенирование следующего поколения)

ROC – receiver operating characteristic (рабочая характеристика приемника)

TMB – tumor mutation burden (опухолевая мутационная нагрузка)

VAF – variant allele frequency (частота встречаемости аллеля)

 $\beta 2$ -М Γ — бета-2-микроглобулин