ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

На правах рукописи

КУНЕВИЧ ЕВГЕНИЙ ОЛЕГОВИЧ

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

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
3.1.28. Гематология и переливание крови

Научные руководители:
Сидоркевич Сергей Владимирович,
доктор медицинских наук

Мартынкевич Ирина Степановна,
доктор биологических наук

Санкт-Петербург — 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……..4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ И ТЕРАПИИ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЫ…….……11
1.1 Молекулярный патогенез фолликулярной лимфомы……..……11
1.2 Лечение фолликулярной лимфомы……....16
1.3 Перспективные методы терапии фолликулярной лимфомы……...18
ГЛАВА 2. ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА У БОЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ……...26
2.1 Характеристика прогностических индексов фолликулярной лимфомы……....…26
2.2 Мутации гена *EZH2* и их прогностическое значение……32
2.2.1 Частота и патогенетическая значимость мутаций гена *EZH2* у больных фолликулярной лимфомой……..……32
2.2.2 Влияние мутаций гена *EZH2* на прогноз фолликулярной лимфомы……...37
2.2.3 Возможности терапии фолликулярной лимфомы с учетом нацеливания на EZH2……..38
ГЛАВА 3. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ……....40
3.1 Характеристика исследуемой группы……40
3.2 Лабораторные методы исследования……48
3.2.1 Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH)…….....49
3.2.2 Секвенирование по Сэнгеру……....50
3.2.3 Секвенирование следующего поколения (NGS) ……...……51
3.3 Статистическая обработка результатов исследования……52
ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА У ПАЦИЕНТОВ С ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ……...……54
4.1 Прогностическая значимость перестроек генов *BCL2*, *BCL6* и del17p/*TP53*……..54
4.2 Частота мутаций гена *EZH2* и их прогностическая роль……..58
4.3 Возможности применения секвенирования следующего поколения (NGS) у больных фолликулярной лимфомой……....66
ГЛАВА 5. КЛИНИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА У ПАЦИЕНТОВ С ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ…….…..…79
5.1 Сравнительная характеристика клинических факторов прогноза…….……..79
5.2 Эффективность стандартных режимов иммунохимиотерапии у больных фолликулярной лимфомой……...…….…97
ГЛАВА 6. АЛГОРИТМ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ…....108

6.1 Клинические особенности и течение *BCL2*-негативной и CD23-позитивной фолликулярной лимфомы……...……....…..108

6.2 Разработка алгоритма лечения пациентов с фолликулярной лимфомой……..110

ЗАКЛЮЧЕНИЕ……...……114

ВЫВОДЫ…….122

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ……..……123

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ……..…….124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ……...……....125

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……...127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Фолликулярная лимфома (ФЛ) – неходжкинская В-клеточная лимфома, возникающая из клеток герминальных центров (ГЦ) лимфатических фолликулов и характеризующаяся индолентным течением. Занимает второе место по частоте встречаемости в структуре всех неходжкинских лимфом (НХЛ). Около 20% случаев ФЛ характеризуются рецидивирующим и рефрактерным течением, а до 30% (2% в год) – подвергаются трансформации в агрессивные варианты В-клеточных лимфом [3, 12, 26, 54, 213]. Таким образом, идентификация молекулярно-генетических изменений, которые приводят к рецидивированию, трансформации и рефрактерности к лекарственному воздействию, 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 транслокации 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)-содержащих В-лимфоцитов [104, 196, 229, 230]. Однако по имеющимся данным для развития ФЛ также необходимы дополнительные генетические события. Было показано, что мутации в генах *KMT2D*, *CREBBP* и *EZH2*, контролирующих процессы эпигенетической регуляции транскрипции ключевых генов сигнальных путей, являются дополнительными факторами, предрасполагающими к неконтролируемой лимфопролиферации и канцерогенезу [2, 42, 45, 105, 145, 177, 222].

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 [4, 43, 44, 162]. Данные генетические изменения приводят к неконтролируемой пролиферации В-клеток ГЦ и образованию злокачественного клона [49, 201, 215, 241]. Недавно был разработан прогностический индекс m7-FLIPI, включающий мутационный статус 7 генов (*EZH2, ARID1A, MEF2B, EP300, FOXO1, CREBBP, CARD11*), который продемонстрировал, что у пациентов с высоким уровнем риска FLIPI, получающих ритуксимаб в комбинации со стандартными режимами химиотерапии, наличие мутация гена *EZH2* приводило к лучшему прогнозу, чем аллель дикого типа [119, 120, 137, 183, 189].

Изменение парадигмы терапевтических подходов при ФЛ, включение новых таргетных препаратов [81, 122, 141] в программы лечения рецидивирующих и 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 [116, 166]. Всё вышеизложенное позволяет считать мутации гена *EZH2* возможным предиктором эффективности стандартной иммунохимиотерапии (ИХТ) и одной из основных мишеней терапевтического воздействия у больных ФЛ. Планируемое исследование позволит оценить частоту встречаемости мутаций гена *EZH2* при ФЛ и их влияние на особенности клинического течения заболевания.

Несмотря на достигнутые успехи в диагностике и лечении, ФЛ остается крайне неоднородным заболеванием с различными вариантами течения [12, 26, 213]. 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, которые воздействуют на генетические детерминанты заболевания, и в конечном итоге улучшить показатели выживаемости.

Специфическими для пациента параметрами, связанными с особенностями течения ФЛ, являются опухолевая нагрузка [147, 174, 217], гистологический тип и стадия [217, 234], а также опухоль-ассоциированные маркеры [29, 125, 187, 188, 216]. Клинические прогностические показатели, такие как Международный прогностический индекс фолликулярной лимфомы (FLIPI) [217] и FLIPI-2 [78] не учитывают биологические параметры опухоли, обуславливающие эволюцию ФЛ, и сами по себе недостаточны для учета наблюдаемых различий в выживаемости у отдельных пациентов. Исследования экспрессии генов [45, 177] установили важность микроокружения опухоли в определении прогноза заболевания, а работы по секвенированию следующего поколения (NGS) выявили многочисленные мутационные события, происходящие 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 [109, 159, 183]. 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 множество работ, посвященных изучению факторов риска у пациентов с ФЛ [34, 51, 148, 158, 188, 217, 234 и др.]. Разработаны прогностические системы, применяемые как в рутинной практике, так и в клинических исследованиях (FLIPI, FLIPI-2, PRIMA-PI) [29, 78, 217]. Полученные данные о влиянии микроокружения опухоли на ее эволюцию находят применение в создании биологических моделей прогноза (Bio-FLIPI, m7-FLIPI) [159, 183]. 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 [29, 24, 78, 156], так как в современных условиях для большинства пациентов с ФЛ характерно длительное бессобытийное течение заболевания [12, 213].

Внедрение в клиническую практику технологий NGS позволило исследователям идентифицировать множество повторяющихся соматических мутаций, которые раскрыли новые механизмы молекулярного патогенеза ФЛ [45, 177]. Благодаря NGS получены данные о прогностической роли мутаций генов, определены вероятные мишени для таргетной терапии [71, 95, 96, 132, 151]. Недавно был одобрен для использования в клинической практике ингибитор продукта гена *EZH2* – таземетостат, применяемый у пациентов с ФЛ во второй и более линии терапии [116, 166]. Однако до сих пор не существует однозначного мнения в отношении влияния мутаций гена *EZH2* на прогноз и течение ФЛ при различных вариантах терапии [120, 137, 183, 189]. 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 ФЛ с применением методов секвенирования по Сэнгеру и NGS. Доказана прогностическая роль мутаций гена *EZH2* у пациентов с ФЛ 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 ФЛ в возрасте до 70 лет.

Теоретическая и практическая значимость работы

Оценена распространенность перестроек генов *BCL2, BCL6, TP53* и мутаций гена *EZH2* в когорте больных ФЛ, проживающих в 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-МКАТ 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 взглядах на этиологию, патогенез и принципы лечения лимфопролиферативных новообразований (ЛПН). В работе использованы клинико-лабораторные, цитоморфологические, цитофлуориметрические, иммунологические, иммуногистохимические (ИГХ) и молекулярно-генетические методы исследования, а также методы статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Мутация гена *EZH2* (p.Y646X) является благоприятным прогностическим фактором, а наличие ассоциации перестроек генов *BCL2* и *BCL6* ухудшает прогноз у пациентов с фолликулярной лимфомой.

2. Данные о наличии мутаций в генах, ассоциированных с патогенезом лимфопролиферативных новообразований и выявляемые методом секвенирования следующего поколения, могут использоваться как интегральный прогностический параметр – опухолевая мутационная нагрузка (TMB). Пациенты с высокой TMB 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-моноклональными антителами после достижения полного или частичного ответа значимо улучшает прогноз у пациентов с ФЛ в независимости от варианта индукционного режима терапии и глубины полученного ответа.

5. Современный алгоритм терапии ФЛ, учитывающий данные молекулярно-генетических 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: II 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), III научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (2023).

Результаты исследования были также 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), EHA2023 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).

По результатам исследования опубликовано 8 научных печатных работ, в том числе 2 научные стать в российских и международных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

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 в практику

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

Личный вклад автора

Автором лично проведены планирование проспективной части исследования, анализ данных литературы, сбор анамнеза и данных ранее выполненных исследований, непосредственное обследование и лечение пациентов, включая процедуры аспирационной и трепанобиопсии, проведение таргетной и ИХТ. Автором подготовлена электронная база данных, осуществлены статистическая обработка, обобщение и оформление результатов исследования, формулировка выводов и подготовка материалов к публикациям.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав обзора литературы, описания методологии и методов исследования, собственных результатов исследования, заключения и выводов, практических рекомендаций и библиографии. Список литературы включает 251 источник литературы, в том числе 22 на русском и 229 на иностранных языках. Работа содержит 51 рисунок и 20 таблиц.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАТОГЕНЕЗЕ И ТЕРАПИИ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЫ

Фолликулярная лимфома – неходжкинская В-клеточная лимфома, происходящая из злокачественно трансформированных центроцитов и центробластов ГЦ лимфатических фолликулов и характеризующаяся индолентным течением [12]. Среди всех НХЛ, ФЛ является второй по распространенности после диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) и наиболее частой среди индолентных лимфом [26]. В США заболеваемость ФЛ с 2000 по 2016 гг. была отмечена на уровне 3,5 случаев на 100 тыс. человек, соотношение мужчин и женщин составило 1,2:1. Наибольшая частота заболеваемости отмечалась среди не испаноязычных представителей белой расы (4,2 на 100 тыс.), наименьшая – среди выходцев из азиатского и тихоокеанского регионов (1,7 на 100 тыс.) [54]. По данным Британской сети по исследованию гематологических злокачественных новообразований (HMRN), в Великобритании заболеваемость ФЛ в период с 2004 по 2012 гг. составила 2,8 на 100 тыс. человек, а трех-, пяти- и десятилетняя распространенность равнялась 9,7, 14,8 и 25,2 на 100 тыс. человек соответственно. Следует отметить, что соотношение мужчин и женщин в данном исследовании составило 0,95:1 [213].

В РФ отмечается более низкая частота встречаемости ФЛ. Так в Северо-Западном регионе РФ доля ФЛ не превышает 11% в структуре всех НХЛ [3]. В Республике Башкортостан ФЛ встречались с частотой 10,9%, что соответствует «азиатскому» типу структуры НХЛ [1]. Медиана возраста на момент диагностики в большинстве исследований составляет 60–65 лет.

На данный момент инициирующее лечение ФЛ включает ИХТ на основе анти-CD20-МКАТ, добавление которых к стандартным режимам химиотерапии значительно улучшает как показатели выживаемости, так и качество жизни [141, 165]. Но, несмотря на одобрение новых таргетных препаратов и внедрение альтернативных режимов лечения, сохраняется риск трансформации Рихтера, а ремиссии ФЛ в 20% случаев носят неустойчивый характер. Все вышесказанное указывает на постоянную потребность во внедрении новых терапевтических подходов у данной категории пациентов.

1.1 Молекулярный патогенез фолликулярной лимфомы

Клетки ГЦ лимфатических фолликулов являются наиболее быстро пролиферирующим типом клеток. ГЦ представляет собой временную структуру, внутри которой В-клетки подвергаются процессам соматической гипермутации вариабельных локусов гена *IGH* [15, 16]. Плотно упакованная область В-клеток (центробласты) называется темной зоной ГЦ [157, 231].

После нескольких раундов деления В-клетки темной зоны перестают пролиферировать и становятся центроцитами, которые во взаимодействии с фолликулярными Т-хелперами (Tfh) и фолликулярными дендритными клетками формируют светлую зону ГЦ. Внутри светлой зоны центроциты конкурируют друг с другом за взаимодействие с ограниченным количеством Tfh, которое основано на аффинности В-клеточного рецептора (BCR) к антигенам, представленным в главном комплексе гистосовместимости (MHC) антигенпрезентирующих клеток. Большинство В-клеток ГЦ не получают костимуляторного сигнала от Т-клеток к дальнейшей дифференцировке и подвергается апоптозу. Клетки, чьи рецепторы имеют наибольшую аффинность по отношению к антигену и, получившие данный костимуляторный сигнал, либо возвращаются в темную зону для дополнительных раундов пролиферации и мутагенеза (*MYC*-зависимый процесс, называемый рециклингом ГЦ), либо выходят из ГЦ и дифференцируются в антитело-секретирующие плазматические клетки [149]. Таким образом, ФЛ характеризуется наличием увеличенных лимфатических фолликулов, с большим количеством аберрантных центроцитов, окруженных сетью фолликулярных дендритных клеток с различным количеством Tfh-клеток [138].

Ключевой особенностью патогенеза ФЛ является реципрокная транслокация t(14;18)(q32.3;q21.3), которая выявляется у 80–85% пациентов и представляет собой одно из ключевых клональных событий лимфомагенеза [229, 230]. В результате данной транслокации к сегменту транскрипционно-активного гена *IGH*, расположенного на длинном плече 14 хромосомы в локусе q32, присоединяется фрагмент протоонкогена *BCL2*, расположенного на длинном плече 18 хромосомы в локусе q21, белковый продукт которого увеличивает число клеток не за счет усиления пролиферации, а путем ингибирования апоптоза [104]. Поскольку V(D)J-рекомбинация (один из этапов созревания аффинитета, который, помимо V(D)J-реаранжировки, включает процессы соматической гипермутации и переключение класса иммуноглобулинов) происходит на ранней стадии развития В-клеток в костном мозге (КМ), то и t(14;18), как первичная генетическая аномалия, ассоциированная с реаранжировкой генов иммуноглобулинового рецептора, также возникает на данной стадии клеточной дифференцировки. Наивные В-клетки, несущие t(14;18), выходят из КМ и колонизируют вторичную лимфоидную ткань, где они вновь возвращаются в ГЦ, имея преимущество в выживании вследствие конститутивной экспрессии *BCL2* [196]. Впоследствии были обнаружены различные варианты транслокаций, встречающиеся у пациентов с ФЛ: t(2;18)(p12;q21), t(18;22)(q21;q11) и некоторые другие [107, 123].

В соответствии с современной концепцией, ФЛ – это клональное заболевание, возникающее из клеток ГЦ лимфатических фолликулов, основополагающим событием которого является сверхэкспрессия гена *BCL2*. Однако было показано, что одной транслокации t(14;18)

недостаточно и для запуска процессов лимфомагенеза необходимы дополнительные события. Это возможно благодаря тому, что В-клетки с t(14;18) способны многократно возвращаться в ГЦ фолликулов и заново проходить этапы гипермутации BCR, что приводит к накоплению новых аберраций, способствующих селекции клеточного клона и развитию ФЛ [196, 222]. Данная гипотеза была подтверждена экспериментально. Во-первых, показано, что в мышиных моделях сверхэкспрессия *BCL2* не приводит к развитию лимфомы [145]. Во-вторых, у части здоровых людей в лимфоидных клетках обнаруживается перестройка гена *BCL2*. Наконец, встречаются варианты лимфом с отсутствием t(14;18) или реаранжировки гена *BCL2*, что предполагает наличие альтернативных генетических событий [42]. Как было отмечено ранее, транслокация t(14;18) редко является единственной цитогенетической аномалией [105]. Показано, что в среднем присутствует 6 дополнительных хромосомных изменений в одном кариотипе. Подавляющее большинство этих аберраций представляет собой несбалансированное увеличение или уменьшение хромосомного материала, а сбалансированные транслокации встречаются довольно редко.

В 1990–2000 гг. разработаны методы высокопроизводительного секвенирования или NGS. Внедрение в клиническую практику технологий NGS позволило исследователям идентифицировать множество повторяющихся соматических мутаций, которые раскрыли новые механизмы молекулярного патогенеза ФЛ. В соответствии с результатами NGS-исследований, нарушение эпигенетической регуляции транскрипции, вероятно, является основополагающим событием на ранних этапах патогенеза, и в более чем 95% случаев клетки ФЛ несут, по крайней мере, одну мутацию в данных генах [2, 45, 177]. Таким образом, вторым принципиальным событием в патогенезе ФЛ является накопление мутаций хотя бы в одном из генов эпигенетической регуляции транскрипции: *KMT2D*, *CREBBP*, *EP300* и *ARID1A*. Частота мутаций гена *KMT2D* (H3-лизин-N-метилтрансфераза 2D) у пациентов с ФЛ составляет около 89% [161]. Аберрации *KMT2D*, как правило, биаллельны с копий-нейтральной потерей гетерозиготности (cnLOH), затрагивающей один аллель, в то время как второй аллель является мишенью усекающей мутации, приводящей к потере ферментативной активности или нарушению экспрессии *KMT2D*. Мыши с нокаутом гена *KMT2D* характеризуются усиленной пролиферацией В-клеток ГЦ, снижением количества клеток с переключением класса BCR, что свидетельствует о блоке дифференцировки В-клеток на стадии ГЦ. Полногеномный и транскриптомный анализ злокачественных новообразований с мутацией гена *KMT2D* продемонстрировал снижение меток моно- и диметилирования H3K4 энхансеров генов-мишеней *KMT2D*, являющихся компонентами внутриклеточных сигнальных путей CD40, JAK-STAT и BCR [179, 246]. Исследование мутаций гена *KMT2D* в момент диагностики и при рецидиве ФЛ показало, что данная мутация является

«ускоряющим» событием, приводящим к формированию агрессивного клона клеток, который затем трансформируется в ФЛ [95].

Частота мутаций гена CREB-связывающего белка (*CREBBP*), расположенного на 16 хромосоме в локусе p13.3 и кодирующего гистонацетилтрансферазу H3K27, составляет 70% [96]. Мутации гена *CREBBP* сгруппированы в основном в каталитическом домене, на который влияет cnLOH, что делает их гомозиготными [90]. Нокдаун гена *CREBBP* снижает степень ацетилирования H3K27 в энхансерных областях генов, которые обычно деактивированы в В-клетках на стадии ГЦ. Таким образом, данные мутации активируют соответствующие гены, поддерживая фенотип, характерный для В-клеток ГЦ [99, 247]. Также было показано, что мутации *CREBBP* подавляют экспрессию генов MHC II класса, приводя к уклонению В-клеток от иммунных реакций в результате снижения инфильтрации опухоли $CD4^+$Т-хелперами и цитотоксическими $CD8^+$Т-клетками [96].

Мутации гена *EP300* (E1A-ассоциированый белок p300), кодирующего гистонацетилтрансферазу, встречаются у 15% пациентов с ФЛ и приводят к деацетилированию гистонов, контролирующих энхансеры соответствующих генов-мишеней, что нарушает процессы пролиферации и дифференцировки В-клеток ГЦ [127, 182]. Механистические исследования, изучающие взаимосвязь между генами *CREBBP* и *EP300*, показывают, что комбинированная потеря *CREBBP* и *EP300* в В-клетках приводит к нарушению формирования ГЦ, предполагая, что данные белки частично компенсируют свои функции через общие транскрипционные мишени [151]. У пациентов с ФЛ также встречаются мутации гена *ARID1A* (член семейства SWI/SNF) и генов, кодирующих линкерные гистоны (HIST1H1B-E), с частотой 10% и 30% соответственно [177]. Мутации *HIST1H1* чаще всего возникают в 5′-конце и приводят к снижению взаимодействия гистона H1 с ДНК-метилтрансферазой 3B (DNMT3B) [132].

Судьба В-клеток во вторичных лимфоидных органах зависит в первую очередь от сродства их поверхностного BCR к антигену. Сила этих взаимодействий (Ig-антиген) регулирует активацию множества взаимосвязанных сигнальных путей и их перекрестное взаимодействие в микроокружении иммунных ниш. Эти пути, включая BCR, CD40, TLR, NOTCH, EphA2 и сигнальные каскады хемокиновых или интерлейкиновых рецепторов, часто аберрантно изменяются при ФЛ. Нарушение регуляции сигнальных каскадов, запускаемых данными рецепторами, имитирует естественную активацию В-клеток и создает новые нефизиологические сигнальные комбинации, которые поддерживают выживание и усиливают пролиферацию опухолевых клеток [71]. Изменение передачи сигнала BCR является третьим ключевым звеном в патогенезе ФЛ. Так, до 80% клеток ФЛ содержат BCR с N-гликозилированными вариабельными областями иммуноглобулинового домена (79% против

9% в нормальных В-клетках) [135]. Данная особенность приводит к усиленной сигнальной активности BCR, более того, поверхностные иммуноглобулины после связывания с лигандом не интернализуются и остаются на поверхности мембраны, что способствует безостановочной передаче сигнала и выживанию клетки. В результате постоянной активации BCR происходит Lyn-опосредованное фосфорилирование активационных тирозин содержащих мотивов иммунорецепторов (ITAM) на молекулах CD79, которые образуют внутриклеточную часть комплекса BCR. Фосфорилированные ITAM представляют собой сайты связывания для тирозинкиназы SYK и других белков, содержащих SH-2 домен [208]. Рекрутированная SYK-киназа фосфорилирует фосфоинозитид-3-киназу (PI3K) [87], в результате чего активируется фосфолипаза С (PLCγ), гидролизующая фосфатидилинозитол (PIP2) на два вторичных медиатора – инозитолтрифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG). Обе реакции регулируются протеинтирозинфосфатазами SHIP1 и PTEN, чьи уровни уравновешиваются определенными микроРНК, включая miR-155, miR-106a, miR-21 и miR-17-92 [170], которые в конечном итоге способствуют передаче сигналов BCR путем нацеливания на фосфатазы. Активность указанных микроРНК может ингибироваться miR-150, являющейся негативным регулятором данного сигнального каскада. Подавление miR-150 в злокачественных В-клетках связано с усиленной передачей сигналов BCR и коррелирует со степенью агрессивности опухоли, а репрессия miR-150 с помощью MYC-опосредованного механизма постоянно наблюдается при трансформированных ФЛ [169]. Регуляция путей BCR/PI3K часто нарушается в В-клетках ФЛ из-за аберраций PTEN или повышенных уровней микроРНК, которые подавляют экспрессию *SHIP1* и *PTEN* [177]. Важность *SHIP1* и *PTEN* в патогенезе ФЛ была убедительно продемонстрирована на мышиных моделях, в которых их совместная делеция приводила к возникновению лимфом, морфологически сходных со зрелыми В-клеточными лимфомами человека, включая ФЛ [154].

Для активации В-клеток помимо BCR необходимы дополнительные стимулы от поверхностных рецепторов, в частности, передача сигнала через CD40-CD40L путь. При ФЛ активность данного сигнального каскада усиливается вследствие повышенной экспрессии CD40L на Tfh, а также в результате мутаций в гене *TNFAIP3*, который инактивирует RIP1 и белки семейства TRAF путем их деубиквитинирования [25]. Позже было показано, что мутации гена *TNFAIP3* чаще встречаются при трансформированных ФЛ, что указывает на их значимость в процессах туморогенеза и эволюции опухоли. Клетки ФЛ часто содержат активирующие мутации или амплификацию гена *CARD11*, который кодирует киназу, непосредственно участвующую в BCR-опосредованной активации путей AKT, NF-kB и mTOR. Мутации гена *CARD11* первоначально были обнаружены в клонах общих предшественников примерно в 10% случаев ФЛ, однако частота его амплификаций значительно возрастает при трансформации

в ДВККЛ [71, 177]. Белковый комплекс mTORC1 играет решающую роль в индукции роста клеток и метаболических процессах, облегчая образование метаболических предшественников в цикле трикарбоновых кислот. Мутации гена *RRAGC* обнаруживаются примерно в 17% случаев ФЛ и часто ассоциированы с мутациями в генах протонного насоса вакуолярной АТФ-азы (v-АТФ-аза): *ATP6V1B2* (11,3%) или *ATP6AP1* (9,9%) [127, 178]. Белки RagA, RagC и v-АТФ-аза участвуют в активации mTORC1 при достаточном количестве питательного субстрата. При этом мутации гена *RRAGC* приводят к усилению функции кодируемого геном белка, в результате чего mTORC1 может активироваться независимо от аминокислотной депривации [178].

1.2 Лечение фолликулярной лимфомы

В настоящее время применение таргентых препаратов является основой терапии ЛПН, поскольку данная концепция позволяет минимизировать побочные системные воздействия химиотерапии [7, 17, 18]. Идея о разработке таргетных методов лечения опухолей начала формироваться в конце XIX в., а в 1907 г. немецкий иммунолог и нобелевский лауреат P. Ehrlich сформулировал свою теорию «волшебной пули» – лекарства, способного действовать на патологический очаг, не затрагивая нормальные клетки [75]. Эта концепция получила дальнейшее развитие благодаря созданию в 1975 г. технологии получения МКАТ G. Köhler и C. Milstein [124]. Первые препараты на основе мышиных МКАТ были использованы у пациентов с лимфомой в 1980 г. [171]. В 1991 г. в лаборатории IDEC Pharmaceuticals было получено химерное IgG1 анти-CD20-МКАТ, в последствии названное ритуксимабом, которое произвело революцию в терапии В-клеточных НХЛ и ФЛ, в частности. Так, 26 ноября 1997 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) ритуксимаб был одобрен в качестве терапии рефрактерной и/или рецидивирующей (р/р) CD20-позитивной В-клеточной лимфомы [97].

Тактика лечения ФЛ зависит от стадии и тяжести заболевания [9]. У пациентов в начальной стадии и с низкой опухолевой нагрузкой можно использовать ритуксимаб в монорежиме [106] при наличии симптомов (GELF-критерии [48]), либо наблюдать [121] при отсутствии показаний к началу терапии. В отношении пациентов с продвинутыми стадиями заболевания и с высокой опухолевой нагрузкой (bulky) стандартом является ИХТ с последующей поддержкой анти-CD20-МКАТ [10, 22]. В исследовании III фазы StiL комбинация ритуксимаба с бендамустином (RB) продемонстрировала более высокую эффективность по сравнению со схемой R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизолон) в виде увеличения выживаемости без прогрессирования (ВБП) (69,5 месяцев против 31,2 месяца) при более высокой частоте ПО (40% против 30%) [200]. Исследование BRIGHT подтвердило

результаты исследования StiL, показав лучшую ВБП в группе RB по сравнению с R-CVP (ритуксимаб, циклофосфамид, винкристин, преднизолон) и R-CHOP (65,5% против 55,8%) и аналогичной пятилетней ОВ (81,7% против 85,0%) [80]. Однако по результатам исследования GALLIUM в паре бендамустин + анти-CD20-МКАТ отмечался более высокий профиль токсичности, что повлекло увеличение смертности в безрецидивный период (5,2% против 1,8%) по сравнению с пациентами, получавшими в качестве химиотерапии CHOP или CVP [80].

Поскольку добавление ритуксимаба к химиотерапии значительно улучшило частоту объективных ответов, длительность ОВ и ВБП, было разработано II поколение анти-CD20-МКАТ – обинутузумаб. В рандомизированном исследовании III фазы GALLIUM обинутузумаб комбинировали с бендамустином, CHOP и CVP и сравнивали с контрольной группой, в которой пациенты принимали ИХТ на основе ритуксимаба. В исследование включались больные с ранее нелеченой ФЛ. Более длительная трехлетняя ВБП наблюдалась в группе пациентов, принимавших обинутузумаб, по сравнению с контрольной группой (80,0% против 73,3%), при этом отсутствовали достоверные различия в ОВ и частоте ПО – 88% в группе обинутузумаба и 87% в группе ритуксимаба [141]. Основываясь на результатах исследования GALLIUM, FDA одобрило обинутузумаб в комбинации с химиотерапией при ранее нелеченой ФЛ.

Идея воздействия на иммунологические ниши привела к созданию нового в своем классе иммуномодулятора – леналидомида. В исследовании SAKK 35/10 комбинация ритуксимаба и леналидомида (R^2) сравнивалась с монотерапией ритуксимабом и продемонстрировала более высокую частоту ПО (36% против 25%) наряду с более длительной ВБП (не достигнута по сравнению с 2,3 года) [122]. В исследовании RELEVANCE комбинация R^2 сравнивалась с R-CHOP, R-CVP или RB в качестве контрольной группы. При одинаковых частотах ПО, ВБП и ОВ, схема R^2 реже приводила к нейтропении и негематологической токсичности, но чаще характеризовалась развитием дерматологических осложнений. Согласно данным рандомизированного многоцентрового двойного слепого исследовании III фазы AUGMENT было показано, что комбинация R^2 превосходила монотерапию ритуксимабом по продолжительности ВБП [130].

Эффективность леналидомида изучалась в комбинации с обинутузумабом в исследовании GALEN (n = 86). ЧОО и частота ПО составила 79% и 38% соответственно. Важно отметить, что у 23% пациентов, включенных в исследование, отмечалась резистентность к ритуксимабу, а у 27% наблюдалось прогрессирование заболевания (ПЗ) в течение 24 месяцев после начала лечения (POD24). ВБП через два года составила 65%, при этом у 34% пациентов наблюдались серьезные нежелательные явления (НЯ), включая базальноклеточную карциному (6%), фебрильную нейтропению (5%) и инфузионные реакции (4%) [163].

В рандомизированном исследовании III фазы GADOLIN сравнивали комбинацию бендамустин + обинутузумаб с монотерапией бендамустином у пациентов с резистентной к ритуксимабу индолентной лимфомой. После среднего периода наблюдения 32 месяца медиана ВБП была значительно выше у пациентов, принимавших комбинированную терапию (25 месяцев против 14 месяцев, $p < 0,001$). Медиана ОВ не достигнута в исследовательской группе по сравнению с 54 месяцами в группе бендамустина [56, 209].

В рандомизированном исследовании II фазы CALGB 50401, в котором оценивалась эффективность монотерапии леналидомидом в сравнении с R^2 у пациентов с рецидивирующей ФЛ ($n = 91$), ЧОО была значительно выше у больных, получавших R^2, чем у пациентов, леченных леналидомидом в монорежиме (76% против 53% соответственно, $p = 0,029$) [82]. При среднем периоде наблюдения 2,5 года медиана времени до ПЗ составила два года в группе R^2 и один год в группе монотерапии леналидомидом.

1.3 Перспективные методы терапии фолликулярной лимфомы

Последние открытия, демонстрирующие сложную взаимосвязь между опухолевой клеткой и ее иммунным микроокружением, привели к быстрому накоплению новых и инновационных таргетных методов лечения, которые используют потенциал иммунной системы для воздействия на злокачественный клон. Тирозинкиназа Брутона (BTK), являющаяся частью сигнального каскада BCR, играет важную роль в процессах пролиферации и выживании. Ибрутиниб – первый необратимый ингибитор BTK, эффективность монотерапии которого (560 мг один раз в сутки) исследовалась у пациентов с р/р ФЛ [35]. Несмотря на хорошую переносимость, ЧОО составила 52,6% среди пациентов чувствительных к ритуксимабу и только 16,7% в группе ритуксимаб-резистентной ФЛ [74]. Примечательно, что пациенты с мутацией в гене *CARD11* не реагировали на терапию ибрутинибом [35], подчеркивая прогностическую ценность генетического профиля при выборе режима терапии. В исследовании II фазы по оценке эффективности и безопасности комбинации ибрутиниба с ритуксимабом у взрослых пациентов с ранее нелеченой ФЛ, которые непрерывно получали 560 мг ибрутиниба один раз в сутки и ритуксимаб в дозе 375 мг/м^2 один раз в неделю в течение четырех недель, начиная с первой недели (группа 1, $n = 60$) или девятой недели (после восьминедельного начального курса ибрутиниба) с целью изучения биомаркеров (группа 2, $n = 20$), первичной конечной точкой исследования была оценка ЧОО. При медиане наблюдения 34 месяца в группе 1 и 29 месяцев в группе 2, ЧОО составила 85% (95% ДИ: 73–93) и 75% (95% ДИ: 51–91) соответственно, при частоте ПО, равной 40% и 50% соответственно. Средняя продолжительность ответа не была достигнута ни в одной из групп. За период наблюдения 30 месяцев ВБП и ОВ составили 67%

и 97% (группа 1) и 65% и 100% (группа 2) соответственно [86]. В настоящее время проходят испытания ингибиторы BTK второго поколения. ЧОО у первичных пациентов с ФЛ, получающих акалабрутиниб в комбинации с ритуксимабом в исследовании Ib фазы составила 92% [84].

Известно, что изоформа фосфатидилинозитол-3-киназы дельта (PI3Kδ) является важным элементом в сигнальном пути BCR [185]. Первоначальные клинические испытания пан-селективных ингибиторов PI3K не продемонстрировали высокой эффективности, например, ЧОО при терапии бупарлисибом составила 25% у пациентов с ФЛ [140] при клинически значимой токсичности. Однако селективные ингибиторы, блокирующие изоформы дельта (PI3Kδ) и гамма (PI3Kγ), продемонстрировали высокую эффективность и приемлемый профиль безопасности в клинических испытаниях у пациентов с р/р ФЛ [225]. В настоящее время FDA одобрены три ингибитора PI3K: два пероральных и один, вводимый внутривенно. В РФ на данный момент зарегистрирован только дувелисиб (ингибитор PI3Kδ/γ) для применения у пациентов с ФЛ в третьей и более линии терапии. Иделалисиб – специфический ингибитор дельта-изоформы PI3K изучался в открытом клиническом исследовании II фазы с включением 125 пациентов, которые ранее получили от 2 до 12 линий терапии (медиана 4), среди которых было 72 пациента с ФЛ. ЧОО составила 57% при частоте ПО, равной 6%, и средней продолжительностью ответа 12,5 месяцев [202]. Копанлисиб – ингибитор преимущественно альфа и дельта изоформ (PI3Kα/δ) продемонстрировал высокую эффективность в лечении р/р НХЛ после двух предшествующих линий терапий [73]. В исследовании II фазы CHRONOS-1 с участием 142 пациентов с р/р индолентными НХЛ после двух предшествующих линий терапии ЧОО при терапии копанлисибом в подгруппе из 104 пациентов с ФЛ составила 59% при частоте ПО, равной 14%. По результатам двухлетнего наблюдения ЧОО составила 61% (частота ПО равнялась 20%), а медианы ВБП и ОВ равнялись 13 и 43 месяца соответственно. В исследовании II фазы DYNAMO, оценивающем безопасность и эффективность дувелисиба у 129 пациентов с индолентной НХЛ, резистентной как к ритуксимабу, так и к химио- или радиоиммунотерапии, ЧОО составила 47% (42% для подгруппы пациентов с ФЛ) [81]. Расчетная средняя продолжительность ответа и медиана ВБП равнялись 10 и 9,5 месяцев соответственно.

Несколько новых ингибиторов PI3K в настоящее время проходят клинические испытания. Умбралисиб (TGR-1202) – пероральный ингибитор дельта-изоформы PI3K и казеинкиназы 1 эпсилон (CK1ε). Ингибирование как PI3Kδ, так и CK1ε позволяет блокировать путь AKT в В-клетках лимфомы. ЧОО в исследовании II фазы умбралисиба в комбинации с новым анти-CD20-МКАТ ублитуксимабом у пациентов с ФЛ составила 45,3% (95% ДИ: 36,1–54,8), при этом ПО был достигнут в 5,1% случаев. Медиана ВБП составила 10,6 месяцев, а расчетная однолетняя ВБП равнялась 45,9% [140]. Занделисиб (ME-401) представляет собой пероральный ингибитор PI3Kδ, который изучается в рамках II фазы клинического исследования TIDAL. Занделисиб

оценивается в качестве монотерапии для лечения взрослых пациентов с р/р ФЛ после, по крайней мере, двух предшествующих системных линий терапии, включая химиотерапию и анти-CD20-МКАТ. Последнее обновление показало, что ЧОО при ФЛ составляет 78%, а медиана ВБП на момент публикации не достигнута [245].

Нерецепторная тирозинкиназа SYK обеспечивает передачу сигнала в пути BCR. Энтосплетиниб – пероральный селективный ингибитор SYK-киназы. Монотерапия энтосплетинибом оценивалась в многоцентровом исследовании II фазы у пациентов с р/р НХЛ, среди которых был 41 пациент с ФЛ [27]. Энтосплетиниб принимался по 800 мг два раза в день. Наиболее частыми НЯ были утомляемость, тошнота, диарея, рвота, головная боль, кашель и гематологическая токсичность: анемия, нейтропения и тромбоцитопения. За период наблюдения 16 недель ВБП у пациентов с ФЛ составила 51,5% (95% ДИ: 32,8–67,4).

Костимуляция BCR с помощью IL-4 усиливает активацию клеток. Действительно, лимфоузлы при ФЛ инфильтрированы Tfh, высоко экспрессирующими IL-4 [25], а двойное ингибирование SYK и JAK может одновременно влиять на сигнальные пути BCR и IL-4 соответственно [62]. В этом отношении первоначальные результаты продолжающегося исследования II фазы цердулатиниба – двойного ингибитора SYK/JAK, в комбинации с ритуксимабом при р/р ФЛ продемонстрировали умеренную ЧОО, равную 59% [214].

В исследовании I фазы венетоклакса – специфического ингибитора Bcl-2 у пациентов с р/р НХЛ, 29 из которых с ФЛ, ЧОО составила 38% при медиане ВБП 11 месяцев [68]. Остается неясным, почему активность венетоклакса при ФЛ оказалась ниже, чем при хроническом лимфолейкозе, несмотря на то что для ФЛ характерно наличие транслокации t(14;18). Объяснение данного аспекта основывается на гипотезе, согласно которой другие антиапоптотические белки могут обеспечить защитную среду в микроокружении опухолевых клеток в лимфатических узлах. Незначительное увеличение ЧОО (44%) было достигнуто при повышении дозы венетоклакса до 1200 мг в сравнении с ЧОО, равной 27%, при дозе 900 мг. Предполагается, что более высокая дозировка препарата позволяет увеличить его биодоступность в лимфатических узлах и, таким образом, улучшает ответ на терапию [69]. В проводимом исследовании II фазы по оценке эффективности и безопасности венетоклакса в комбинации с RB или с ритуксимабом в сравнении с RB у пациентов с р/р ФЛ (NCT02187861), ЧОО в группе венетоклакса и ритуксимаба составила 33%, а в группе венетоклакс + RB достигла 64% [251].

Поверхностный белок CD47 экспрессируется практически на всех злокачественных клетках, включая лимфоидные, и обеспечивает антифагоцитарный сигнал, позволяющий опухолевым клеткам уклоняться от цитолиза, опосредованного макрофагами [118]. Антитела к CD47 не только индуцируют апоптоз, но также вызывают Т-клеточный ответ, усиливая

процессы презентации антигенов макрофагами. Магролимаб (Hu5F9-G4) представляет собой антитело к CD47, которое в настоящее время изучается в комбинации с ритуксимабом в исследовании Ib/II фазы у пациентов с ФЛ и ДВККЛ. По предварительным результатам Ib фазы ЧОО и частота ПО в группе ФЛ составили 71% и 43% соответственно. Лечение хорошо переносилось пациентами, наиболее частыми НЯ были озноб (41%), головная боль (41%), анемия (41%) и инфузионные реакции (36%) [23].

Клинические исследования Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) продемонстрировали высокую эффективность при онкогематологических заболеваниях, включая НХЛ. Недавно были представлены промежуточные результаты исследования ZUMA-5 по оценке эффективности Yescarta (axicabtagene ciloleucel) – анти-CD19 CAR Т-клеточной терапии при р/р ФЛ. У 80 пациентов (66% из которых имели POD24) после, как минимум, двух предшествующих линий терапии, ЧОО составила 95% (частота ПО равнялась 80%). Профиль токсичности характеризовался относительно высокой частотой цитопений, синдрома выброса цитокинов (CRS) и синдрома нейротоксичности, связанного с эффекторными иммунными клетками (ICANS), однако, частота данных НЯ была ниже, чем при других агрессивных В-клеточных лимфомах [117].

Промежуточный анализ исследования II фазы Elara по оценке эффективности и безопасности Kimriah (tisagenlecleucel, CTL019) у взрослых пациентов с р/р ФЛ продемонстрировал высокую эффективность данного препарата. По состоянию на 26 мая 2020 г. было обследовано 122 пациента, 97 из них получили Kimriah (среднее время наблюдения составило 6,5 месяцев). На предмет оценки эффективности проводимого лечения (средний период наблюдения равнялся 9,9 месяцев) подлежали 52 пациента. Средний возраст больных равнялся 57 лет (диапазон 29–73 лет), 66% пациентов были мужчинами, 84% имели III–IV стадию заболевания, а у 60% больных индекс FLIPI равнялся 3 единицам и более. Среднее количество предшествующих линий терапии составило 4 (диапазон от 2 до 13), включая аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых кроветворных клеток в 36% случаев. ЧОО равнялась 84,8% (39/46, 95% ДИ: 71,1–93,7), медиана ВБП и ОВ не были достигнуты. Из НЯ 3 и более степени чаще всего наблюдалась нейтропения (3 степень отмечалась у 13% пациентов, 4 степень – у 15%), у 48% больных отмечался синдром выброса цитокинов (1 степень – у 29%, 2 степень – у 20%, 3 степень и выше – у 0% по шкале Li) [85].

В настоящее время проходят испытания CAR-NK-клетки. В исследовании I/II фазы по оценке эффективности и безопасности анти-CD19 CAR-NK клеток у 11 пациентов с р/р НХЛ, 4 из которых с ФЛ, 8 пациентов достигли объективного ответа. У 7 больных была зарегистрирована полная ремиссия (4 с лимфомой и 3 с хроническим лимфолейкозом). Ответы достигались в течение 30 дней, при этом CRS не был зафиксирован ни у одного пациента [136].

Применение биспецифических МКАТ в терапии НХЛ характеризуется высокой эффективностью. Предварительные результаты продолжающегося исследования мосунетузумаба – полностью гуманизированного биспецифического анти-CD20/CD3-МКАТ, I/Ib фазы с включением 62 пациентов с р/р ФЛ (30 из которых имели POD24), характеризовались высокой ЧОО, равной 68% (50% достигли ПО) [28]. Устойчивые ответы наблюдались у всех пациентов, при этом частота CRS и ICANS 3 и более степени была низкой. Одронекстамаб (REGN1979) – биспецифическое анти-CD20/CD3-МКАТ продемонстрировало высокую эффективность при р/р ФЛ с достижением ЧОО, равной 92,9% (при частоте ПО 75%), в исследовании I фазы у пациентов с р/р В-клеточными НХЛ [31]. Средняя продолжительность ответа составила 7,7 месяцев. Эпкоритамаб (GEN3013) представляет собой биспецифическое анти-CD20/CD3-МКАТ класса IgG, предназначенное для подкожного введения. В доклинических моделях подкожное введение продемонстрировало такую же биодоступность и истощение пула В-клеток, как и внутривенное, но с более низкими уровнями цитокинов в плазме, что, вероятно, должно привести к меньшей выраженности CRS, но с таким же уровнем ответа на терапию [77]. В 2020 г. были представлены обновленные результаты исследования эскалации дозы эпкоритамаба при различных типах лимфом, включая 18% пациентов с ФЛ. ЧОО и доля ПО у пациентов с ФЛ (n = 8) составила 100% и 25% соответственно. Не было зарегистрировано случаев CRS 3 степени и выше, и только у 3% пациентов отмечались неврологические осложнения 3 и более высокой степени [113].

Глофитамаб – уникальное биспецифическое анти-CD20/CD3-МКАТ с конфигурацией 2:1 (2 домена, связывающих CD20, и 1 домен для связывания с CD3), продемонстрировало высокую эффективность в доклинических исследованиях благодаря его бивалентному взаимодействию с CD20 на злокачественных В-клетках. Недавно были представлены предварительные результаты клинического исследования I/Ib фазы по оценке эффективности глофитамаба при р/р В-клеточных НХЛ. Пациенты получали предварительную терапию обинутузумабом с целью снижения риска развития CRS высокой степени тяжести. У всех 8 пациентов с ФЛ ЧОО составила 100%, а 75% больных достигли ПО [112].

Полатузумаб ведотин и пинатузумаб ведотин представляют собой конъюгаты, состоящие из антитела (к CD79b и CD22 соответственно) и доставляемого внутрь клетки лекарства – монометил ауристатина E (антимитотический агент). Полатузумаб ведотин и пинатузумаб ведотин изучались в комбинации с ритуксимабом в рандомизированном исследовании II фазы ROMULUS при р/р ФЛ. В группе ритуксимаб + полатузумаб ведотин ЧОО составила 70%, при этом ПО наблюдался у 45% пациентов, а средняя продолжительность ответа равнялась 9,4 месяцев. В группе ритуксимаб + пинатузумаб ведотин ЧОО достигнута в 62% случаев (ПО отмечался у 5% больных) при средней продолжительности ответа 6,5 месяцев [164].

Авадомид (CC-122) представляет собой низкомолекулярное пероральное средство, которое индуцирует опосредованное цереблонами разрушение факторов транскрипции Ikaros и Aiolos. Деградация Ikaros и Aiolos приводит к снижению пролиферации и усилению апоптоза злокачественных В-клеток, а также к костимулирующим эффектам Т-клеток и NK-клеток. Результаты исследования CC-122-NHL-001 продемонстрировали высокую противоопухолевую активность авадомида в комбинации с обинутузумабом у пациентов с р/р ФЛ. Среди 35 пациентов с ФЛ ЧОО составила 71%, в том числе с частотой ПО, равной 40% [152].

Известно, что ФЛ имеет высокую радиочувствительность. ^{90}Y-ибритумомаб тиуксетан – радиоактивно меченное анти-CD20 антитело, одобренное FDA для терапии р/р ФЛ, а также в качестве консолидации после предварительной индукционной ИХТ. Недавно проведенный одноцентровой ретроспективный анализ продемонстрировал высокую эффективность данного препарата [168]. Среднее время наблюдения составило 10,2 года (95% ДИ: 8,8–11,6). ЧОО была достигнута в 100% случаев в группе ранее нелеченой ФЛ при частоте ПО, равной 93%, в то время как ЧОО в группе р/р ФЛ равнялась 93% с частотой ПО 73%. Медиана ВБП была значительно выше в группе ранее нелеченой ФЛ по сравнению с р/р ФЛ: 4,1 года (95% ДИ: 2,3–не достигнута) против 2,2 года (95% ДИ: 1,6–3,1) соответственно. Более того, предыдущее рандомизированное исследование ^{90}Y-ибритумомаба тиуксетана показало увеличение показателей клинического ответа по сравнению с монотерапией ритуксимабом при рецидивах ФЛ [237]. Радиоиммунотерапия обычно хорошо переносится, однако часто наблюдается миелосупрессия, наблюдаемая у пациентов с высокой степенью поражения КМ.

Использование эпигенетических лекарственных средств в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами может представлять будущее таргетной терапии. Действительно, появляется все больше свидетельств того, что эпигенетическая терапия с использованием ингибиторов ДНК-метилтрансфераз (DNMT) и гистоновых деацетилаз (HDAC) в сочетании с традиционной терапией или иммунотерапией может быть перспективным шагом на пути к разработке новых и эффективных стратегий лечения злокачественных новообразований [47, 115, 227]. Приобретенная резистентность опухолей к химиотерапии связана с изменениями в эпигеноме, которые могут напрямую влиять на клеточный цикл и/или некоторые ключевые регуляторы апоптоза [83]. Вориностат – ингибитор HDAC, продемонстрировал некоторую активность в качестве единственного агента при р/р ФЛ с достижением ЧОО 49% и медианой ВБП, равной 20 месяцев [175]. Другие ингибиторы HDAC, включая панобиностат и моцетиностат, проходят испытания в рамках II фазы. В недавнем исследовании II фазы абексиностата с участием пациентов с р/р В-клеточными НХЛ и хроническим лимфолейкозом, среди пациентов, поддающихся оценке, ЧОО составила 28%, наилучшая частота ответов наблюдалась в группе пациентов с ФЛ (ЧОО 56%) и ДВККЛ

(ЧОО 31%) [191]. Другие ингибиторы гистондеацетилаз показали неубедительные результаты с наблюдаемой ЧОО от 12% до 20% [36] при значительной токсичности [223]. В исследовании I фазы была продемонстрирована высокая скорость достижения полной ремиссии при использовании 5-дневного введения азацитидина в комбинации с R-CHOP. Патогенетически данное лечение приводит к деметилированию гена *SMAD1*, ассоциированного с химиорезистентностью, и последующей хемосенсибилизации [61]. Недавно были опубликованы результаты исследования I фазы с применением перорального азацитидина в комбинации с 6 циклами R-CHOP у пациентов с ДВККЛ, ФЛ IIIB цитологического типа или трансформированной ФЛ, ранее не получавших терапию. ЧОО составила 94,9%, при этом 52 (88,1%) пациента достигли ПО. При медиане наблюдения 28,9 месяцев оценочная годовая и двухлетняя ВБП составили 84,1% и 78,6% соответственно [142].

Последние достижения в области таргетной терапии ФЛ привели к появлению множества новых вариантов лечения, выходящих далеко за рамки традиционной парадигмы цитотоксической химиотерапии. Современные таргетные препараты, нацеленные на конкретные компоненты раковых клеток, такие как поверхностные белки или сигнальные клеточные пути, обеспечивают персонализированный и индивидуальный подход лечения. Таким образом, изучение патогенеза ФЛ позволяет находить новые мишени или методы воздействия, что отражается на темпах внедрения в клиническую практику современных таргетных препаратов, рисунок 1.

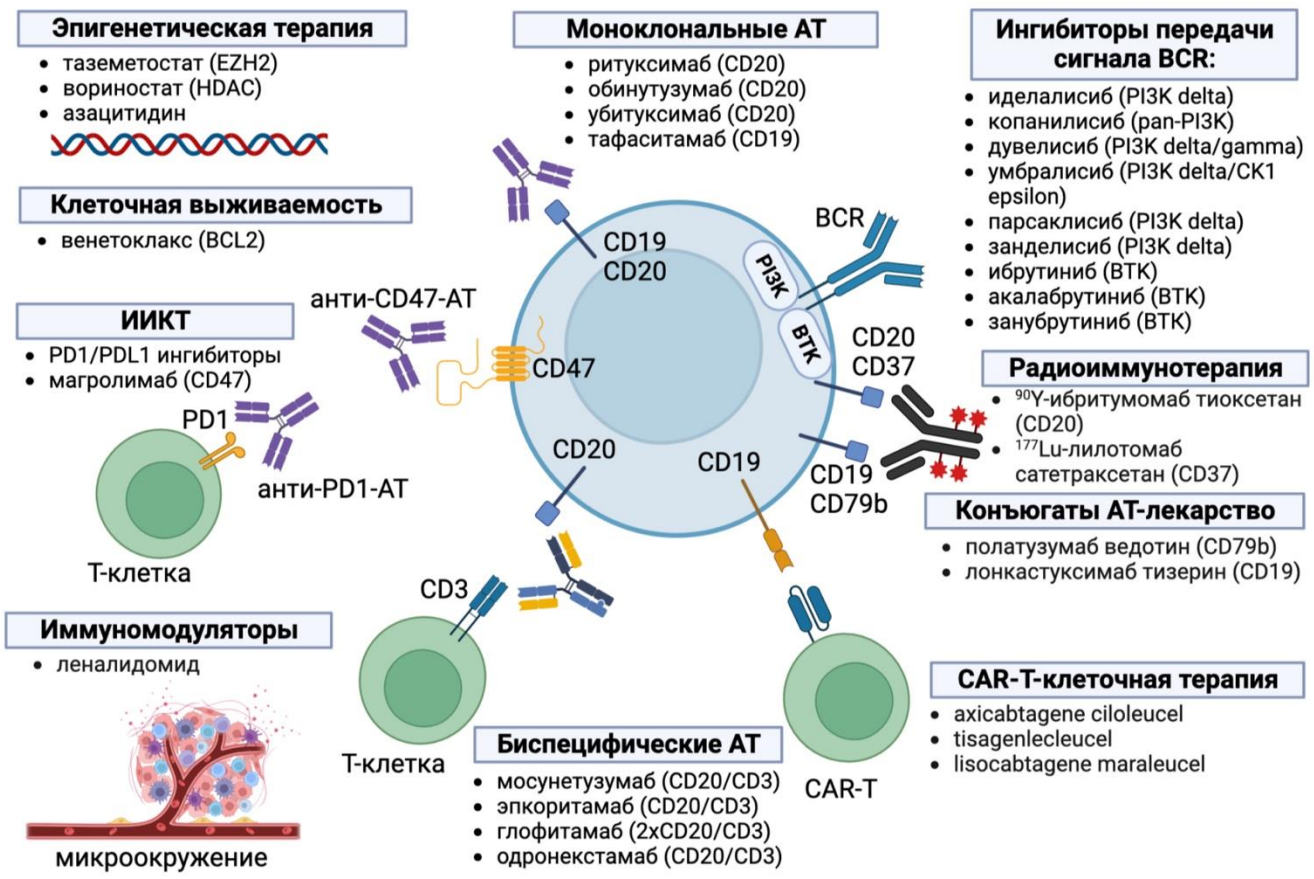


Рисунок 1 – Современная таргетная терапия ФЛ[1]

[1] Сокращения: АТ – антитело, иИКТ – ингибиторы иммунных контрольных точек, BCR – В-клеточный рецептор, BTK – тирозинкиназа Брутона, CAR-T – Т-клетки с химерным антигенным рецептором, CD – кластер дифференцировки, HDAC – гистоновая деацетилаза, PD1/PDL1 – рецептор и лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1, PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

ГЛАВА 2. ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА У БОЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ

2.1 Характеристика прогностических индексов фолликулярной лимфомы

Постоянное обнаружение новых клинических и биологических прогностических маркеров характеризует гетерогенность ФЛ и необходимость точного и стратифицированного по риску персонифицированного подхода в диагностике и лечении данного заболевания. С целью определения прогноза у пациентов со злокачественными НХЛ применялся Международный прогностический индекс (IPI), разработанный в 1993 г. и включающий оценку 5 факторов риска (возраст старше 60 лет; III–IV стадии заболевания; повышение сывороточной лактатдегидрогеназы (ЛДГ); значение ECOG 2 и более; а также 2 и более экстранодальных поражения), который также использовался при ФЛ [88]. Однако IPI не учитывал другие более значимые факторы риска ФЛ, и, в связи с этим, в отношении пациентов из группы низкого риска вероятность ошибки I рода была относительно высокой (модель распознавала только 10–15% пациентов с ФЛ как больных из группы низкого риска, в то время как их реальное количество значительно больше).

С целью определения прогноза и стратификации пациентов на группы риска для участия в клинических исследованиях по внедрению новых методов лечения в 2004 г. на основании ретроспективных данных 4167 пациентов с ФЛ, собранных в период с 1985 по 1992 гг., был разработан индекс FLIPI [217]. Несмотря на то, что FLIPI был проверен на различных популяциях, его прогностическая значимость снижалась с течением времени в связи с появлением новых лекарственных препаратов и методов лечения.

Абсолютная лимфопения имеет прогностическое значение при некоторых гематологических злокачественных новообразованиях и солидных опухолях. Ранние исследования показали, что лимфопения была связана с ухудшением ОВ при ФЛ [210], что в последствии было отражено в создании индекса FLIPI с лимфопенией (FLIPI-L). В исследовании с включением 736 пациентов со средним периодом наблюдения 72 месяца относительный риск (ОР) для лимфопении в анализе ОВ составил 2,2 (95% ДИ: 1,7–2,9), $p < 0,01$ [240].

В 2008 г. был предложен расширенный FLIPI с более подробным кодированием возраста [207]. Хотя возраст часто используется в качестве фактора риска в прогностических моделях, самое последнее исследование S. Alig et al. [24] показало, что пожилой возраст не связан с высоким риском ПЗ или меньшей эффективностью лечения. Тем не менее, более короткая выживаемость пожилых пациентов была обусловлена повышенной смертностью, не связанной с рецидивом или ПЗ. Поскольку тяжелая коморбидность является независимым прогностическим фактором риска, разными исследователями предпринимались попытки включения данных

о наличии сопутствующих заболеваний в прогностическую модель [24]. Так в индексе FCG (FLIPI, Charlson, Grade), основанном на данных 224 пациентов с впервые выявленной ФЛ, в качестве факторов риска использовались индекс FLIPI, индекс коморбидности Charlson (CCI) и гистологический тип (grade) [153]. Модель стратифицировала пациентов на три группы риска (низкий – 41,5%, средний – 37,5%, высокий – 13,4%, у 7,6% пациентов отсутствовали данные) в зависимости от ОВ ($p < 0,0001$). Однако ни расширенный FLIPI, ни FCG не прошли внешней валидации и редко используются в рутинной клинической практике.

Еще в исследовании FLIPI бета-2-микроглобулин (β2-МГ) был идентифицирован как потенциальный прогностический параметр, однако он не мог быть включен в модель из-за большого количества отсутствующих данных. Индекс FLIPI был основан исключительно на клинических параметрах и также не учитывал новые сведения в связи с внедрением в клиническую практику анти-CD20-МКАТ. Таким образом, Международным проектом по изучению прогностических факторов ФЛ в 2003 г. было инициировано масштабное проспективное исследование (F2), включившее 942 пациента. По результатам исследования был разработан новый прогностический индекс FLIPI-2 [78]. Кроме того, авторы в качестве первичной конечной точки исследования использовали ВБП, поскольку ВБП отражает рост опухоли и может быть интерпретирована раньше при ФЛ, чем ОВ, в связи с индолетным характером течения. Несмотря на преимущества FLIPI-2, только 59% пациентов в этом исследовании получали ритуксимаб в первой линии терапии. FLIPI-2 не вытеснил FLIPI из клинической практики из-за неоднозначности его превосходства в когортах валидации [29, 187].

Чтобы еще больше упростить существующие системы оценки в 2013 г. была разработана прогностическая модель, основанная на определении уровней β2-МГ и ЛДГ. Модель была построена на данных клинического исследования III фазы по оценке эффективности CHOP + ритуксимаб против CHOP + ^{131}I-тозитумомаб при прогрессирующей ФЛ. Однако разработка прогностического индекса с использованием данных пациентов, получающих устаревшую схему терапии, делает модель риска, в определенной степени, неприменимой, несмотря на ее простоту [187].

Прогностические модели, которые включают биологическую информацию, например, основанные на профилях экспрессии генов, потенциально должны быть более эффективны. Так, в 2015 г. на основании анализа мутаций 74 генов по данным секвенирования, оцененных у 154 пациентов с ФЛ, был разработан биологический прогностический индекс m7-FLIPI, стратифицирующий больных на группы высокого и низкого риска и включающий мутационный статус 7 генов (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP*, *CARD11*), а также клинические характеристики (статус ECOG и значение индекса FLIPI) [183]. Интересно, что около 50% пациентов с высоким риском по данным FLIPI были стратифицированы в группу низкого риска

m7-FLIPI в основном из-за генетических мутаций, которые снижают риск неудачи лечения. Более того, у этих пациентов выживаемость была неотличима от FLIPI с низким риском. В однофакторном анализе мутации генов *EP300* (ОР 1,99, 95% ДИ: 1,08–3,68, p = 0,028) и *FOXO1* (ОР 2,74, 95% ДИ: 1,23–6,09, p = 0,013) были связаны с более короткой выживаемостью, свободной от неудач лечения, тогда как мутации гена *EZH2* (ОР 0,46, 95% ДИ: 0,22–0,93, p = 0,030) были ассоциированы с более длительной выживаемостью. По данным многофакторного анализа наличие мутаций гена *EZH2* приводило к значительному улучшению как выживаемости, свободной от неудач лечения, так и ОВ, но только среди пациентов с FLIPI высокого риска. Исследование имело ограничение, так как достоверность оценки m7-FLIPI была продемонстрирована только у пациентов, получавших ритуксимаб в комбинации с химиотерапией по протоколу CHOP или CVP [183].

В другом исследовании оценивали прогностическую значимость m7-FLIPI у пациентов, получавших лечение в рамках исследования GALLIUM (NCT01332968), и обнаружили, что m7-FLIPI не был прогностически значимым у больных ФЛ, которым проводилось лечение на основе бендамустина. Более того, данный анализ показал, что мутационный статус гена *EZH2* может служить биологическим маркером выбора терапии. Пациенты с мутацией гена *EZH2*, получавшие CHOP/CVP с иммунотерапий, характеризовались более высокой ВБП по сравнению с больными, лечившимися бендамустином [120]. Следует отметить, что индекс m7-FLIPI не является прогностическим для пациентов с ФЛ, принимающих ритуксимаб без химиотерапии [137], что, вероятно, указывает на то обстоятельство, что валидность подобных инструментов актуальна только в рамках определенных клинических подходов. Данная особенность позже была обнаружена у 42 пациентов с ФЛ из исследования CONVERT. Авторы показали, что у больных, получавших RB (n = 34), стратификация по группам низкого и высокого риска в соответствии с m7-FLIPI была представлена 70,6% (24/34) и 29,4% (10/34) соответственно. При среднем времени наблюдения 48,7 месяцев (интервал 4,07–79,3) трехлетняя ВБП составила 70,8% (95% ДИ: 48,4–84,9) в группе низкого риска и 60,0% (95% ДИ: 25,3–82,7) в группе высокого риска. Таким образом, между группами отсутствовала существенная разница в ВБП (p = 0,264), что подтверждает низкую прогностическую значимость m7-FLIPI у пациентов с ФЛ, получающих RB [189].

С целью повышения чувствительности индекса m7-FLIPI в отношении предсказания POD24 исследователями из Германии была разработана его упрощенная версия – прогностический индекс POD24 (POD24-PI). Чувствительность m7-FLIPI для прогнозирования POD24 у пациентов из когорт GLSG (151 пациент из исследования Немецкой исследовательской группы) и BCCA (107 пациентов из популяционного регистра Британской Колумбии) составила 61% и 43% соответственно. Полученная модель включает индекс FLIPI, а также мутационный

статус 3 генов: *EP300, FOXO1* и *EZH2*. Примечательно, что коэффициент β для фактора «мутация гена *EZH2*» равнялся –0,42, что говорит о благоприятном прогнозе при наличии мутации. Чувствительность POD24-PI для когорт GLSG и BCCA составила 78% и 61% соответственно при незначительном снижении специфичности [119]. Однако, не смотря на определенные преимущества, одним из существенных ограничений m7-FLIPI является стоимость генетического исследования и его недоступность в рутинной клинической практике.

В 2018 г., используя данные 134 пациентов из исследования PRIMA, была разработана прогностическая модель в отношении ВБП. В основу модели легла экспрессия 23 генов: гены, участвующие в развитии В-клеток (*VPREB1, FOXO1, FCRL2, AFF3, TCF4*), апоптозе и реакциях на повреждение ДНК (*RASSF6, GADD45A*), клеточном цикле (*E2F5, USP44*), миграции клеток (*CXCR4, SEMA4B, EML6, DCAF12, VCL, RGS10*), иммунной регуляции (*CXCR4, KIAA0040, TAGAP, ORAI2, KIAA0040, METRNL*) и других процессах (*PRDM15, ABCB1, ALDH2, SHISA8*). Оценка экспрессии генов проводилась на фиксированных в формалине тканях, залитых парафином. Модель прошла валидацию на 3 независимых когортах с суммарным количеством пациентов 488 человек [109]. Особенность представленной модели состоит в том, что авторы использовали исключительно биологически значимые параметры опухолевых клеток, участвующих в ПЗ, в качестве предикторов, а не просто ассоциации с известными клиническими факторами риска.

Также предпринимались попытки разработки прогностического индекса, учитывающего особенности микроокружения опухоли. В исследование было включено 496 пациентов с ФЛ 1–3А цитологического типа. В качестве первичной конечной точки использовалась двухлетняя бессобытийная выживаемость (БСВ). Авторы продемонстрировали, что отсутствие интрафолликулярной экспрессии CD4 было единственным предиктором ранней неудачи, отношение шансов (ОШ) составило 2,37 (95% ДИ: 1,48–3,79). Таким образом, на основании полученных данных был разработан индекс BioFLIPI, сочетающий оценку FLIPI и интрафолликулярную экспрессию CD4 [159].

В 2018 г. основываясь на данных 57 пациентов с впервые диагностированной ФЛ, авторы предложили модель стратифицированного риска (RSM). Индекс содержал три прогностических параметра (гистологический тип > 1, СОЭ ≥ 45 мм/ч, сывороточный альбумин ≤ 35 г/л) в соответствии со значениями которых распределял пациентов на две группы риска по результатам анализа ОВ (75% против 24,1% в группах низкого и высокого риска соответственно, $p = 0,0001$). В попытке разработать простую модель E. Batchy et al. [29] в 2018 г. предложили индекс, включающий только два параметра: β2-МГ и вовлечение КМ. В качестве обучающей когорты были выбраны пациенты из исследования PRIMA. Из 1217 больных с ФЛ, данные 1135 пациентов были пригодны для разработки прогностической модели. Вовлеченность КМ может

быть не самым удобным параметром для прогнозирования, поскольку роль и целесообразность биопсии КМ в настоящее время ставится под сомнение в связи с широким использованием позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной томографией (ПЭТ-КТ) [29, 147], однако диагностика поражения КМ ограничена чувствительностью метода (31%–68%) [173]. И хотя значение индекса PRIMA-PI можно легко рассчитать в рутинной клинической практике, отсутствие в модели ранее признанных значимых факторов риска может привести к ее ограниченной прогностической ценности из-за потери важной информации. В исследовании PRIMA авторы использовали БСВ как одну из конечных точек исследования и пришли к выводу, что пациенты, у которых ПЗ наблюдалось в первые 24 месяца, имели более низкую пятилетнюю ОВ по сравнению с пациентами без ПЗ до 24 месяцев [29]. Кроме того, PRIMA-PI коррелировал с БСВ24, что указывает на способность двух комбинированных робастных параметров выявлять пациентов с неблагоприятными исходами. Это исследование подтвердило результаты предыдущих работ, в которых признавалась прогностическая значимость раннего рецидива в течение 24 месяцев после завершения ИХТ первой линии.

В 2020 г., основываясь на данных исследования GALLIUM и используя POD24 в качестве конечной контрольной точки, был разработан прогностический индекс ФЛ (FLEX). Модель FLEX основана на 9 переменных и представляет собой надежный индикатор ВБП в независимости от варианта терапии первой линии. Кроме того, модель обеспечивает большую точность прогнозирования POD24 в сравнении с FLIPI, FLIPI-2 и PRIMA-PI. В отличие от ранее предложенных индексов, такие переменные, как возраст и вовлеченность КМ, не включены в модель FLEX, поскольку они кажутся менее значимыми при текущих методах лечения. Однако, не смотря на преимущества, индекс FLEX относительно сложен для применения в рутинной клинической практике и не прошел валидацию на группе пациентов, получавших ИХТ, включавшую бендамустин [156].

Значимость результатов ПЭТ-КТ, при ФЛ для прогнозирования исходов была доказана в нескольких исследованиях. A.S. Cottereau et al. [64] продемонстрировали прогностическую значимость общего метаболического объема опухоли (TMTV) и динамику параметров ПЭТ после индукционной терапии в отношении двухлетней ВБП. Было показано, что у ПЭТ-положительных пациентов с TMTV > 510 см^3 двухлетняя ВБП составила 46,2% по сравнению с контрольной группой, где выживаемость равнялась 90,2%. С другой стороны, по результатам исследования GALLIUM показатель TMTV не продемонстрировал прогностической значимости у пациентов с ФЛ, получающих ИХТ первой линии с последующей поддерживающей терапией МКАТ [32, 195]. Такой результат указывает на то, что прогноз может быть в большей степени связан с долей пролиферирующих опухолевых клеток, а не с общей клеточной нагрузкой опухоли [195]. Более того, исследование GALLIUM подтвердило, что полный метаболический ответ (ПМО) является

сильным предиктором благоприятного долгосрочного исхода у больных ФЛ [64]. У пациентов с ПМО ВБП через 2,5 года составила 87,4% по сравнению с 54,9% у пациентов без ПМО [33].

Доступные в настоящее время прогностические модели ФЛ имеют ограниченную клиническую полезность. Они были разработаны в основном на данных клинических испытаний, которые не отражают репрезентативную выборку целевой популяции. Кроме того, различия в исследуемых группах, количестве включенных пациентов, используемых прогностических параметрах, применяемых методах лечения и статистических ошибках затрудняют сравнение различных моделей. Тем не менее, несмотря на ограниченность разработанных прогностических шкал, за последние десятилетия был достигнут прогресс в терапии ФЛ, что является результатом многолетних эмпирических и клинических исследований с применением различных методов лечения. Подводя итоги, приводим обзор всех доступных в настоящее время клинических и опухолевых маркеров, связанных с высоким риском ФЛ, таблица 1.

Таблица 1 – Факторы неблагоприятного прогноза ФЛ

№ п/п	Параметр	Результат	Ссылка
	Клинические данные		
1	ЦТ 3В против 1–3А	снижение ОВ	[5, 6, 148, 234]
2	Повышение β2-МГ	снижение ОВ и ВБП	[29, 187]
3	Большая узловая масса (> 7 см)	снижение ВБП	[51, 174, 217]
4	Вовлечение более 4 областей	снижение ОВ и ВБП	[217]
5	Вовлечение КМ	снижение ОВ и ВБП	[19, 21, 29]
6	Гемоглобин < 120 г/л	снижение ОВ и ВБП	[174, 217]
7	Распространенные стадии	снижение ОВ и ВБП	[48, 51]
8	Высокая опухолевая нагрузка на основании GELF-критериев	снижение ОВ и ВБП	[48, 51]
9	Снижение соотношения лимфоцитов и моноцитов (LMR)	Повышение риска трансформации	[89, 158]
	Визуализирующие методы		
10	Высокий базовый SUV max	снижение ОВ и повышение риска раннего ПЗ	[34, 155]
11	Deauville 4–5 после окончания терапии	снижение ОВ и ВБП	[228]
12	Высокий TMTV	снижение ОВ и ВБП	[34, 147, 212]
	Особенности опухоли		
13	Геномные изменения (del17p, субклональные мутации *TP53*)	снижение ВБП	[188]
14	Низкая интраопухолевая иммунная инфильтрация	повышение риска раннего ПЗ	[226]
15	Высокая экспрессия генов в опухоль-ассоциированных макрофагах	снижение ОВ и ВБП	[67, 126]
16	Повышение цДНК в дебюте заболевания и после завершения терапии	снижение ОВ и ВБП	[70, 205]

Продолжение таблицы 1

№ п/п	Параметр	Результат	Ссылка
17	Мутации в нескольких генах, включая *TP53, SOCS1, B2M* и *MYD88*	Раннее ПЗ	[125]
18	Интерфолликулярная реакция на Bcl-6 и CD10, Ki-67 ≥ 30%	снижение ВБП	[216]
Факторы, связанные с течением ФЛ			
19	POD24	снижение ОВ	[53, 119, 144 и др.]
20	Гистологическая трансформация через 18–24 месяцев после постановки диагноза или начала терапии	снижение ОВ	[204, 233]
21	Частые рецидивы	снижение ВБП	[37, 193]
22	Рефрактерное течение	снижение ВБП	[20, 37, 193]

Примечание: ВБП – выживаемость без прогрессирования, КМ – костный мозг, ОВ – общая выживаемость, ПЗ – прогрессирование заболевания, цДНК – циркулирующая опухолевая ДНК, ЦТ – цитологический тип, GELF – Группа по изучению фолликулярной лимфомы, LMR – соотношения лимфоцитов и моноцитов, POD24 – прогрессирование заболевания в течение 2 лет, SUV – стандартное значение поглощения, TMTV – общий метаболический объем опухоли, β2-МГ – бета-2-микроглобулин

2.2 Мутации гена *EZH2* и их прогностическое значение

2.2.1 Частота и патогенетическая значимость мутаций гена *EZH2* у больных фолликулярной лимфомой

В ядрах эукариотических клеток ДНК упакована и организована в ДНК-белковый комплекс, называемый хроматином. Основным компонентом хроматина является нуклеосома, состоящая примерно из 147 пар нуклеотидов и гистонового ядра, образованного октамером из 4 гистоновых белков: H2A, H2B, H3 и H4 [199]. В геноме присутствуют участки свободные от нуклеосом – с активной экспрессией генов, а также плотно упакованные участки, что позволяет предположить, что плотность упаковки хроматина коррелирует с активностью генов [59]. В отличие от наследственной генетической изменчивости, которая остается постоянной на протяжении всей жизни человека, эпигенетическая система клетки изменяется по мере того, как болезнь эволюционирует с течением времени. Это дает возможность использовать эпигенетические изменения в качестве биомаркеров и мишеней для таргетного воздействия на болезнь [198]. В отличие от генетических мутаций, эпигенетические аберрации потенциально

обратимы, что позволяет с помощью малых молекул обеспечивать «исправление» дисрегулируемых систем эпигенетического контроля экспрессии генов. Таким образом, эпигенетические процессы играют важную роль в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировке и выживании клеток, так как непосредственно контролируют степень активности большинства генов [206].

Энхансер гомолога zeste-2 (EZH2) – гистонметилтрансфераза, участвующая в переносе метильных групп на гистоны H3, является составной частью рекомбинантного комплекса PRC2, который относится к системе эпигенетической регуляции транскрипции. Показано, что количество меток триметилирования H3K27 (H3K27me3) коррелирует с репрессией транскрипции генов-мишеней, тогда как монометилированные метки H3K27 (H3K27me1) присутствует на активно транскрибируемых генах [232]. Ген *EZH2* картирован на хромосоме 7q36.1 и кодирует гистонметилтрансферазу, структурно состоящую из C-концевого каталитического SET-домена, соседнего богатого цистеином домена CXC, двух доменов SANT, промежуточных доменов ncRBD и других вспомогательных доменов. Домены SET и CXC необходимы для реализации ферментативной активности [211], домены SANT имеют сайты связывания с ДНК и участвуют в реакциях ремоделирования хроматина и регуляции транскрипции, а регуляторные домены ncRBD содержат сайты связывания с некодирующими РНК [46].

Метка H3K27 репрессивна в отношении транскрипции генов-мишеней и играет важную роль в контроле экспрессии генов, регулирующих процессы развития и дифференцировки, посредством образования бивалентных промоторов в паре с активирующей меткой триметилирования H3K4 (H3K4me3). Таким образом, экспрессия генов с бивалентными промоторами может быстро активироваться за счет метилирования сайта H3K4 и/или потери метки H3K27me3 и наоборот, рисунок 2. Нормальная функция EZH2 в B-клетках ГЦ лимфатических фолликулов состоит, как было сказано ранее, в подавлении экспрессии набора генов, которые высоко транскрибируются в наивных B-клетках, либо путем добавления метки H3K27me3 к промоторам генов, меченных H3K4me3, за счет создания условий бивалентности, либо путем добавления H3K27me3 к промоторам без метки H3K4me3 [94]. К генам, активность которых регулируется бивалентными промоторами, в первую очередь относятся гены терминальной дифференцировки *(PRDM1, IRF4, XBP1)* и негативные регуляторы клеточного цикла *(CDKN1A, CDKN1B)* [38, 40]. *EZH2*-индуцированный сайленсинг гена *CDKN1A* приводит к фосфорилированию белка ретинобластомы (Rb), что в конечном итоге позволяет транскрипционному фактору E2F1 продвигать клеточный цикл с G1 до S фазы, дополнительно усиливая экспрессию *EZH2* по механизму положительной обратной связи [39]. Таким образом, *EZH2*-опосредованное подавление экспрессии данных генов временно приостанавливает

процессы дифференцировки В-клеток, увеличивая продолжительность стадии ГЦ, приводя к гиперплазии лимфатических фолликулов и, тем самым, способствуя лимфомагенезу.

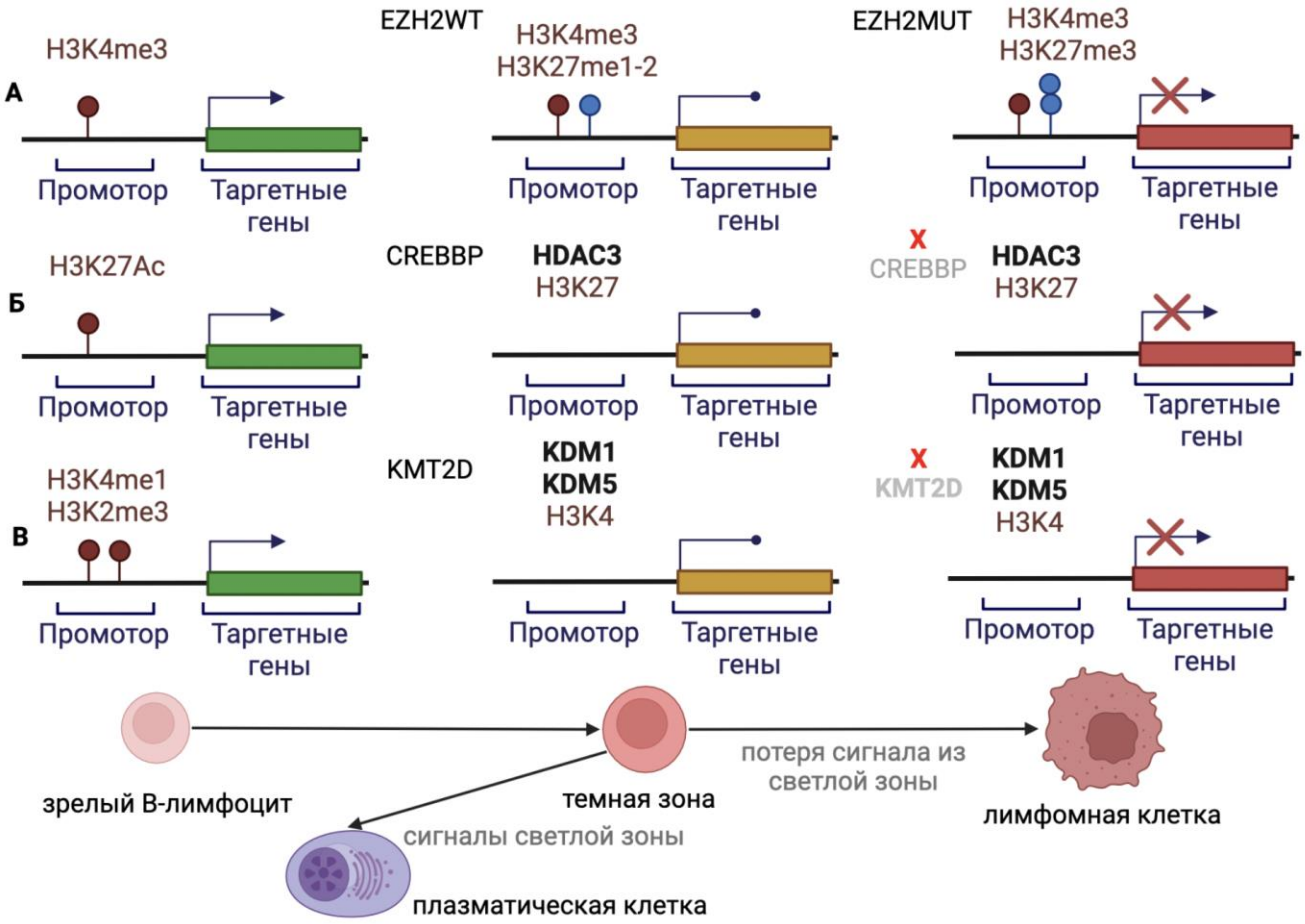


Рисунок 2 – Механизм регуляции экспрессии генов с бивалентными промоторами[1]

[1] В ГЦ происходит временное подавление экспрессии генов, регулирующих сигнальные пути, презентацию антигена, контрольные точки клеточного цикла. В-клетки переходят в активное состояние, когда получают сигнал о выходе из ГЦ. Лимфомы возникают из-за неспособности сигналов выхода восстановить экспрессию генов с помощью нескольких предложенных эпигенетических механизмов:
А) ген *EZH2* активируется в В-клетках ГЦ и превращает активные промоторы H3K4me3 (зеленый) в бивалентные H3K4me3/H3K27me3 (желтый), приводя к репрессии генов-мишеней, которая обращается вспять при выходе В-клеток из ГЦ. Мутации гена *EZH2* вызывают накопление и постоянное подавление (красный) функционирования бивалентных промоторов;
Б) Продукт гена *CREBBP*, ацетилируя H3K27, поддерживает активными энхансеры промоторов (зеленый) в зрелых В-клетках. В темной зоне ГЦ гистондеацетилаза HDAC3 деацетилирует H3K27, временно делая неактивными энхансеры промоторов (желтый) генов-мишеней. При получении сигналов из светлой зоны ГЦ происходит восстановление меток ацетилирования H3K27Ac и выход В-лимфоцитов из ГЦ. Мутации гена *CREBBP* с потерей функции приводят к неспособности восстановить исходный фенотип ацетилирования, что проявляется в виде полного подавления активности энхансеров (красный);
С) Ген *KMT2D* поддерживает энхансерную активность (зеленый) в зрелых В-клетках через метку H3K4me1 и, возможно, H3K4me3. В ГЦ эти энхансеры деметилируются под действием гистондеметилаз KDM1 или KDM5 (желтый), однако при выходе В-клеток из ГЦ происходит реактивация энхансеров. Мутации с потерей функции гена *KMT2D* приводят к стойкому деметилированию энхансеров и неспособности соответствующих генов реагировать на сигналы.

В дополнение к своим основным функциям, EZH2 может монометилировать RORα – рецептор, который активирует белок p53 и способствует апоптозу. Метилирование RORα, опосредованное EZH2, распознается комплексом убиквитинлигазы E3, приводит к его убиквитинированию через хромо-домен DCAF1 и последующей деградации. Таким образом, EZH2 может влиять на активность p53, при возникновении повреждений ДНК [129].

Мутации гена *EZH2* впервые были описаны у пациентов с ФЛ [162] и исследованы с использованием мышиных моделей [40, 218] в 2011 г. Мутации всегда гетерозиготны и представляют собой миссенс-мутации, приводящие к замене тирозина в 641 положении на фенилаланин в каталитическом SET-домене, что, в итоге, приводит к усилению ферментативной активности всего комплекса. Также описаны и другие мутации замены тирозина на аспарагин (Y641N), гистидин (Y641H), серин (Y641S). По данным литературы, частота встречаемости мутаций гена *EZH2* находится в диапазоне 7–28% [4, 44, 162]. Недавно у пациентов с ФЛ были описаны другие варианты мутаций гена *EZH2* в области 16 и 18 экзонов (Y646X, A682G и A692V), встречающиеся с частотой до 25%, и более редкие варианты аминокислотных замен (K634E, V637A и V679M) [43, 172]. Также было продемонстрировано, что отсутствует разница в частоте встречаемости мутацией гена *EZH2* в дебюте и при рецидиве заболевания (29% против 24% соответственно). Интересно, что мутации *EZH2* достоверно чаще встречаются в В-клетках ГЦ с перестройками гена *BCL2* ($p < 0,05\%$) [98], более того, у 24% пациентов с ФЛ и 39% пациентов с трансформированной ФЛ наблюдалось усиление или амплификация *EZH2* на хромосоме 7q [45].

Сравнение каталитической активности продукта аллелей дикого и мутантного (Y641X) типов гена *EZH2* показало, что неизмененный фермент обладает наибольшей активностью в отношении реакций монометилирования H3K27, которая постепенно снижается для меток ди- и триметилирования. Напротив, мутантный вариант Y641X обладает максимальной ферментативной активностью в реакциях триметилирования H3K27 [215]. Таким образом, комплексы PRC2, содержащие мутантную форму EZH2, неактивны в отношении неметилированных участков гистонов и функциональны только в присутствии EZH2 дикого типа [241], что потенциально объясняет, почему данная мутация является всегда гетерозиготной при различных новообразованиях [49]. Y641-мутированный EZH2 устойчив к JAK2/BTRC-опосредованной деградации и, таким образом, более стабилен, чем EZH2 дикого типа [201]. Другие варианты мутаций в данном кодоне – Y641 (c.2115A>T, Y641F и c.2114T>A, Y641N) приводят к изменению сайта связывания с микроРНК (miR-144), тем самым снижая сродство к miR-144 [128]. Действительно, ранее было показано, что miR-144 подавляет пролиферацию опухолей, являясь негативным регулятором EZH2 [134, 235].

Фенотипические переходы на разных этапах дифференцировки В-клеток в ГЦ управляются волнами дифференциальной экспрессии генов, связанных с сигналами, полученными от микроокружения [149]. Таким образом, транскрипция части генов репрессируется на стадии центробластов и затем индуцируется в центроцитах [231]. Выживаемость В-клеток светлой зоны ГЦ зависит как от специфичности В-клеточного рецептора в отношении антигена, так и от взаимодействия с Т-хелперами [149, 150]. В клетках с мутантным *EZH2* наблюдается подавление синтеза белков, необходимых для взаимодействия с Tfh (SLAM, ICAM-1, ICAM-2 и Ly108), что приводит к уменьшению образования конъюгатов центроцитов с Tfh на 40% [41]. Поскольку в норме Т-клетки способствуют выживанию В-клеток ГЦ, клетки с мутантным *EZH2* получают другой сигнал выживания – путем образования пары CD40-CD40L [76]. Данные исследования подтверждают снижение зависимости В-клеток светлой зоны ГЦ с мутантным *EZH2* от Т-клеток, так как после нескольких раундов деления и при переходе из темной зоны в светлую, у них нет необходимости конкурировать за дополнительный ко-стимуляторный сигнал, получаемый от Т-лимфоцитов.

Эпигенетическое репрограммирование, связанное с нарушением регуляции *EZH2*, было идентифицировано как главный механизм репрессии транскрипции генов, которые придают иммуногенность опухолевым клеткам. Это лучше всего иллюстрируется ролью *EZH2* в репрессии транскрипции генов, участвующих в презентации антигенов. X. Wang et al. [236] подчеркнули критическую роль активности *EZH2* в модуляции функции Т-регуляторных клеток (Treg) в противоопухолевом иммунитете. Генетическая делеция или фармакологическое ингибирование *EZH2 in vitro* или *in vivo* дестабилизировали экспрессию *FOXP3* в Treg-клетках, тем самым способствуя иммуноопосредованному отторжению опухолей в мышиных моделях. Результаты данного исследования были подтверждены в опыте с использованием селективного ингибитора EZH2 – CPI-1205, в результате которого наблюдались фенотипические и функциональные изменения Treg, приводящие к усиленной активации Т-клеток и устойчивому противоопухолевому иммунитету [93]. Однако ингибирование EZH2 также было связано со снижением долгосрочной выживаемости эффекторных Т-клеток [101, 249]. Сходным образом другое исследование показало, что активность EZH2 влияет на развитие и поддержание пула предшественников Т-клеток памяти [100]. NK-клетки, являясь важным компонентом врожденной иммунной системы, способны быстро реагировать на широкий спектр патогенов в отсутствие презентации антигена MHC I класса. Ингибирование активности EZH2 в гемопоэтических стволовых клетках увеличивает количество предшественников и зрелых NK-клеток, что приводит к их пролиферации, активации и увеличению цитотоксического потенциала в отношении клональных клеток опухоли [242].

2.2.2 Влияние мутаций гена *EZH2* на прогноз фолликулярной лимфомы

В 2011 г. были инициированы исследования по оценке влияния мутаций гена *EZH2* на прогноз ФЛ. В анализе, включившем 159 пациентов с ФЛ из исследования PRIMA (NCT00140582) [203], изучалось воздействие мутации и усиление функции *EZH2* на ВБП. Наличие изменения (усиление и/или мутации) в гене *EZH2* оказывало благоприятное влияние на ВБП (p = 0,026). У пациентов без изменений гена *EZH2* средняя ВБП составила 58 месяцев, тогда как у пациентов с изменениями гена *EZH2* средняя ВБП не была достигнута. Скорость двухлетнего прогрессирования в группе пациентов с изменением функциональной активности *EZH2* составила 15% (95% ДИ: 9–28) и увеличивалась до 31% (95% ДИ: 23–41) у пациентов с нормальным *EZH2* (p = 0,036). В многомерной регрессионной модели Кокса, которая включала мутационный статус *EZH2* и расчет индекса FLIPI, наличие изменений гена *EZH2* оставалось единственным независимым фактором, значимо связанным с лучшей ВБП (ОШ 0,58, 95% ДИ: 0,36–0,93, p = 0,025). Авторы исследования продемонстрировали, что мутации гена *EZH2* встречались с частотой 29%, а амплификация локуса 7q36.1 была обнаружена у 15% пациентов и не коррелировала с мутационным статусом. Всего 37% пациентов имели какое-либо изменение гена *EZH2* [111].

Другое исследование с включением 99 пациентов с ФЛ показало, что аллель дикого типа гена *EZH2*, увеличение количества копий 18 хромосомы, снижение числа $CD8^+$-клеток и $CD163^+$-макрофагов ассоциируется с ранней неудачей при использовании R-CHOP-подобных режимов [220]. Мутации гена *EZH2* также связаны с более длительным временем до неудачи терапии, а доля пациентов с неудачей терапии через 5 лет с мутантным *EZH2* составила 60,9% по сравнению с 33,7% у пациентов с вариантом *EZH2* дикого типа. Через 10 лет пропорция составила 43,5% и 21,6% соответственно [137].

В исследовании, оценивающем влияние профиля экспрессии гена *EZH2* в корреляции с клиническими, гистопатологическими, иммунофенотипическими характеристиками на POD24 было показано, что профиль экспрессии *EZH2* не оказывал значимого эффекта на клинические исходы. Так же авторы продемонстрировали, что высокие уровни экспрессии гена *EZH2* чаще выявляются в случаях с более низкой экспрессией *BCL2* и при высокой экспрессии белков MUM1, Myc, p53 [224].

2.2.3 Возможности терапии фолликулярной лимфомы с учетом нацеливания на EZH2

С 2012 г. по настоящее время было разработано несколько специфичных SAM-конкурентных ингибиторов EZH2, способных блокировать как мутантную форму белка, так и продукт гена дикого типа [219]. Данные молекулы подавляют преимущественно процессы ди- и триметилирования H3K27, что приводит к реактивации генов-мишеней комплекса PRC2. В настоящий момент 7 SAM-конкурентных ингибиторов (CPI-0209, CPI-1205, таземетостат (EPZ-6438), PF-06821497, SHR2554, HH2853 и DS-3201 – двойной ингибитор EZH1 и EZH2) проходят I–III фазу клинических испытаний при ЛПН и солидных опухолях. Открытое многоцентровое исследование II фазы таземетостата у 99 пациентов с р/р ФЛ показало, что ЧОО в группе больных с мутацией гена *EZH2* составила 69% (31/45, 95% ДИ: 53–82) и 35% (19/54, 95% ДИ: 23–49) в группе дикого типа. Ответы в обоих группах были устойчивыми, при этом у части пациентов частичный ответ (ЧО) переходил в ПО при продолжении лечения. Средняя продолжительность ответа составила 10,9 месяцев (95% ДИ: 7,2–нет оценки) в группе с мутацией гена *EZH2* и 13,0 месяцев (95% ДИ: 5,2–нет оценки) в группе дикого типа. Среднее время до первого ответа в обоих группах составило 3,7 месяцев. Медиана ВБП равнялась 13,8 месяцев (95% ДИ: 10,7–22,0) и 11,1 месяцев (95% ДИ: 3,7–14,6) соответственно. Побочные эффекты 3 или более тяжелой степени, связанные с лечением, включали гематологическую токсичность: тромбоцитопению (3%), нейтропению (3%) и анемию (2%). Серьезные НЯ были зарегистрированы у 4 (4%) пациентов. Смертей, связанных с лечением, не было. [166]. На основании результатов данного исследования таземетостат (Tazverik, Epizyme, Inc.) получил ускоренное одобрение FDA в июне 2020 г. для лечения взрослых пациентов с р/р ФЛ с мутацией гена *EZH2*, которые ранее получили две и более линий терапии, а также для пациентов, у которых исчерпаны другие удовлетворительные варианты лечения ФЛ. В настоящее время таземетостат одобрен в США для лечения р/р ФЛ во второй и более линии терапии в независимости от мутационного статуса гена *EZH2* и при непереносимости других доступных вариантов лечения (NCCN, 2023).

Одновременно аналогичные испытания были инициированы в Японии. По данным многоцентрового исследования II фазы с включением 17 пациентов с р/р ФЛ ЧОО у пациентов с мутацией гена *EZH2* составила 76,5%, при частоте ПО, равной 35,3%. Медиана ВБП не была достигнута. Наиболее частыми НЯ были дисгевзия (50%) и лимфопения (25%). Три пациента прекратили прием препарата в связи с развитием серьезных НЯ, связанных с лечением, таких как атипичная пневмония, дисгевзия и мышечная спастичность [116].

Несмотря на то, что таргетное ингибирование EZH2 является многообещающей стратегией терапии ФЛ, были обнаружены вторичные мутации *EZH2*, снижающие эффективность лечения. V. Gibaja et al. [91] продемонстрировали, что лимфомные клеточные линии KAPRAS422, обработанные EZH2-ингибитором El1 накапливали вторичные мутации Y111L и Y661D. Измененные клетки были устойчивы не только к El1, но и к другому EZH2-ингибитору – EPZ-6438. Хотя появление данных мутаций не было зарегистрировано в клинической практике, возникает потребность в поиске других – не SAM-зависимых механизмов ингибирования EZH2. В данном контексте растет интерес к исследованиям, изучающим возможность ингибирования активности белка EED, входящего в состав комплекса PRC2 и усиливающего ферментативную активность EZH2 [108]. В настоящее время проводятся клинические испытания I/II фазы аллостерического ингибитора EED – MAK683 для лечения р/р ДВККЛ и других распространенных солидных опухолей (NCT02900651). Недавно были опубликованы данные, согласно которым мутация гена *EZH2* (W113C) приводит не только к усилению ферментативной активности комплекса PRC2, но и обуславливает развитие резистентности к таземетостату [60]. В отличие от других мутаций с усилением функции, данная мутация расположена в петле активации SET-домена на N-конце EZH2, что стабилизирует SET-домен и облегчает связывание субстрата. Авторы также показали, что ингибирование EED преодолевает резистентность, эффективно снижает количество меток H3K27me3 и блокирует пролиферацию опухоли в клетках, экспрессирующих *EZH2* (W113C).

Таким образом, учитывая актуальность исследований в изучении механизмов регуляции транскрипции генов, в частности влияния мутаций гена *EZH2* на прогноз у пациентов с ФЛ, а также значительный разброс в выявляемости данных генетических изменений согласно результатам международных исследований (7–28%) и большой спектр выявленных мутаций, нами был проведен анализ по изучению частоты мутаций гена *EZH2* в российской когорте больных ФЛ с применением двух современных методов молекулярно-генетической диагностики: секвенирование по Сэнгеру и NGS.

ГЛАВА 3. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Характеристика исследуемой группы

В исследование включено 144 пациента (из которых 111 (77,1%) включено проспективно, 33 (22,9%) – ретроспективно), проходивших лечение в гематологической клинике ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России и других гематологических отделениях лечебных учреждений г. Санкт-Петербурга в период с января 2007 по апрель 2023 гг. В исследование включались все пациенты старше 18 лет и общесоматическим статусом ECOG до 3 включительно с морфологически подтвержденной ФЛ, у которых имелись в дебюте или появились в процессе наблюдения показания для начала специфической терапии (GELF-критерии [48]). Количество женщин равнялось 99 (66,0%), мужчин – 45 (34,0%), соотношение составило 2,2:1 соответственно. Средний возраст пациентов равнялся 54,6 лет (95% ДИ: 52,2–56,9, медиана 55,0 лет). Распределение больных по возрастным категориям составило: 14 (9,7%) человек в возрасте 18–35 лет, 26 (18,1%) – 36–45 лет, 50 (34,7%) – 46–60 лет, 45 (31,3%) – 61–75 лет, 8 (5,6%) – старше 75 лет. Одному пациенту (1/144) на момент верификации диагноза было 16 лет. Медиана наблюдения составила 34,3 месяца (10 и 90 процентили: 10,5; 109,2, среднее значение 47,0 месяцев).

Профессиональную вредность отмечали 12 (8,3%) пациентов: работа с источником сильного электромагнитного излучения – 3 (2,1%), ионизирующего излучения – 3 (2,1%), работа на химическом производстве – 6 (4,2%). Курили, согласно данным анамнеза, 37 (25,7%) пациентов, что достоверно не отличается от популяционного значения, равного 21,9% – стандартизованная по возрасту распространенность употребления табака лицами в возрасте от 15 лет[1] ($p = 0,138$). Медиана индекса курильщика составила 20,0 (10 и 90 процентили: 10,0; 39,1, $n = 32$). Отягощенную наследственность по злокачественным новообразованиям отмечали 38 (26,4%) больных. Инфекционные заболевания были выявлены у 15 (10,4%) пациентов, среди них хронический вирусный гепатит В встречался у 6 (4,2%) больных, вирусный гепатит С – также у 6 (4,2%). Аутоиммунная патология была выявлена у 15 (10,4%) пациентов. Метахронный рак встречался у 8 (5,6%) пациентов, доброкачественные новообразования (миома матки, дисплазия шейки матки, пищевод Баррета и др.) отмечались у 21 (14,6%) больного. Медиана индекса массы тела (ИМТ) составила 25,7 кг/м^2 (10 и 90 процентили: 20,8; 32,0, $n = 138$), ожирение отмечалось у 22 пациентов (III степень – у 2 (9%), II степень – у 3 (14%), I степень – у 17 (77%) пациентов), избыточная масса тела – у 52 (37,7%, $n = 138$) больных.

[1] URL: https://www.fedstat.ru/indicator/59168.

Структура сопутствующих заболеваний у пациентов с ФЛ (n = 119) представлена на рисунке 3. Наиболее часто отмечались гипертоническая болезнь с частотой встречаемости 50 случаев (14,3% в структуре всей коморбидной патологии), хронический гастрит – 27 (7,7%), хроническая сердечная недостаточность – 25 (7,1%), ишемическая болезнь сердца – 23 (6,6%), язвенная болезнь – 16 (4,6%), варикозное расширение вен нижних конечностей – 15 (4,3%).

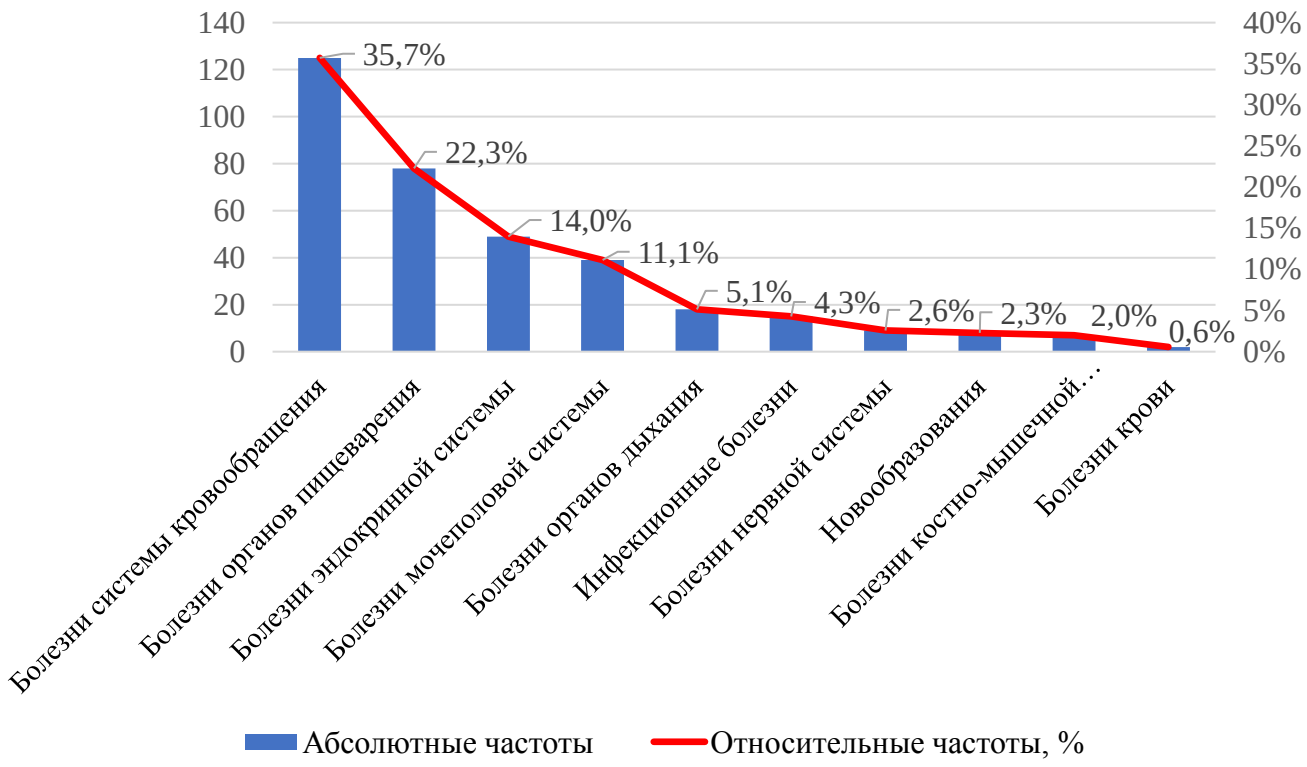


Рисунок 3 – Структура сопутствующих заболеваний у пациентов с ФЛ

Индекс коморбидности Charlson [55] был оценен у 124 пациентов, медиана индекса составила 1 (10 и 90 процентили: 0; 5). Количество пациентов со значимой коморбидностью (сумма баллов ≥ 4) равнялось 13 (10,5%). Медиана статуса ECOG составила 1 (10 и 90 процентили: 0; 2), количество пациентов с ECOG 2 и выше – 32 (22,4%), среди которых у 5 человек статус ECOG был равен 3.

Диагноз был морфологически подтвержден у всех (n = 144) пациентов. Согласно результатам гистологического исследования (подробные данные были доступны у 134 больных) опухолевого биоптата склероз стромы отмечался у 12 (9,0%) пациентов, бластоидная морфология – у 39 (29,1%). В 77 (57,5%) образцах тканей клеточный состав был полиморфным, в 30 (22,4%) – отмечались крупные клетки, в 27 образцах (20,1%) – мелкие клетки. Многоядерные формы были выявлены у 16 (11,9%) пациентов. По результатам гистологического исследования преимущественно наблюдался фолликулярный тип роста – у 120 (89,6%) пациентов, диффузный и смешанный типы встречались с одинаковой частотой – у 7 (5,2%) больных. Экспрессия CD20

по данным ИГХ была характерна для всех образцов тканей, экспрессия CD10 отмечалась в 99 (79,8%) случаях, CD23 – в 80 (64,5%), Bcl-2 – в 110 (88,7%), Bcl-6 – в 84 (67,7%), во всех образцах тканей отсутствовала экспрессия Cyclin D1, n = 124. Поражение КМ по данным гистологического исследования наблюдалось у 76 (52,8%) пациентов, медиана объема поражения составила 30% (10 и 90 процентили: 5; 84, среднее значение 32,7%, n = 42), доля миелоидной ткани равнялась 40% (10 и 90 процентили: 20; 87, среднее значение 45,7%, n = 41), лейкоэритробластическое соотношение составило 2:1 (10 и 90 процентили: 1:1; 3:1, n = 40). Гиперхромия ядер отмечалась в 5/43 (11,6%) образцах, бластные формы – в 2/43 (4,7%). Экспрессия CD20 наблюдалась в 100% случаев, Bcl-2 и Bcl-6 – в 91% и в 19% соответственно, n = 21. Таким образом, по результатам морфологических исследований у 18 (12,5%) пациентов был верифицирован 1 цитологический тип, у 83 (57,6%) – тип 2, у 30 (20,8%) – тип 3А, у 13 (9,0%) больных отмечался 3В цитологический тип.

Таргентные очаги оценивались в соответствии с рекомендациями Лугано (2014) [57]. Медиана объема опухолевой массы, измеренная с помощью КТ (в том числе ПЭТ-КТ) и определяемая как сумма произведений перпендикулярных диаметров 6 таргетных очагов (SPD), составила 4771 см^2 (10 и 90 процентили: 1111; 14746, среднее значение 6673 см^2, n = 113). Селезеночный индекс (СИ) был равен 580 см^3 (10 и 90 процентили: 360; 1865, среднее значение 835 см^3, n = 103). Экстранодальные поражения отмечались у 38 (26,4%) пациентов, наиболее часто лимфомой были поражены легкие/плевра – у 8 (5,6%) пациентов, тонкий и толстый кишечник – также у 8 (5,6%), кожа и подкожная клетчатка – у 7 (4,9%) человек. Медиана очагов экстранодальной локализации опухоли составила 1 (максимум 5). Медиана количества пораженных опухолевым процессом очагов (по данным ПЭТ-КТ и гистологического исследования) равнялась 5 (10 и 90 процентили: 2; 8). По результатам стадирования у 3 (2,1%) пациентов отмечалась I стадия (Ann Arbor) заболевания, у 8 (5,6%) – II стадия, у 41 (28,5%) – III стадия, у 92 (63,9%) пациентов была верифицирована IV стадия. Таким образом, суммарная частота распространенных стадий составила 92,4%.

Показатели гемограммы и лейкоцитарной формулы у абсолютного большинства пациентов находились в пределах референтных значений. Медиана количества лейкоцитов составила 6,2 × 10^9/л (10 и 90 процентили: 3,5; 14,5, среднее значение 9,62 × 10^9/л), медиана абсолютного количества нейтрофилов и лимфоцитов – 3,5 × 10^9/л (10 и 90 процентили: 1,7; 6,5, среднее значение 4,0 × 10^9/л) и 1,5 × 10^9/л (10 и 90 процентили: 0,7; 7,7, среднее значение 4,89 × 10^9/л) соответственно. Все биохимические показатели были оценены у 120 больных. Медиана ЛДГ составила 221 Ед/л (10 и 90 процентили: 142; 430, среднее значение 260 Ед/л), β2-МГ – 5,18 мг/л (10 и 90 процентили: 2,03; 9,35, среднее значение 5,54 мг/л). Показатели коагулограммы (n = 93) в дебюте заболевания находились в пределах референтных значений

более чем у 95% больных. На предмет исследования гуморального иммунитета у 70 пациентов были измерены сывороточные значения иммуноглобулинов. Медиана уровня IgG составила 8,07 г/л (10 и 90 процентили: 5,29; 13,48, среднее значение 8,54 г/л), IgM – 1,55 г/л (10 и 90 процентили: 0,37; 2,68, среднее значение 1,43 г/л), IgA – 1,22 г/л (10 и 90 процентили: 0,19; 2,39, среднее значение 1,32 г/л).

Распределение пациентов по группам риска в зависимости от прогностического индекса составило: FLIPI (n = 135: низкий – 9,6%, промежуточный – 30,4%, высокий – 60,0%), FLIPI-2 (n = 118: низкий – 22,9%, промежуточный – 39,8%, высокий – 37,3%), PRIMA-PI (n = 118: низкий – 11,0%, промежуточный – 48,3%, высокий – 40,7%), FLIPI-L (n = 135: низкий – 5,9%, промежуточный – 45,9%, высокий – 48,1%), FCG (n = 137: низкий – 24,8%, промежуточный – 35,8%, высокий – 39,4%), FLEX (n = 104: низкий – 66,3%, высокий – 33,7%), RSM (n = 117: низкий – 89,7%, высокий – 10,3%), рисунок 4.

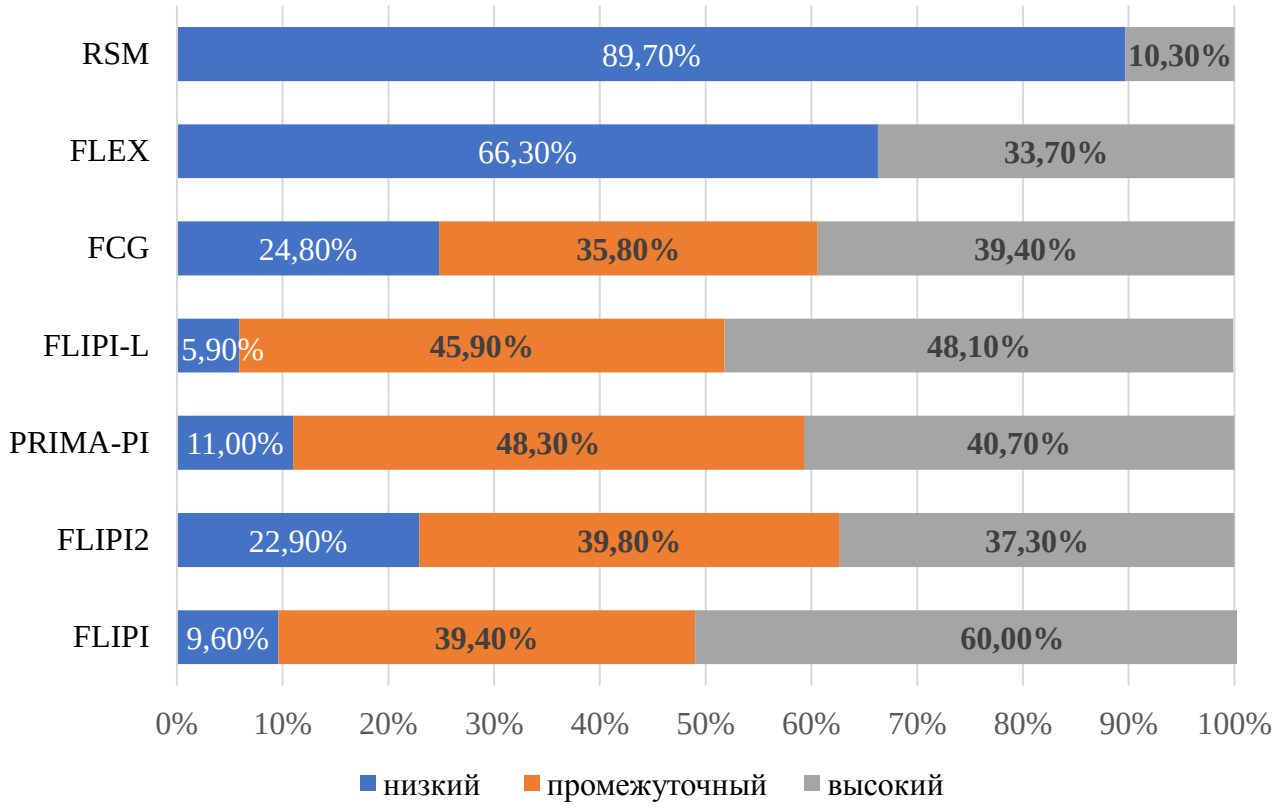


Рисунок 4 – Распределение пациентов с ФЛ по группам риска

Проточная цитометрия лимфоцитов была выполнена 65 пациентам, анализ миелограммы – 82. Исследование перестроек гена *BCL2* методом FISH было проанализировано у 105 пациентов, изменения выявлены у 44/105 (41,9%) человек. Исследование перестроек гена *BCL6* и делеция del17p/*TP53* были оценены у 99 и 93 пациентов соответственно. Аберрации гена *BCL6* отмечались у 14/99 (14,1%) пациентов, del17p/*TP53* – у 13/93 (14,0%). Стандартное

кариотипирование было выполнено 60 пациентам, у 8 (13%) из которых не были получены митозы. Нормальный кариотип отмечался у 42/52 (81%) больных, 1 хромосомная поломка – у 9/52 (17%), комплексный кариотип – у 1/52 (2%). Так, у пациента FL016 был выявлен следующий кариотип: 46,XY,ins(1)(q12),add(19)(q13)[3]/46,XY,ins(1)(q12),add(18)(p11.3)[3]/ 46,XY[14]. Анализ мутаций гена *EZH2* методом секвенирования по Сэнгеру был выполнен у 111 пациентов, мутации наблюдались у 19/111 (17,1%) больных.

У всех пациентов имелись или в процессе наблюдения появились показания к началу специфической терапии: поражение более 3 лимфатических зон размерами ≥ 3 см в диаметре отмечалось у 99 (68,8%) пациентов, любое вовлечение ≥ 7 см в диаметре (bulky) – у 55 (38,2%), наличие B-симптомов – у 70 (48,6%, среди которых повышенная потливость отмечалась у 53 пациентов, снижение массы тела ≥ 10% за последние 6 месяцев – у 33, повышение температуры тела ≥ 38°C – у 25 человек), спленомегалия – у 55 (36,1%), плеврит и/или асцит – у 21 (14,6%), лейкемический состав крови – у 17 (11,8%), цитопения – у 5 (3,5%) больных. Медиана времени наблюдения (с момента постановки диагноза до начала терапии первой линии) составила 1,7 месяцев (максимальное время наблюдения 14,7 лет). Общая характеристика исследуемой группы пациентов до начала терапии первой линии представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Общая характеристика пациентов с ФЛ перед началом терапии

Параметр	n (%)
Возраст	144 (100%)
средний, лет	54,6 (95% ДИ: 52,2–56,0)
18–64 лет	102 (70,8%)
≥ 65 лет	42 (29,2%)
Пол	144 (100%)
мужчины	45 (34,0%)
женщины	99 (66,0%)
Коморбидность	144 (100%)
ХВГВ	6 (4,2%)
ХВГС	6 (4,2%)
аутоиммунные заболевания	15 (10,4%)
онкологические заболевания	8 (5,6%)
Состояние по шкале ECOG	143 (99,3%)
0–1	111 (77,6%)
≥ 2	32 (22,3%)
Тип роста опухоли	134 (93,1%)
фолликулярный	120 (89,6%)
нодулярный	7 (5,2%)
смешанный	7 (5,2%)
Цитологический тип	144 (100%)
1	18 (12,5%)
2	83 (57,6%)
3A	30 (20,8%)
3B	13 (9,0%)

Продолжение таблицы 2

Параметр	n (%)
GELF-критерии	144 (100%)
bulky (большая опухолевая масса > 7см) поражение ≥ 3 лимф. зон, размерами ≥ 3 см спленомегалия B-симптомы плеврит и/или асцит цитопения (Лц < 1,0 × 10^9/л и/или Тц < 100 × 10^9/л) лейкемический состав крови (количество опухолевых клеток > 5,0 × 10^9/л)	55 (38,2%) 99 (68,8%) 59 (41,0%) 70 (48,6%) 21 (14,6%) 5 (3,5%) 17 (11,8%)
Костный мозг	144 (100%)
поражение (количество пациентов) медиана объема поражения	76 (52,8%) 30% (n = 42)*
Экстранодальные поражения	144 (100%)
тонкий/толстый кишечник легкие/плевра кожа и подкожная клетчатка	8 (5,6%) 8 (5,6%) 7 (4,9%)
Стадия (Ann Arbor)	144 (100%)
I II III IV	3 (2,1%) 8 (5,6%) 41 (28,5%) 92 (63,9%)
Подсчет миелограммы	82 (56,9%)
ИГХ-исследование	124 (85,1%)
Иммунофенотипирование	65 (45,1%)
FISH-исследование	105 (72,9%)
перестройки гена *BCL2* перестройки гена *BCL6* del17p/*TP53*	44 (41,9%, n = 105) 14 (14,1%, n = 99) 13 (14,0%, n = 93)
Секвенирование по Сэнгеру	111 (77,1%)
мутации гена *EZH2*	19 (17,1%)
Секвенирование следующего поколения (NGS)	26 (18,1%)

Примечание: Лц – лейкоциты, Тц – тромбоциты, ХВГВ – хронический вирусный гепатит В, ХВГС – хронический вирусный гепатит С;

* – данные объема поражения КМ (%) были доступны только у 42 пациентов

Лечение пациентов проводилось в соответствии с Национальными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению фолликулярной лимфомы, а также с учетом международных стандартов (NCCN, ESMO), принятых в период лечения больных. В качестве терапии первой линии ИХТ по протоколу R-CHOP была проведена у 72 (50,0%) пациентов, RB – 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, таблица 3. Отклонения от схем лечения в виде изменения длительности цикла

или их количества было обусловлено негативным влиянием пандемии COVID-19, что приводило к снижению интенсивности дозы.

Таблица 3 – Характеристика проводимой терапии

№ п/п	Схема терапии	Кол-во пациентов, n (%)	Кол-во циклов, медиана (10; 90 процентили)	Продолжительность цикла, медиана дней (10; 90 процентили)
1	R-CHOP	72 (50%)	6 (5; 8)	21,7 (20,2; 26,7)
2	RB	45 (31,3%)	6 (4; 6)	29,0 (22,7; 38,3)
3	Rituximab	12 (8,3%)	4 (4; 8)	7,6 (7,0; 25,7)
4	GB	8 (5,6%)	5,5 (1; –)	33,7 (17,5; –)
5	FCR	2 (1,4%)	5	59
6	R-Chl	2 (1,4%)	4	28,8
7	R-CVP	1 (0,7%)	6	19,8
8	G-CVP	1 (0,7%)	6	21,2
9	RFMD	1 (0,7%)	6	35,5

Поддерживающая терапия проводилась у 84 (58,3%) пациентов (у 80 больных применялась поддерживающая терапия ритуксимабом, у 4 – обинутузумабом). Медиана количества циклов поддерживающей терапии составила 12 (10 и 90 процентили: 4; 12). Полный ответ был достигнут у 94 (65,3%) пациентов, ЧО – у 34 (23,6%), стабилизация отмечалась у 3 (2,1%) пациентов, при этом у 13 (9,0%) больных не удалось достичь объективного ответа. Медиана времени до достижения ПО составила 5,4 месяцев (10 и 90 процентили: 2,8; 23,0), до ЧО – 3,4 месяца (10 и 90 процентили: 1,6; 6,4). Медиана продолжительности ПО равнялась 28,5 месяцев (10 и 90 процентили: 8,4; 70,9), ЧО – 13,8 месяцев (10 и 90 процентили: 3,4; 49,6). Частота ПЗ составила 20,1% (95% ДИ: 13,9–27,6, n = 29), частота рецидивов – 16,7% (95% ДИ: 11,0–23,8, n = 24), а частота трансформаций – 2,8% (95% ДИ: 0,1–3,1, n = 4). Медиана времени до ПЗ равнялась 11,7 месяцев (10 и 90 процентили: 2,6; 45,0), до рецидива – 30,1 месяцев (10 и 90 процентили: 11,7; 88,1), до трансформации – 10,4 месяцев (10 и 90 процентили: 0,5; –).

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%) и другие (R-DHAP, R-GDP, R-Duvelisib и др.) – 9 (24%), рисунок 5.

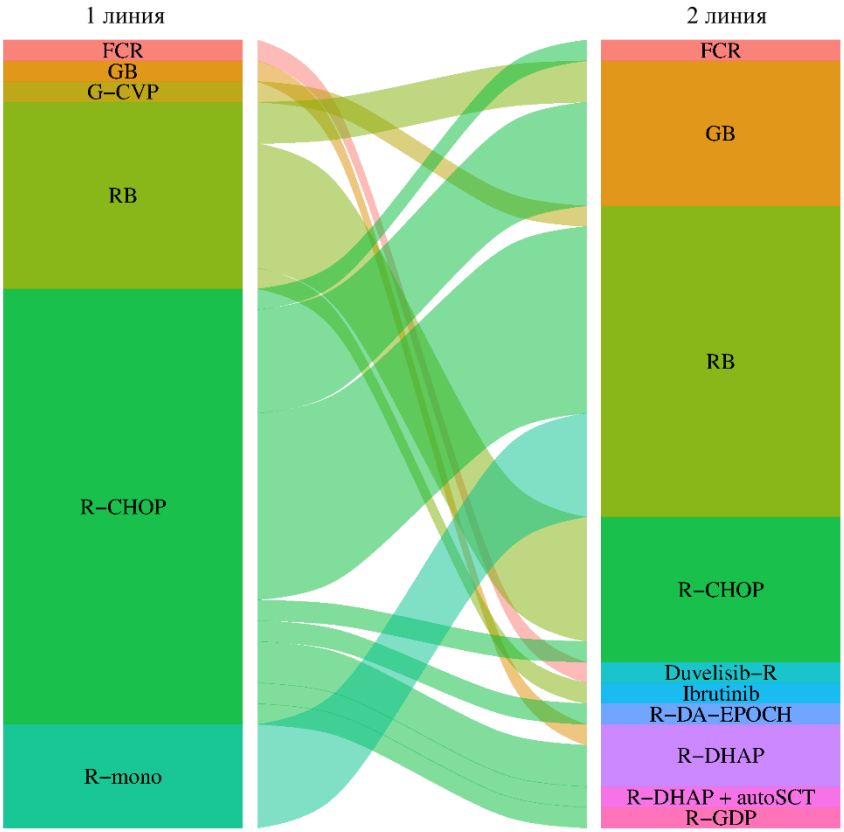


Рисунок 5 – Диаграмма Sankey, характеризующая последовательность лечения пациентов с ФЛ в исследуемой выборке (левый столбец – первая линия терапии, правый столбец – вторая линия терапии)

Пятилетняя ОВ выживаемость составила 70,6% (95% ДИ: 62,7–78,1, медиана не достигнута), пятилетняя безрецидивная выживаемость (ВБР) – 55,0% (95% ДИ: 44,7–65,6, медиана не достигнута), пятилетняя ВБП – 58,3% (95% ДИ: 49,8–66,5, медиана не достигнута), а пятилетняя БСВ равнялась 45,1% (95% ДИ: 36,8–53,6, медиана 4,3 года), рисунок 6. Частота объективных ответов на терапию первой линии составила 88,9% (95% ДИ: 82,6–93,5).

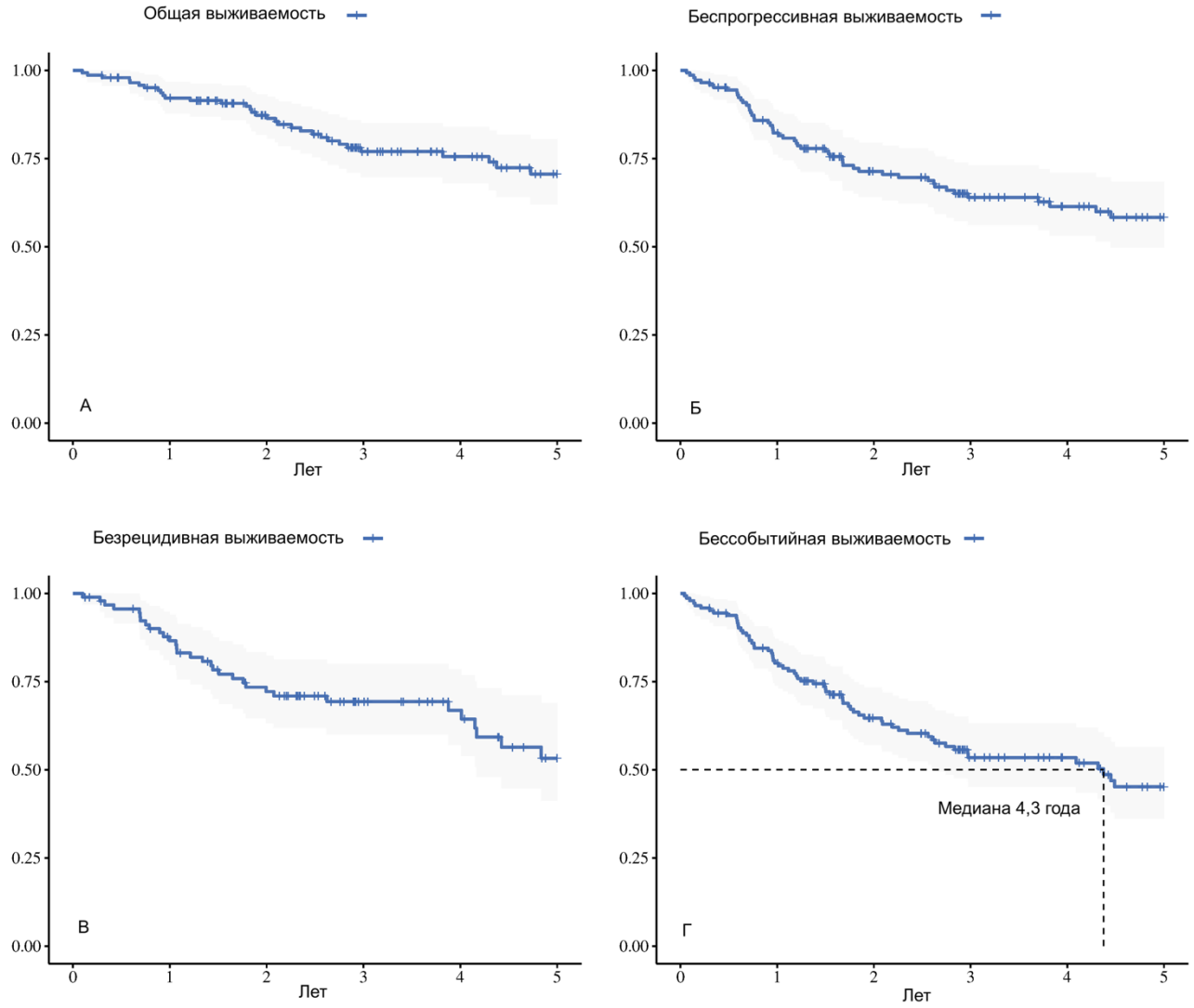


Рисунок 6 – Пятилетние общая (А), беспрогрессивная (Б), безрецидивная (В) и бессобытийная (Г) выживаемость у пациентов с ФЛ

3.2 Лабораторные методы исследования

Клинический анализ крови выполнялся с помощью гематологического анализатора Sysmex XN-1000 и других аналогичных гематологических анализаторов с последующим подсчетом лейкоцитарной формулы на микроскопе. Биохимические показатели сыворотки крови больных рассчитывались на анализаторе COBAS Integra 400 plus. Исследование коагулограммы проводилось на анализаторе ACL Elite Pro.

Забор костного мозга при аспирационной и трепанобиопсии осуществлялся с помощью игл типа Jamshidi из подвздошной с последующим цитологическим, гистологическим и ИГХ исследованиями.

Иммунофенотипирование (ИФТ) проводилось на проточном цитофлуориметре NAVIOS (Beckman Coulter) в десятицветном анализе с использованием МКАТ Beckman Coulter.

3.2.1 Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH)

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.

FISH на суспензии клеток периферической крови:

Первый этап (день 1). Эппендорф с суспензией центрифугировали в микроцентрифуге 5 минут/1000 оборотов. В отдельном эппендорфе осадок разбавляли фиксатором. Далее осадок наносили пипеткой на стекло (адгезивное, с поли-L-лизином), которое помещали на термоплату (предварительно нагреть до 65 °С) до высыхания. Под микроскопом размещали участок (в поле зрения должно быть не менее 200 клеток). Подготавливали пробу (4 мкл – буфер, 0,5 мкл – дистиллированная вода, 0,5 мкл – зонд), которую затем наносили на предметное стекло и закрывали покровным стеклом. Денатурация проводилась в течение 2 минут при температуре 73 °С, гибридизация – при температуре 37 °С не менее 17 часов.

Второй этап (день 2). Предварительно нагревали водяную баню до 72–73 °С, далее готовили раствор 0,4 SSC (1 мл 20 SSC/49 мл дистиллированной воды на один сосуд Коплина). Снимали клей и покровное стекло, предметное стекло помещали в первый сосуд Коплина в баню на 2 минуты. Отмывку продолжали во втором сосуде Коплина при комнатной температуре в течение 2 минут. Готовили DAPI (190 мкл vectashiled /10 мкл DAPI), на предметное стекло наносили 8 мкл и накрывали покровным стеклом.

FISH на мазках периферической крови:

Первый этап (день 1). Мазки помещали в фиксатор на 1 час, далее высушивали на воздухе 15–20 минут. Водяную баню нагревали до температуры 37 °С. Готовили сосуд Коплина с раствором пепсина, активированного HCl (50 мл дистиллированной воды, 100 мкл стокового раствора пепсина), и вместе с сосудом Коплина с раствором 20SSC (5 мл 20SSC/45 мл дистиллированной воды) помещали в баню. Стекло помещали в сосуд Коплина с активированным пепсином на 2 минуты, затем в раствор 20SSC на 20 минут. Проводку по спиртам (70%, 85%, 100%) производили по 2 минуты в каждом. Далее стекла высушивали на воздухе, размечали участок и наносили пробу.

Второй этап (день 2). Предварительно нагревали баню до 72–73°С. Готовили раствор 0,4 SSC (1 мл 20SSC/49 мл дистиллированной воды – на 1 сосуд Коплина). Снимали клей и покровное стекло, предметное стекло помещали в первый сосуд Коплина в баню на 2 минуты.

Во втором сосуде Коплина осуществляли отмывку при комнатной температуре в течение 2 минут. Готовили DAPI (190 мкл vectashiled/10 мкл DAPI), 8 мкл DAPI наносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом.

При исследовании каждого зонда анализировали 200 интерфазных ядер. Интерпретация патологии кариотипа и полученных результатов производилась в соответствии с Международной номенклатурой (ISCN, 2020) [146].

3.2.2 Секвенирование по Сэнгеру

Мутационный статус 16 экзона гена *EZH2* оценивали с помощью секвенирования по Сэнгеру в три этапа.

1. Выделение геномной ДНК из периферической крови

Для выделения геномной ДНК использовали метод хлороформной экстракции. Гемолиз эритроцитов проводили с помощью NH_4Cl (pH 6,97, 0,83%). К 3 мл крови добавляли 12 мл NH_4Cl и инкубировали 20 минут при температуре +4 ºС. Полученную суспензию центрифугировали 10 минут при 2400g. Из полученного осадка лейкоцитов отбирали 10–20 мкл и ресуспендировали в 400 мкл лизирующего буфера и инкубировали 10 минут при температуре +65 ºС. Далее добавляли 600 мкл хлороформа, центрифугировали 10 минут при 13000g и переносили водную фазу, содержащую ДНК, преципитирующий буфер. После преципитации центрифугировали 4 минуты при 13000g и растворяли в 1,2 М NaCl. ДНК осаждали в 96% C_2H_5OH при –20 ºС, отмывали в 70% C_2H_5OH, высушивали осадок 7 минут при температуре +55 ºС. Высушенный осадок растворяли в 100 мкл H_2O.

2. Амплификация 16 экзона гена EZH2

Для амплификации использовали набор реагентов «ПЦР-микс» («Синтол», Россия). В реакционную смесь добавляли по 10 пмоль прямого и обратного праймера и 20–100 нг геномной ДНК. Реакцию проводили в программируемом термостате «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Наличие продукта амплификации оценивали с помощью электрофореза в 6% полиакриламидном геле.

3. Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование образцов проводили на автоматической капиллярной системе MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences, Великобритания). Полученный результат секвенирования анализировали в программах Vector NTI и UGENE.

3.2.3 Секвенирование следующего поколения (NGS)

Анализ NGS проводился на платформе NextSeq (Illumina, USA) методом парно-концевого чтения. Образцы ДНК выделялись 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 (лимфоидная таргетная NGS панель, таблица 4), согласно протоколу производителя.

Таблица 4 – 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								

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 1000x. 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 клинической значимости предположительно соматических вариантов проводилась на основании рекомендаций AMP (Association for Molecular Pathology) [133], герминальных вариантов на основании рекомендаций ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) [192]. В конечном итоге выявленные

варианты нуклеотидной последовательности распределялись на пять групп: патогенный (pathogenic); вероятно патогенный (likely pathogenic); неопределенного значения (uncertain significance); вероятно доброкачественный (likely benign); доброкачественный (benign) [13].

3.3 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 использованием Metascape (https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1) [250] и g:Profiler (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost) [190].

Все количественные переменные проверены на нормальность распределения по критериям Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова, в случае расхождения результатов обоих критериев переменные дополнительно оценивались по совокупности параметров: значение коэффициентов эксцесса и асимметрии, частотным гистограммам и нормально-вероятностным графикам. 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 (одно из значений четырехпольной таблицы $2 \times 2 < 5$) – 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. Взаимодействие трех и более категориальных переменных оценивалось с помощью логлинейного анализа. 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 $p \leq 0{,}05$. В анализе GSEA применялась поправка Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений (q-значение) [103].

Общую выживаемость определяли со дня верификации диагноза (даты биопсии) до даты смерти от любой причины. Точкой отсчета для ВБП и БСВ считали дату первого дня первого цикла терапии, для 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.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА У ПАЦИЕНТОВ С ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ

4.1 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* – 14,0% (13/93). У пациентов с перестройками гена *BCL2* отмечались более высокие значения СИ в дебюте заболевания – 624 см^3 (10 и 90 процентили: 373; 1853) против 504 см^3 (10 и 90 процентили: 300; 1782) у пациентов без перестроек гена *BCL2* (контрольная группа), p = 0,033. Также имелись достоверные различия в динамике уменьшения SPD на фоне проводимой терапии. В группе с изменением гена *BCL2* отмечалось снижение SPD на –62,1% (10 и 90 процентили: –94,5; –17,0) против –88,0% (10 и 90 процентили: –96,2; –53,5) в контрольной группе, p = 0,007, рисунок 7. Однако достоверных различий по уровню SPD в дебюте заболевания между группами не наблюдалось, p = 0,851.

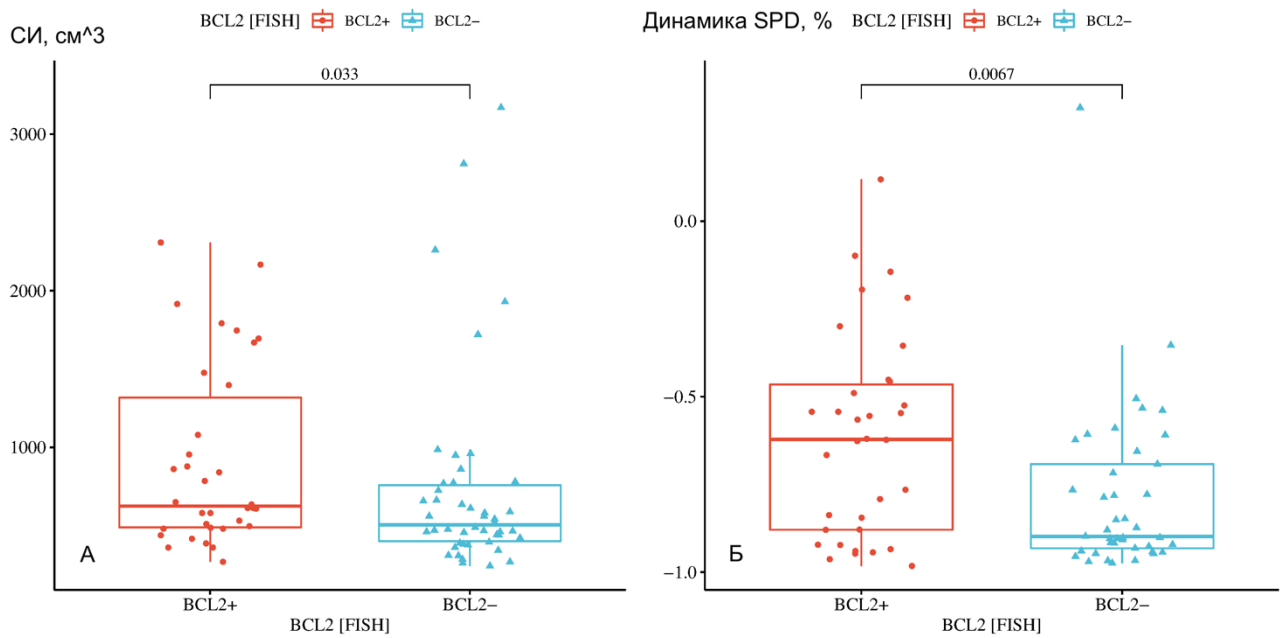


Рисунок 7 – Значение СИ (А) в дебюте заболевания и динамика изменения SPD (Б) после окончания индукционного этапа терапии у пациентов с ФЛ в зависимости от наличия изменений гена *BCL2*

У пациентов с аберрациями гена *BCL2* уровень лейкоцитов и лимфоцитов в дебюте был значимо выше, чем у пациентов с нормальным геном – 7,6 × 10^9/л (10 и 90 процентили: 3,7; 36,4) против 5,7 × 10^9/л (10 и 90 процентили: 3,2; 10,1), p = 0,029 и 2,5 × 10^9/л (10 и 90 процентили: 0,9; 31,9) против 1,4 × 10^9/л (10 и 90 процентили: 0,6; 3,1), p = 0,001 соответственно. Длительность

наблюдения (с момента постановки диагноза и до первого дня первого цикла терапии) у пациентов с аберрациями гена *BCL2* была достоверно ниже, чем в контрольной группе – 46 дней (10 и 90 процентили: 15; 222) против 77 дней (10 и 90 процентили: 18; 531), p = 0,017. По другим количественным показателям статистически значимых различий между группами не наблюдалось (p > 0,05). Перестройки гена *BCL2* ассоциированы с более частым поражением КМ, ОШ составило 2,28 (95% ДИ: 1,01–5,13), p = 0,049 и с более высокой частотой del17p/*TP53*, ОШ – 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, медиана не достигнута), а у пациентов без изменений гена – 69,2% (95% ДИ: 55,7–80,1, медиана не достигнута), p = 0,296. В однофакторном анализе ОР составил 1,43 (95% ДИ: 0,73–2,80), p = 0,299. Кроме того, у пациентов с перестройками гена *BCL2* пятилетняя ВБР равнялась 64,9% (95% ДИ: 42,5–82,0, медиана не достигнута), а у больных с вариантом гена дикого типа – 33,0% (95% ДИ: 19,1–50,2, медиана 47,2 месяца), p = 0,162. ОР для перестроек гена *BCL2* в отношении пятилетней ВБР равнялся 0,50 (95% ДИ: 0,18–1,35), p = 0,169. Аномалии в генах *BCL6,* del17p/*TP53* также не оказывали значимого влияния на показатели выживаемости, p > 0,4.

В многофакторном регрессионном анализе Кокса (характеристики модели: $\chi^2 = 2,533$, p = 0,469) ОР для перестроек генов *BCL2, BCL6,* del17p/*TP53* в отношении двухлетней ВБП равнялся больше 1,2, однако данные статистически незначимы. Точные значения ОР с указанием уровня достоверности приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Относительный риск для перестроек генов *BCL2, BCL6,* del17p/*TP53* в прогнозировании двухлетней ВБП

Фактор	ОР [95% ДИ]	p
BCL2	1,72 [0,81–3,64]	0,157
BCL6	1,24 [0,46–3,33]	0,669
del17p/*TP53*	1,22 [0,45–3,33]	0,699

С прогностической точки зрения наиболее неблагоприятной группой является сочетание аномалий в генах *BCL2* и *BCL6*, таблица 6. Двухлетняя ОВ пациентов данной группы составила 40,0% (95% ДИ: 4,3–77,7, медиана 18,6 месяцев), что достоверно ниже, чем у пациентов без сочетания данных генетических изменений, p = 0,025.

Таблица 6 – Выживаемость пациентов с ФЛ 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: ВБП – выживаемость без прогрессирования, ОВ – общая выживаемость;

[1,2,3,4] – различия между группами в анализе двухлетней выживаемости достоверны (p = 0,014, p = 0,005, p = 0,045 и p = 0,015 соответственно)

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), рисунок 8.

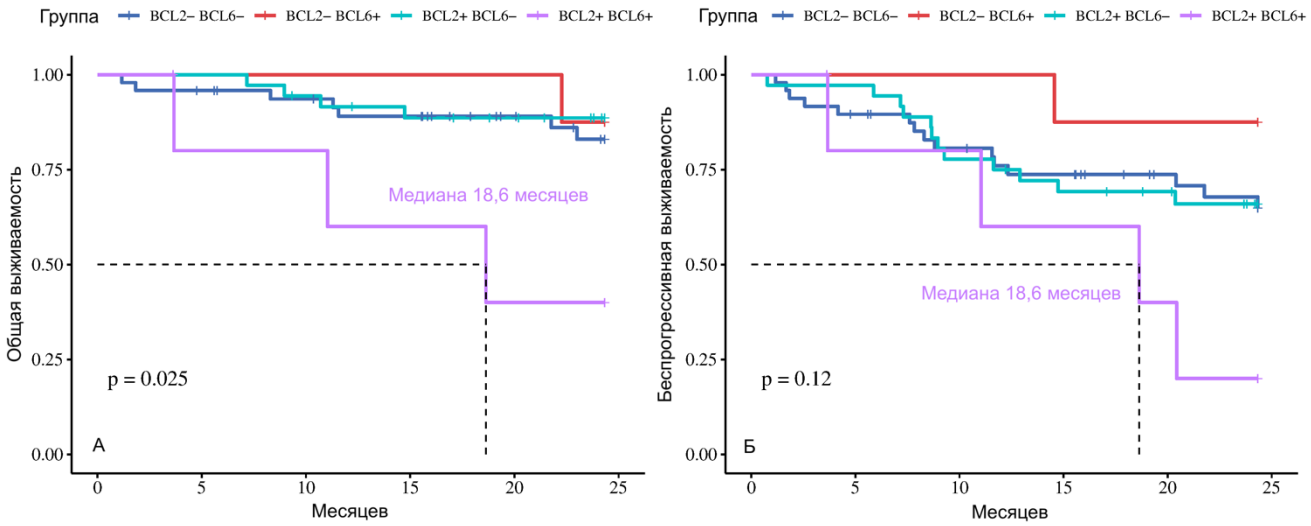


Рисунок 8 – Двухлетние общая (А) и беспрогрессивная (Б) выживаемость у пациентов с ФЛ в зависимости от наличия изменений в генах *BCL2* и *BCL6*

Для оценки прогностической значимости сочетания аберраций в гене *BCL2* и del17p/*TP53* вместо четырех групп в анализе использовалось распределение пациентов на две группы (в связи с малым размером выборки и низкой частотой событий del17p/*TP53*): пациенты с сочетанными аберрациями (*BCL2*+del17p/*TP53*+) и контрольная группа – с другими возможными сочетаниями (без перестроек или с перестройкой одного из генов в паре). Таким образом, в первую группу вошло 9 пациентов, во вторую – 84. Двухлетняя ОВ пациентов с сочетанными аберрациями генов составила 77,8% (95% ДИ: 40,0–97,2, медиана не достигнута), что соответствует выживаемости пациентов без данных изменений – 84,1% (95% ДИ: 75,0–91,5, медиана не достигнута), p = 0,63. Двухлетняя ВБП в группе *BCL2*+del17p/*TP53*+ равнялась 44,4% (95% ДИ: 13,7–78,8, медиана

14,7 месяцев) и была ниже, чем в контрольной группе – 68,3% (95% ДИ: 56,8–77,6, медиана не достигнута), однако различия не достоверны, p = 0,11. Аналогичные результаты были получены в анализе двухлетней БСВ – 33,3% (95% ДИ: 7,5–70,1, медиана 14,7 месяцев) против 62,0% (95% ДИ: 50,7–72,3, медиана не достигнута) соответственно, однако различия статистически незначимы, p = 0,075.

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, медиана не достигнута), 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 (n = 45) не выявил различий в эффективности режимов R-CHOP и RB, p > 0,4, рисунок 9.

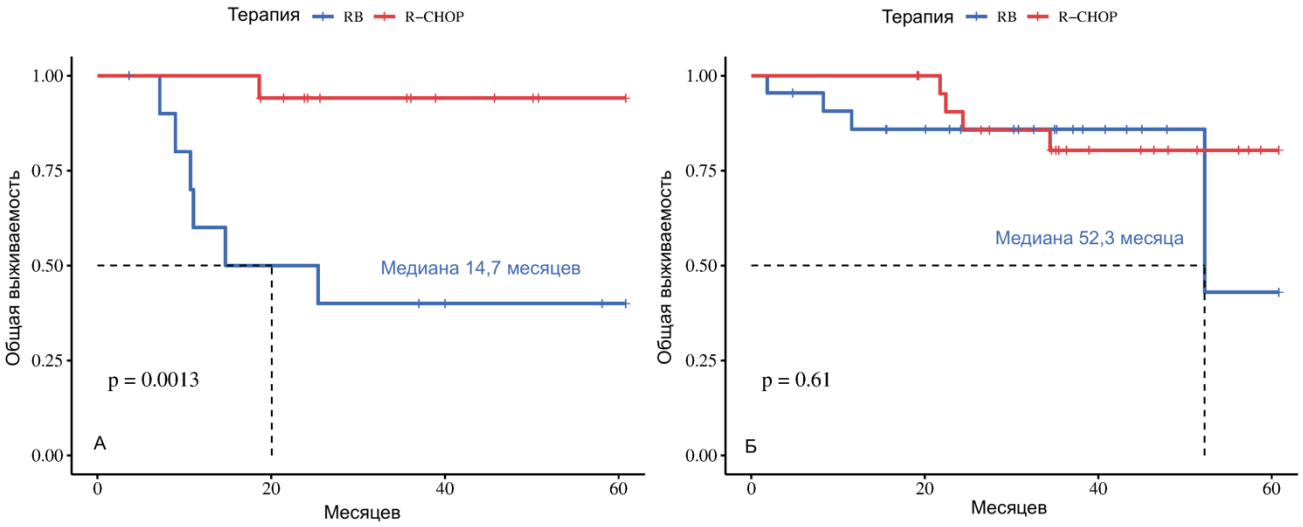


Рисунок 9 – Пятилетняя ОВ у пациентов с t(14;18) (А) и без t(14;18) (Б) в зависимости от варианта терапии первой линии (R-CHOP против RB)

Таким образом, мы установили частоту встречаемости основных генетических аберрацией у пациентов с ФЛ, оценили их прогностическую значимость и впервые продемонстрировали, что у пациентов с сочетанием перестроек генов *BCL2* и *BCL6* отмечается наиболее неблагоприятный прогноз. Нами также было показано, что у t(14;18)-позитивных пациентов эффективность режима ИХТ R-CHOP достоверно лучше, чем RB, в отличие от t(14;18)-негативных больных, у которых оба режима терапии имеют схожую эффективность (p > 0,4).

4.2 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 (p.Y646X). Клиническая характеристика пациентов в зависимости от мутационного статуса гена *EZH2* (дикий тип и мутация) представлена в таблице 7. Частота встречаемости 3А–3В цитологического типа у пациентов без мутации составила 36,9%, что значимо выше, чем в группе с мутацией – 10,6%, p = 0,025. Обе группы достоверно различались по уровню экспрессии CD10 (p = 0,036), а также в группе с мутацией гена *EZH2* отмечалась более низкая экспрессия Bcl-6 (p = 0,068). По другим клиническим и лабораторным параметрам значимых межгрупповых различий не наблюдалось.

Таблица 7 – Сравнительная характеристика пациентов с мутацией гена *EZH2* и пациентов без мутации (дикий тип)

Параметр	Дикий тип (n = 92)	Мутация (n = 19)	p
Возраст			
медиана, лет	57,5 (36,0; 71,0)	48,0 (26,0; 72,0)	0,125
ECOG			
0–1 ≥ 2	69 (75,8%) 22 (24,2%)	17 (89,5%) 2 (10,5%)	0,237
Цитологический тип			
1–2 3А–3В	58 (63,1%) 34 (36,9%)	17 (89,4%) 2 (10,6%)	0,025*
GELF-критерии			
bulky disease	37 (40,2%)	7 (36,8%)	1,000
поражение ≥ 3 лимф. зон, размерами ≥ 3 см	62 (67,4%)	15 (78,9%)	0,418
спленомегалия	39 (42,4%)	8 (42,1%)	1,000
В-симптомы	47 (51,1%)	6 (31,6%)	0,138
плеврит и/или асцит	15 (16,3%)	3 (15,8%)	1,000
цитопения	2 (2,2%)	1 (5,3%)	0,434
лейкемический состав крови (опухолевые клетки > 5,0 × 10^9/л)	13 (14,1%)	3 (15,8%)	1,000
Поражение костного мозга	49 (53,3%)	10 (52,6%)	1,000
Экстранодальные поражения	26 (28,3%)	6 (31,6%)	0,785
Стадия (Ann Arbor)			
I–II III–IV	9 (9,8%) 83 (90,2%)	1 (5,3%) 18 (94,7%)	1,000
Клинический анализ крови			
Лейкоциты, × 10^9/л	6,2 (3,4; 16,8)	6,9 (2,9; 38,2)	0,776
Гемоглобин, г/л	134 (102; 151)	132 (113; 159)	0,512
Тромбоциты, × 10^9/л	234 (138; 387)	207 (128; 355)	0,539
Лимфоциты, × 10^9/л	1,5 (0,7; 9,6)	2,4 (0,6; 31,4)	0,357
СОЭ, мм/ч	13 (5; 41)	7 (2; 27)	0,104

Продолжение таблицы 7

Параметр	Дикий тип (n = 92)	Мутация (n = 19)	p
Биохимические показатели			
β2-МГ, мг/л	5,2 (2,2; 8,7)	6,2 (1,5; 10,9)	0,379
ЛДГ, Ед/л	222 (149; 465)	203 (137; 390)	0,355
ИГХ-исследование			
CD10	61 (76,3%)	16 (100,0%)	0,036*
CD23	54 (67,5%)	10 (62,5%)	0,774
Bcl-2	68 (85,0%)	15 (93,8%)	0,688
Bcl-6	60 (75,0%)	8 (50,0%)	0,068**
Ki-67, %	30 (10; 84)	20 (10; –)	0,332

Примечание: ЛДГ – лактатдегидрогеназа, СОЭ – скорость оседания эритроцитов, β2-МГ – бета-2-микроглобулин;

* – различия между группами достоверны, $p \leq 0,05$,

** – отмечены различия с уровнем значимости $p < 0,1$

Сравнение показателей ИФТ в зависимости от наличия мутации гена *EZH2* представлено на рисунке 10. Выявлена тенденция к более высокой экспрессии В-клеточных кластеров дифференцировки у пациентов с мутацией гена *EZH2*, однако различия статистически незначимы ($p > 0,13$).

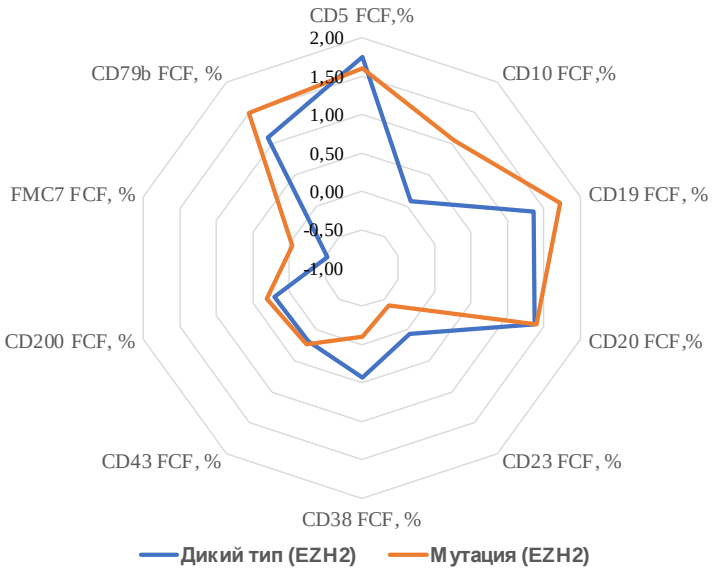


Рисунок 10 – Лепестковая диаграмма, демонстрирующая значения показателей ИФТ в зависимости от мутационного статуса гена *EZH2* (значения указаны в логарифмической шкале с основанием 10)

У пациентов с мутацией гена *EZH2* чаще отмечались перестройки гена *BCL2* (FISH) – 60,0% (95% ДИ: 24,5–71,1) против 39,0% (95% ДИ: 23,2–43,2) в группе дикого типа, однако

различия статистически незначимы, p = 0,159. Частота наличия перестроек генов *BCL6* (FISH) и del17p/*TP53* (FISH) в обоих группах достоверно не различалась, p = 0,454 и p = 0,685 соответственно.

В группе дикого типа 42 (59,2%) пациента получало терапию R-CHOP и 29 (40,8%) – терапию RB, оставшиеся 21 человек лечились по другим схемам, из которых режим GB применялся у 8 (8,7%) пациентов, ритуксимаб в монорежиме – у 10 (10,9%). В группе мутация 10 (55,6%) пациентов получало ИХТ R-CHOP, 8 (44,4%) человек лечилось 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), таблица 8. Соотношение проводимой терапии значимо не различалось в обоих группах (RB/R-CHOP), p = 0,795.

Таблица 8 – Результаты терапии (R-CHOP/RB) в группе с мутацией гена *EZH2* и в группе без мутации (дикий тип)

Параметр	Дикий тип (n = 71)	Мутация (n = 18)	p
Время, месяцев: медиана (10; 90 процентили)			
длительность наблюдения	45 (15; 458)	56 (14; 332)	0,850
время до ЧО	3,8 (1,9; 7,3)	2,8 (1,4; –)	0,069**
длительность ЧО	10,4 (3,8; 32,8)	20,1 (2,7; –)	0,762
время до ПО	5,1 (2,8; 15,7)	4,7 (1,7; 54,0)	0,824
длительность ПО	20,1 (5,8; 56,1)	29,8 (6,6; 61,8)	0,189
время до ЧОО	3,9 (2,6; 11,9)	3,0 (1,5; 6,0)	0,053**
длительность ЧОО	14,2 (0; 48,0)	28,7 (0,2; 69,5)	0,044*
время до ПЗ	9,2 (1,7; 18,8)	8,6 (–; –)	0,665
время до рецидива	26,7 (9,0; 88,6)	8,6 (–; –)	0,571
Частоты (%)			
ЧО	30 (42,3%)	9 (50,0%)	0,602
ПО	41 (57,7%)	14 (77,8%)	0,175
ЧОО	62 (87,3%)	17 (94,4%)	0,680
частота ПЗ	19 (26,8%)	1 (5,6%)	0,063**
частота рецидивов	13 (18,3%)	1 (5,6%)	0,284
частота трансформаций	1 (1,4%)	0 (0,0%)	НД
частота всех событий***	33 (46,5%)	2 (11,1%)	0,012*

Примечание: ПЗ – прогрессирование заболевания, ПО – полный ответ, ЧО – частичный ответ, ЧОО – частота объективных ответов;

* – различия между группами достоверны, p ≤ 0,05,

** – отмечены различия с уровнем значимости p < 0,1,

*** – прогрессирование, рецидив, трансформация, смерть

Медиана SPD после окончания терапии первой линии у пациентов с мутацией гена *EZH2* составила 1204 см^2 (10 и 90 процентили: 458; 7989), редукция объема опухолевой массы по динамике изменения SPD равнялась –75,8% (10 и 90 процентили: –89,5; –48,3). В группе дикого типа SPD после лечения равнялась 585 см^2 (10 и 90 процентили: 298; 2882), а редукция опухолевой массы составила –87,3% (10 и 90 процентили: –96,2; –35,4), что лучше, чем в группе с мутацией, p = 0,029 и p = 0,091 соответственно, рисунок 11.

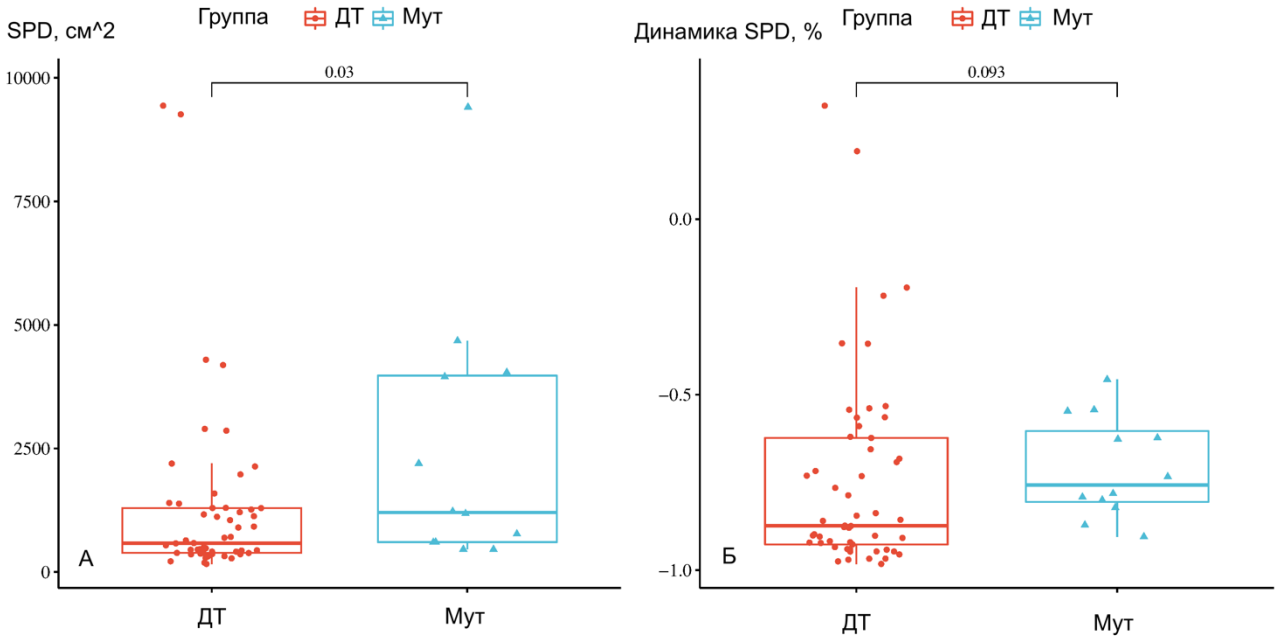


Рисунок 11 – Значение SPD (А) после окончания индукционного этапа лечения и динамика SPD (Б) у пациентов с ФЛ в зависимости от наличия мутации в гене *EZH2* (группа дикого типа – ДТ; группа мутации – Мут)

Подробное описание показателей, характеризующих опухолевую массу, представлено в таблице 9.

Таблица 9 – Объем опухолевой массы и СИ до (0) и после (1) окончания терапии первой линии в зависимости от мутационного статуса гена *EZH2*

Параметр	Дикий тип (n = 71)	Мутация (n = 18)	p
СИ0, см^3	599 (380; 1928)	580 (252; 2017)	0,604
СИ1, см^3	490 (313; 837)	403 (220; 1191)	0,256
динамика СИ, %	–8,3 (–59,7; 1,0)	–24,8 (–56,2; –4,5)	0,108
SPD0, см^2	5315 (1280; 17233)	4848 (1821; 19400)	0,988
SPD1, см^2	585 (298; 2882)	1204 (458; 7989)	0,029*
динамика SPD, %	–87,3 (–96,2; –35,4)	–75,8 (–89,5; –48,3)	0,091

Примечание: СИ – селезеночный индекс, SPD – сумма произведений перпендикулярных диаметров; * – различия между группами достоверны, p ≤ 0,05

Обе группы достоверно не различались по уровню риска в зависимости от используемого прогностического индекса, p > 0,198. У пациентов с мутацией гена *EZH2* отмечались достоверно лучшие показатели выживаемости, таблица 10. Общая двухлетняя выживаемость не различалась в обеих группах, p = 0,429, однако длительность двухлетних ВБП, ВБР и БСВ была достоверно выше в группе с мутацией гена *EZH2*. В исследуемой группе двухлетняя ВБП составила 84,2% (95% ДИ: 60,4–96,6, медиана не достигнута), что значимо выше, чем в группе дикого типа – 45,8% (95% ДИ: 45,8–66,8, медиана не достигнута), p = 0,04. Аналогичные результаты были получены в отношении ВБР, которая у пациентов с мутацией составила 92,9% (95% ДИ: 74,0–99,9, медиана не достигнута), а в группе дикого типа – 56,8% (95% ДИ: 45,8–66,8, медиана не достигнута), p = 0,024. БСВ также значимо различалась между группами и у пациентов с мутацией гена *EZH2* равнялась 84,2% (95% ДИ: 60,4–96,6, медиана не достигнута), у больных с вариантом аллеля дикого типа – 48,6% (95% ДИ: 38,3–59,6, медиана 23,1 месяца), p = 0,011.

Таблица 10 – Показатели выживаемости у пациентов с ФЛ в зависимости от мутационного статуса гена *EZH2*

Параметр	Дикий тип (n = 92)	Мутация (n = 19)	p
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)[a]	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)[b]	61,9% (38,4–83,7)	0,015*
2-летняя БСВ	48,6% (38,3–59,6)[c]	84,2% (60,4–96,6)	0,011*
5-летняя БСВ	16,8% (9,4–25,5)[c]	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, [a] – медиана пятилетней ВБП – 32,0 месяца, [b] – медиана пятилетней ВБР – 47,2 месяца, [c] – медиана двух- и пятилетней БСВ – 23,1 месяца;

* – различия между группами достоверны, p ≤ 0,05

Анализ пятилетней выживаемости продемонстрировал более высокую степень достоверности различий между исследуемыми группами. Показатели пятилетней выживаемости больных с мутацией гена *EZH2* соответствовали двухлетним значениям, за исключением безрецидивной выживаемости: у пациента FL042 отмечался рецидив через 53,8 месяцев после достижения ПО, что существенно повлияло на конечный результат, учитывая малый объем выборки. Так пятилетняя ВБР у пациентов из группы с мутацией гена *EZH2* составила 61,9%

(95% ДИ: 38,4–83,7, медиана не достигнута), в группе дикого типа – 31,7% (95% ДИ: 22,2–42,0, медиана 47,2 месяца), p = 0,015. Кривые выживаемости пациентов с ФЛ в зависимости от мутационного статуса гена *EZH2* представлены на рисунке 12.

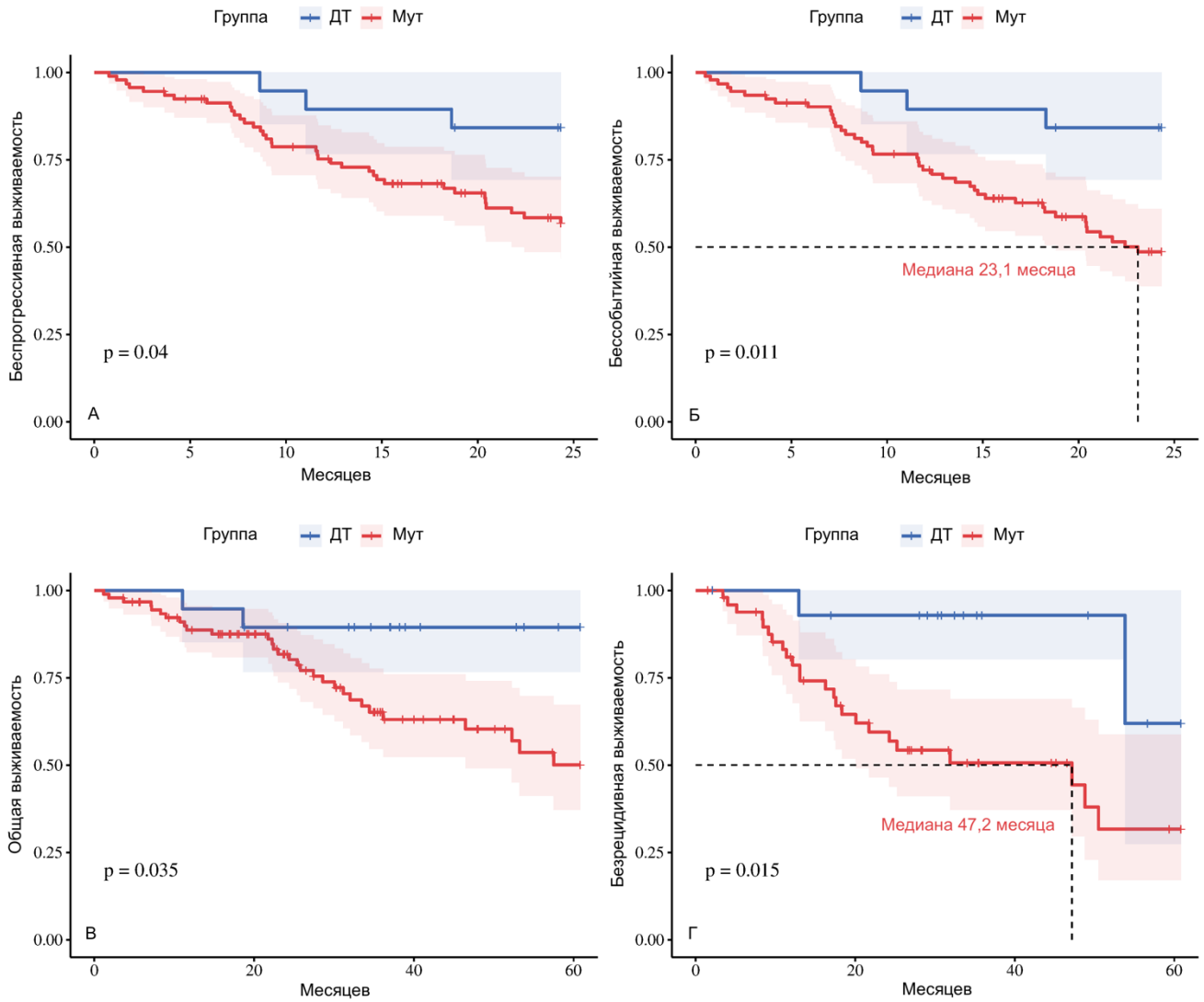


Рисунок 12 – Двухлетние беспрогрессивная (А) и бессобытийная (Б) и пятилетние общая (В) и безрецидивная (Г) выживаемость у пациентов с ФЛ в зависимости от мутационного статуса гена *EZH2* (группа дикого типа – ДТ; группа мутации – Мут)

В однофакторном регрессионном анализе Кокса мутация гена *EZH2* в отношении показателей выживаемости выступала в качестве благоприятного прогностического признака, рисунок 13. Наличие мутации снижает риск неблагоприятного события более чем в 4 раза (ОР < 0,22, p < 0,03) или уменьшает риск смерти в 4 раза (ОР = 0,24, p = 0,052).

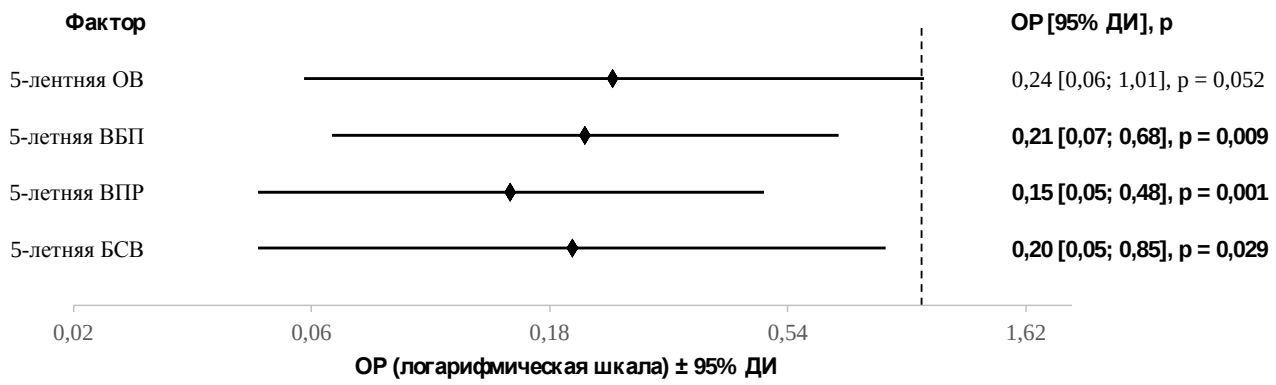


Рисунок 13 – Относительный риск для мутации гена *EZH2* в отношении показателей пятилетней выживаемости (высокий риск > 1,0; низкий риск < 1,0)

Наихудший прогноз характерен для пациентов с наличием перестроек гена *BCL2* (группа 2, n = 47), а также для больных без генетических аберраций – отсутствуют перестройки гена *BCL2* и мутации гена *EZH2* (группа 1, n = 30). Пятилетняя ВБП у пациентов группы 2 составила 32,0% (95% ДИ: 17,3–52,8), а у больных из группы 1 – 44,3 (95% ДИ: 30,2–59,9), что достоверно хуже, чем у пациентов, имеющих только мутацию в гене *EZH2* (группа 3, n = 6) – 100%, p = 0,041 и p = 0,017 соответственно. Пациенты с сочетанием перестроек гена *BCL2* с мутацией в гене *EZH2* (группа 4, n = 9) характеризуются промежуточным прогнозом, пятилетняя ВБП в данной группе составила 66,7% (95% ДИ: 29,9–92,5), что значимо не отличается от выживаемости в других группах: p = 0,538 (против группы 1), p = 0,247 (против группы 2), p = 0,104 (против группы 3). Аналогичные результаты были получены в анализе пятилетней БСВ, рисунок 14.

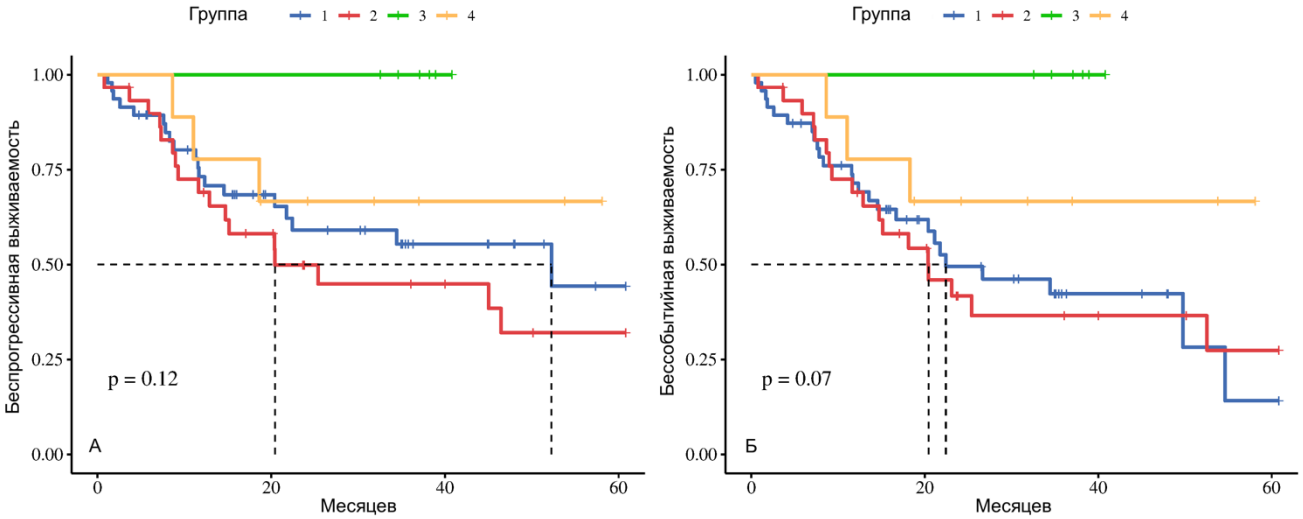


Рисунок 14 – Пятилетние беспрогрессивная (А) и бессобытийная (Б) выживаемость у пациентов с ФЛ в зависимости от наличия перестроек гена *BCL2* (группа 2), мутации гена *EZH2* (группа 3), их сочетания (группа 4) или без генетических изменений (группа 1)

Оценка безрецидивной выживаемости не проводилась по причине малого количества пациентов в выборке (n = 54) и низкой частоты событий.

Проведенный анализ главных компонент (рисунок 15) с включением 4 параметров (возраст, уровень лейкоцитов, ЛДГ и β2-МГ) продемонстрировал, что пациенты из группы 3 (только мутация гена *EZH2*) характеризуются более низкими значениями данных показателей и меньшим разбросом значений по сравнению с больными из групп 2 и 4, представляя собой достаточно обособленный кластер, но имеющим высокую долю перекрытия с больными из группы 1.

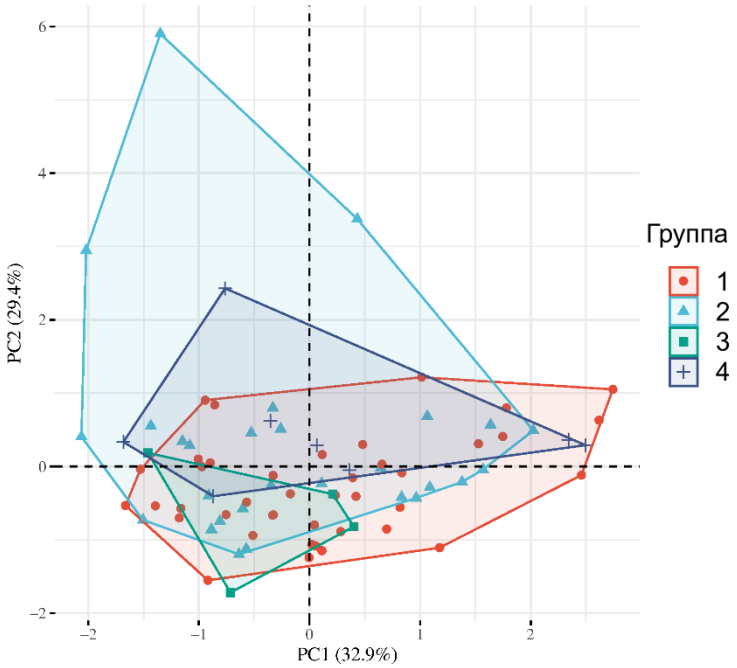


Рисунок 15 – Результаты анализа главных компонент с включением 4 переменных (возраст, лейкоциты, ЛДГ, β2-МГ) у пациентов с ФЛ в зависимости от наличия перестроек гена *BCL2* (группа 2), мутации гена *EZH2* (группа 3), их сочетания (группа 4) или без указанных генетических изменений (группа 1)

У пациентов с мутацией гена *EZH2*, а также у больных из контрольной группы по данным анализа пятилетней выживаемости (ОВ, ВБП, БСВ) не было получено преимущества в использовании какого-либо режима терапии (R-CHOP против RB), p > 0,1.

Таким образом, была установлена частота встречаемости мутаций гена *EZH2* в когорте пациентов с ФЛ, проживающих в г. Санкт-Петербурге и Ленинградской области. Показано, 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 (ПЗ, рецидив, трансформация или смерть) более чем в 4 раза.

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

С целью апробации лимфоидной таргетной NGS панели (глава 3, параграф 3.2.3, стр. 51, таблица 4), нахождения иных генетических факторов риска и поиска наиболее вовлеченных сигнальных внутриклеточных путей в патогенез ФЛ, в пилотной части диссертационного исследования было проанализировано 26 результатов NGS. Минимально необходимая глубина прочтений определялась на уровне в ≥ 1000 прочтений, а значимую частоту встречаемости аллеля (VAF) считали равной ≥ 2%, рисунок 16.

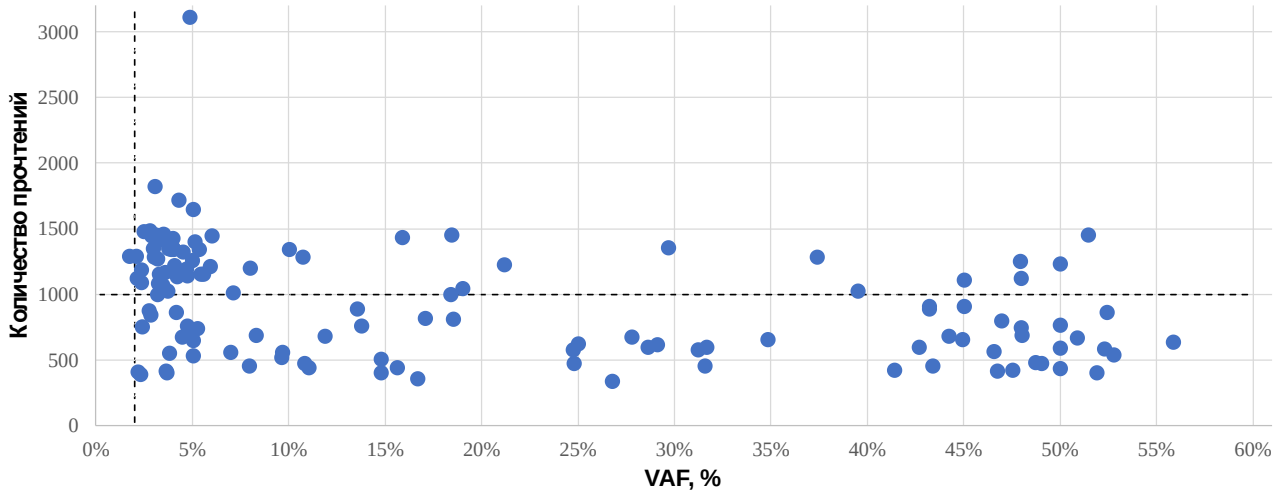


Рисунок 16 – Проверка точности панели секвенирования; штриховыми линиями обозначены границы пороговых значений количества прочтений (≥ 1000) и VAF (≥ 2%)

Генетические аберрации отмечались у всех обследованных пациентов. В 88 генах из 118 было выявлено 638 аллельных вариантов. Максимальное количество аллельных вариантов в одном гене составило 47, медиана количества аллельных вариантов равнялась 2 (10 и 90 процентили: 2–9). 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* – по 19%, *ATM* – 15%, *ARID1A* – 12%, *EZH2* – 12%, рисунок 17.

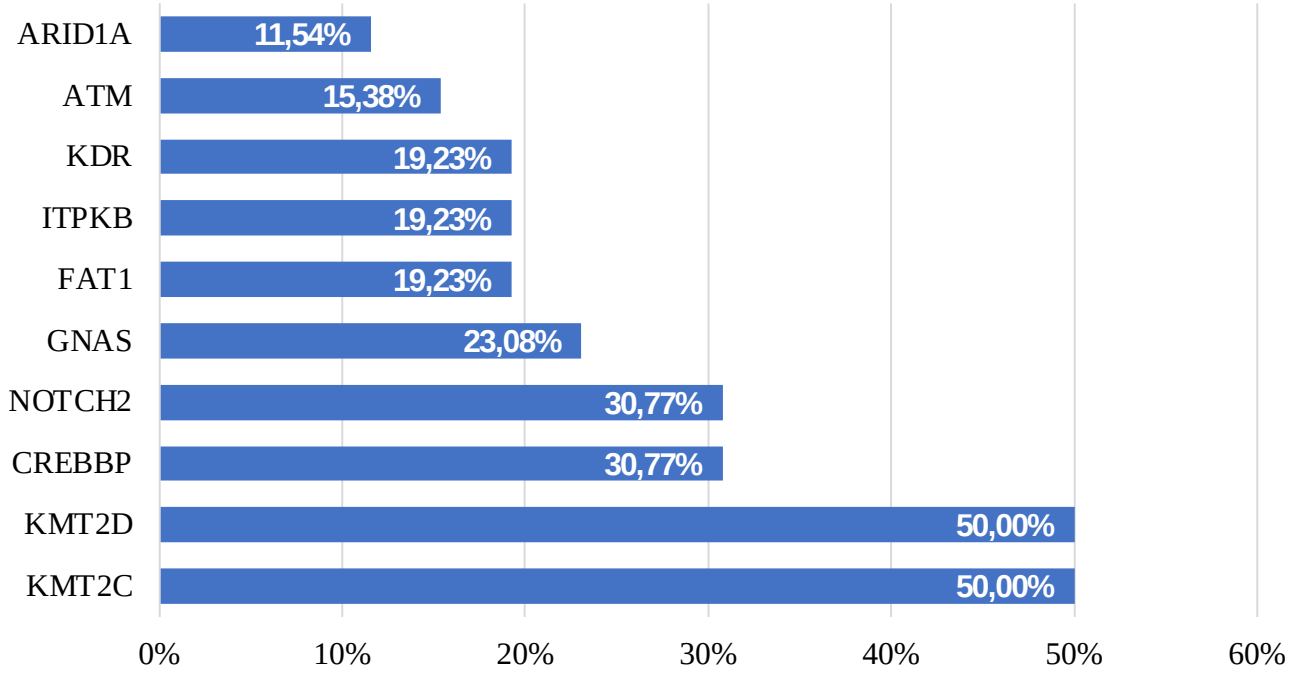


Рисунок 17 – Гистограмма относительных частот мутаций генов у пациентов с ФЛ

Миссенс-мутации встречались с частотой 84,3%, нонсенс – 5,2%, синонимичные – 4,5%, мутации со сдвигом рамки считывания – 3,8%, другие – 2,2%. Медиана VAF составила 8,96% (25 и 75 процентили: 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. В настоящий момент известно, что *ARID1A* участвует в различных биологических процессах в клетке, связанных с регуляцией клеточного цикла, генов-мишеней *P53* и репарации повреждений ДНК [181, 239]. По нашим данным, мутации гена *ARID1A* с потерей функции ассоциированы с достоверно худшей пятилетней ВБП, а также с двух- и пятилетней БСВ. Пятилетняя ВБП у больных ФЛ с мутацией гена *ARID1A* составила 0% (медиана 3,7 месяцев), а у пациентов с вариантом гена дикого типа равнялась 29,1% (95% ДИ: 13,2–52,9, медиана 52,3 месяца), p = 0,014. У больных с мутацией гена *ARID1A* двухлетняя БСВ также составила 0% (медиана 3,7 месяцев), что значимо ниже, чем в группе дикого типа – 51,8% (95% ДИ: 30,6–73,2, медиана не достигнута), p = 0,029. Аналогичные результаты были получены в отношении пятилетней БСВ (p = 0,029), рисунок 18. По результатам однофакторного регрессионного анализа ОР для мутации гена *ARID1A* в анализе пятилетней ВБП и БСВ составил 4,630 (95% ДИ: 1,205–17,793), p = 0,026 и 3,940 (95% ДИ: 1,045–14,856), p = 0,043 соответственно.

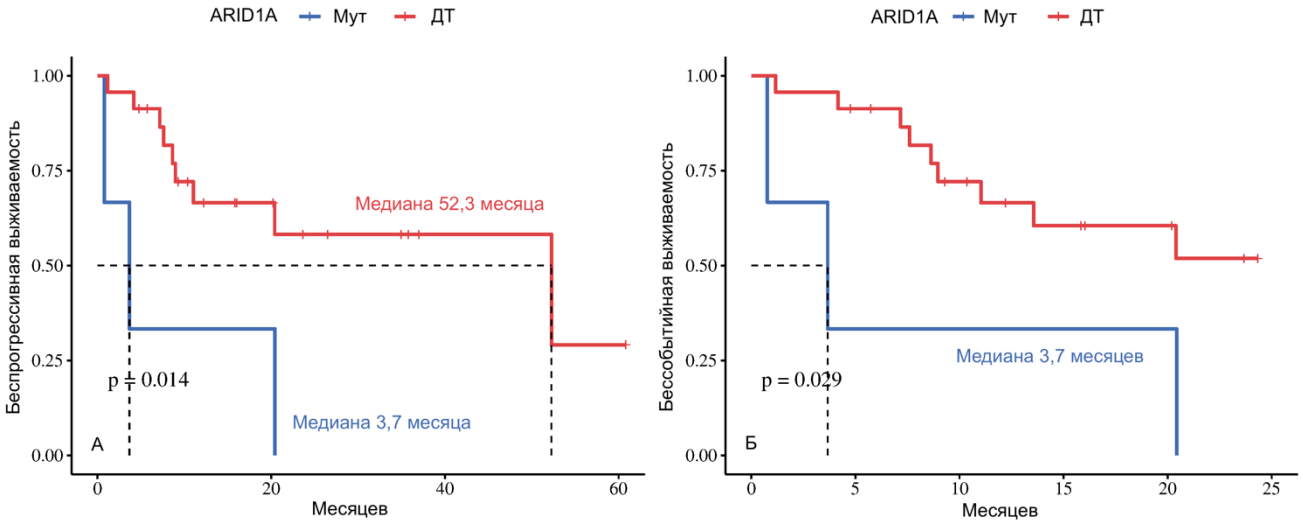


Рисунок 18 – Пятилетняя ВБП (А) и двухлетняя БСВ (Б) у пациентов с ФЛ в зависимости от мутационного статуса гена *ARID1A*

Частота мутаций гена *CREBBP* составила 30,8%, среди которых чаще всего встречались миссенс-мутации, приводящие к замене функциональной группы аминокислотного остатка в HAT-домене белка, ответственного за связывание с гистонами, что может указывать на изменение функциональных свойств продукта гена. У пациента FL158 с крайне неблагоприятным прогнозом (IV стадия, высокие уровни β2-МГ – 6,28 мг/л и ЛДГ – 428 Ед/л, лейкемический состав крови – 103,5 × 10^9/л, t(14;18), мутация генов *ARID1A*, *BCL2*, высокий риск FLIPI, резистентность к полихимиотерапии) была выявлена делеция c.5039_5041del (p.S1680del) в HAT-домене. Примечательно, что объективный ответ был достигнут только в четвертой линии терапии с применением PI3K-ингибитора дувелисиба. У пациента FL141 был обнаружен вероятно патогенный вариант нуклеотидной последовательности c.2123delT (p.L708fsX5) гена *CREBBP*, приводящий к сдвигу рамки считывания, преждевременной терминации синтеза белка и потере его функции. Большинство описываемых мутаций в гене *CREBBP* приводят к полной дисфункции HAT-домена, однако есть сведения, что точечные замены ключевых аминокислот могут иметь схожий негативный эффект [182]. Проведенный анализ выживаемости в зависимости от мутационного статуса гена *CREBBP* не выявил статистически значимых различий между группами (p > 0,1).

В гене *KMT2D*, частота мутаций которого равнялась 50%, наиболее часто обнаруживались нонсенс-мутации, приводящие к образованию стоп-кодона, обрыву синтеза белка MLL2 (KMT2D) и потере его функции. У пациента FL141, помимо ранее описанных мутаций генов *ARID1A*, *CREBBP*, были обнаружены две патогенных мутации в гене *KMT2D*, одна из которых представляет собой вариант нуклеотидной последовательности c.8366+1G>A, приводящий к исчезновению сайта сплайсинга, появлению аберрантного транскрипта и потере функции

белка. Пациенту FL141 с IV стадией и высоким риском FLIPI и FLIPI-2 была неверно инициирована моно-терапия ритуксимабом (с учетом высокого риска и неблагоприятного прогноза целесообразнее было начать комбинированную ИХТ), достигнут ЧО, после чего пациент умер в связи с ПЗ. Белок MLL2 участвует в дифференцировке клеток, регуляции метаболизма и подавлении развития опухолей, а также необходим для эмбрионального развития. Инактивирующие белок мутации гена *KMT2D* чаще всего обнаруживаются при В-клеточных лимфомах, происходящих из клеток ГЦ лимфатических фолликулов [179, 246]. Анализ выживаемости не выявил достоверных различий у пациентов в зависимости от мутационного статуса гена *KMT2D* ($p > 0,1$).

Все диагностированные мутации гена *EZH2* были сконцентрированы в 16 экзоне и представляют собой миссенс-мутацию замены тирозина на другую аминокислоту. Выявленные вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности приводят к усилению ферментативной функции белка EZH2 и изменению экспрессии генов в В-клетках [43]. Анализ выживаемости не выявил статистически значимых различий у пациентов с ФЛ в зависимости от мутационного статуса гена *EZH2* ($p > 0,1$), как по причине малой выборки, так и в связи с тем, что только один пациент (FL012) с мутацией гена *EZH2* умер из-за возникших осложнений COVID-19 инфекции, в то время, как у других больных с данной мутацией отмечалось благоприятное течение лимфомы.

Наиболее значимые найденные варианты патогенных и вероятно патогенных мутаций в генах, ассоциированных с патогенезом и прогнозом ФЛ, представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Наиболее значимые выявленные варианты патогенных и вероятно патогенных мутаций в генах, достоверно ассоциированных с патогенезом и прогнозом ФЛ

Ген	Позиция hg19	кДНК	Белок	VAF	rsID (dbSNP)
ARID1A	chr1:27105930T>TG	c.5548dupG	p.D1850fs	29,71%	rs758608743
ARID1A	chr1:27057936G>GC	c.1650dup	p.Y551Lfs*72	11,03%	rs1415146710
BCR	chr22:23653975T>TCCGG	c.3275_3278dupCCGG	p.V1094fs	16,67%	rs372013175
CREBBP	chr16:3786704A>G	c.4507T>C	p.Y1503H	39,53%	
CREBBP	chr16:3788657A>T	c.4297T>A	p.Y1433N	10,75%	
CREBBP	chr16:3827648CA>C	c.2123delT	p.L708fs	26,79%	
CREBBP	chr16:3788617C>T	c.4337G>A	p.R1446H	14,79%	rs1057519884
CREBBP	chr16:3781323AAGG>A	c.5039_5041del	p.S1680del	42,71%	rs587783502
CREBBP	chr16:3786748G>A	c.4463C>T	p.P1488L	25,00%	
EZH2	chr7:148508727T>A	c.1937A>T	p.Y646F	5,58%	rs267601394
EZH2	chr7:148508728A>T	c.1936T>A	p.Y646N	13,56%	
EZH2	chr7:148508727T>G	c.1937A>C	p.Y646S	8,30%	rs267601394
KMT2C	chr7:151962296T>C	c.1013-2A>G		5,93%	rs751158858
KMT2C	chr7:151945349T>A	c.2170A>T	p.K724*	2,38%	rs201039690

Продолжение таблицы 11

Ген	Позиция hg19	кДНК	Белок	VAF	rsID (dbSNP)
KMT2D	chr12:49445440C>A	c.2026G>T	p.Glu676*	24,74%	
KMT2D	chr12:49426798A>T	c.11690T>A	p.L3897*	3,15%	
KMT2D	chr12:49424741G>A	c.13606C>T	R4536*	31,58%	rs587783692
KMT2D	chr12:49433004C>T	c.8366+1G>A		29,13%	rs1057518149
KMT2D	chr12:49439958C>T	c.4584-1G>A		9,68%	
KMT2D	chr12:49433247G>A	c.8200C>T	p.R2734*	27,80%	

Примечание: кДНК – комплементарная ДНК, VAF – частота встречаемости аллеля, rsID – идентификатор эталонного кластера SNP (однонуклеотидного полиморфизма), dbSNP – база данных однонуклеотидных полиморфизмов

Для определения прогностической значимости всех найденных мутаций у каждого пациента была рассчитана ТМВ, которая определялась как количество мутаций на 1 мегабазу (Mb) кодирующей последовательности. Длина экзонов всех 118 исследуемых генов составила 602917 пар оснований или 0,603 Mb. Медиана ТМВ равнялась 5,0 мутаций/Mb. 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 19. Площадь под кривой (AUC) в анализе прогнозирования ОВ равнялась 0,735 (95% ДИ: 0,516–0,947), p = 0,035. Чувствительность модели при значении ТМВ, равном 5,8 мутаций/Mb, составила 75,0%, специфичность – 70,6%. По данным однофакторного регрессионного анализа (параметры модели: χ^2 = 2,744, p = 0,098) 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/Mb составила 72,7%, специфичность – 78,6%. В однофакторном регрессионном анализе (параметры модели: χ^2 = 4,336, p = 0,037) ОР для высокой ТМВ составил 3,8 (95% ДИ: 1,0–14,2), p = 0,052. При удовлетворительных показателях чувствительности и специфичности обе модели имели сравнительно одинаковую предсказательную ценность. 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 ТМВ (до 5 мутаций включительно на 1 Mb) – 14 (56%) больных, и пациенты с высокой ТМВ (6 и более мутаций на 1 Mb) – 12 (44%) больных.

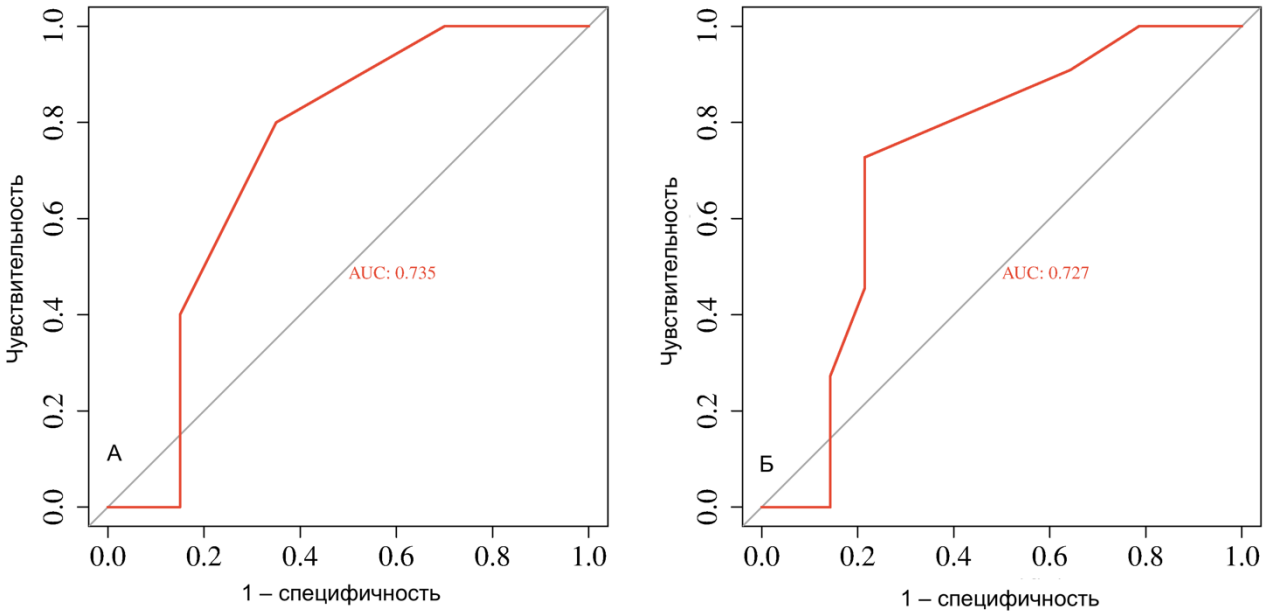


Рисунок 19 – ROC-кривые, полученные в отношении двухлетних ОВ (А) и БСВ (Б)

Обе группы достоверно не различались во возрасту (p = 0,236) и по лимфома-ассоциированным параметрам: лимфоциты (p = 0,607), ЛДГ (p = 0,589), β2-МГ (p = 0,607). Длительность наблюдения и вариант проводимой терапии также был одинаковым в обоих выборках, p = 0,217 и p = 0,120 соответственно. Объем опухолевой массы в дебюте заболевания не отличался в исследуемых группах (p = 0,150) и не коррелировал с ТМВ, коэффициент корреляции *r* составил –0,222, p = 0,275. Таким образом, можно констатировать, что обе группы являются однородными.

Двухлетняя ОВ была ниже в группе с высокой ТМВ и составила 62,3% (95% ДИ: 30,8–89,1, медиана не достигнута) по сравнению с 90,9% (95% ДИ: 66,1–99,8, медиана не достигнута) у пациентов с низкой ТМВ, 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 пациентами с низкой ТМВ – 72,7% (95% ДИ: 41,9–91,6, медиана не достигнута, p = 0,071) и 72,7% (95% ДИ: 41,9–91,6, медиана не достигнута, p = 0,037) соответственно, рисунок 20.

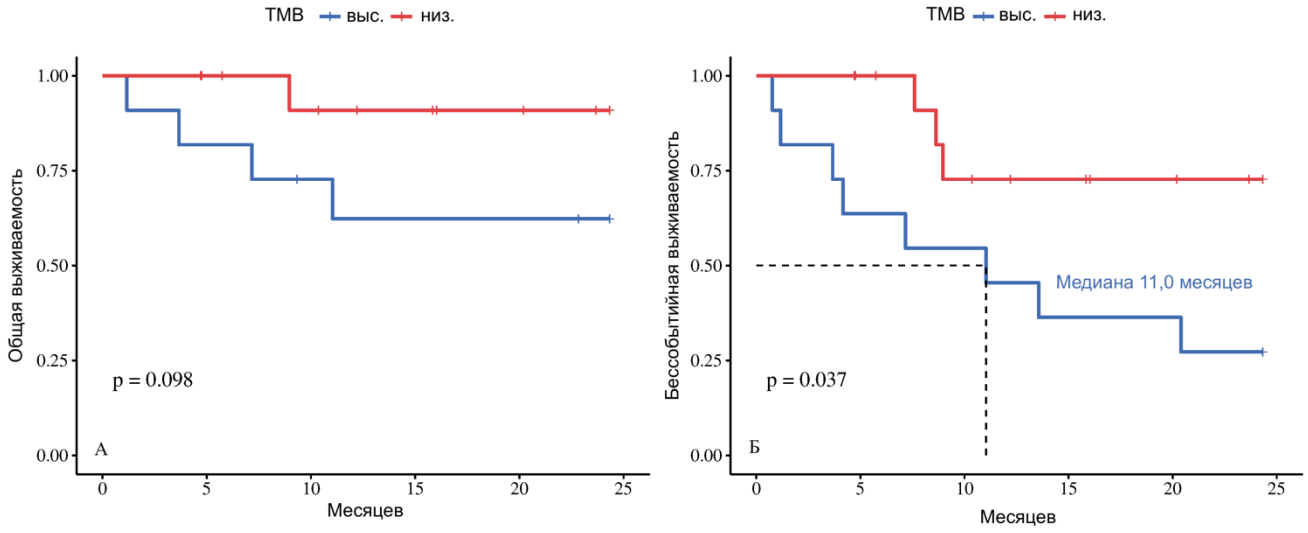


Рисунок 20 – Двухлетние ОВ (А) и БСВ (Б) у пациентов с ФЛ в зависимости от величины TMB

В группе с высокой TMB ЧОО составила 67% (95% ДИ: 35–90), в группе с низкой TMB – 71% (95% ДИ: 42–92), p = 0,793. Таким образом, обе группы не различались по частоте ПО (p = 0,716) и ЧО (p = 0,899) и, соответственно, по динамике изменения SPD (p = 0,394) и СИ (p = 0,487) после окончания индукционного этапа терапии первой линии.

Частота ПЗ была выше у пациентов с высокой TMB и составила 33% (95% ДИ: 10–65) по сравнению с больными из группы с низкой TMB – 14% (95% ДИ: 2–43), однако различия недостоверны, p = 0,250. Учитывая низкую частоту рецидивов (1/26) и трансформаций (1/26), которые наблюдались исключительно у пациентов с высокой TMB, межгрупповой анализ по данным параметрам не проводился. Таким образом, обе группы достоверно различались по частоте неблагоприятных событий (ПЗ, рецидив, трансформация), которая в группе с высокой TMB составила 50% (95% ДИ: 21–79), а в группе с низкой TMB – 2% (95% ДИ: 2–43), p = 0,049.

Для идентификации биологических клеточных процессов, вовлеченных 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 пациента, в связи с большой вероятностью случайности события), проводился анализ GSEA с использованием 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 p-значением < 0,01 и коэффициентом обогащения > 1,5 (коэффициент обогащения представляет собой отношение между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами распределения) собираются и группируются в кластеры на основе сходства их функциональной принадлежности. В частности, p-значения вычисляются на основе кумулятивного гипергеометрического распределения [244], а значения q определяются с использованием поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения

[103]. Суммарно анализ GSEA выявил 271 возможный аннотируемый биологический процесс с вовлечением трех и более генов при уровне значимости $p \leq 0{,}05$. По результатам GSEA наиболее обогащенными путями, связанными с лимфомагенезом, 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-значение) = 4,099), регуляция микроРНК при раке ($-\log_{10}$(q-значение) = 2,960), JAK-STAT сигнальный путь ($-\log_{10}$(q-значение) = 2,674), MAPK каскад ($-\log_{10}$(q-значение) = 2,335), регуляция клеточного цикла ($-\log_{10}$(q-значение) = 1,542) и др., рисунок 21.

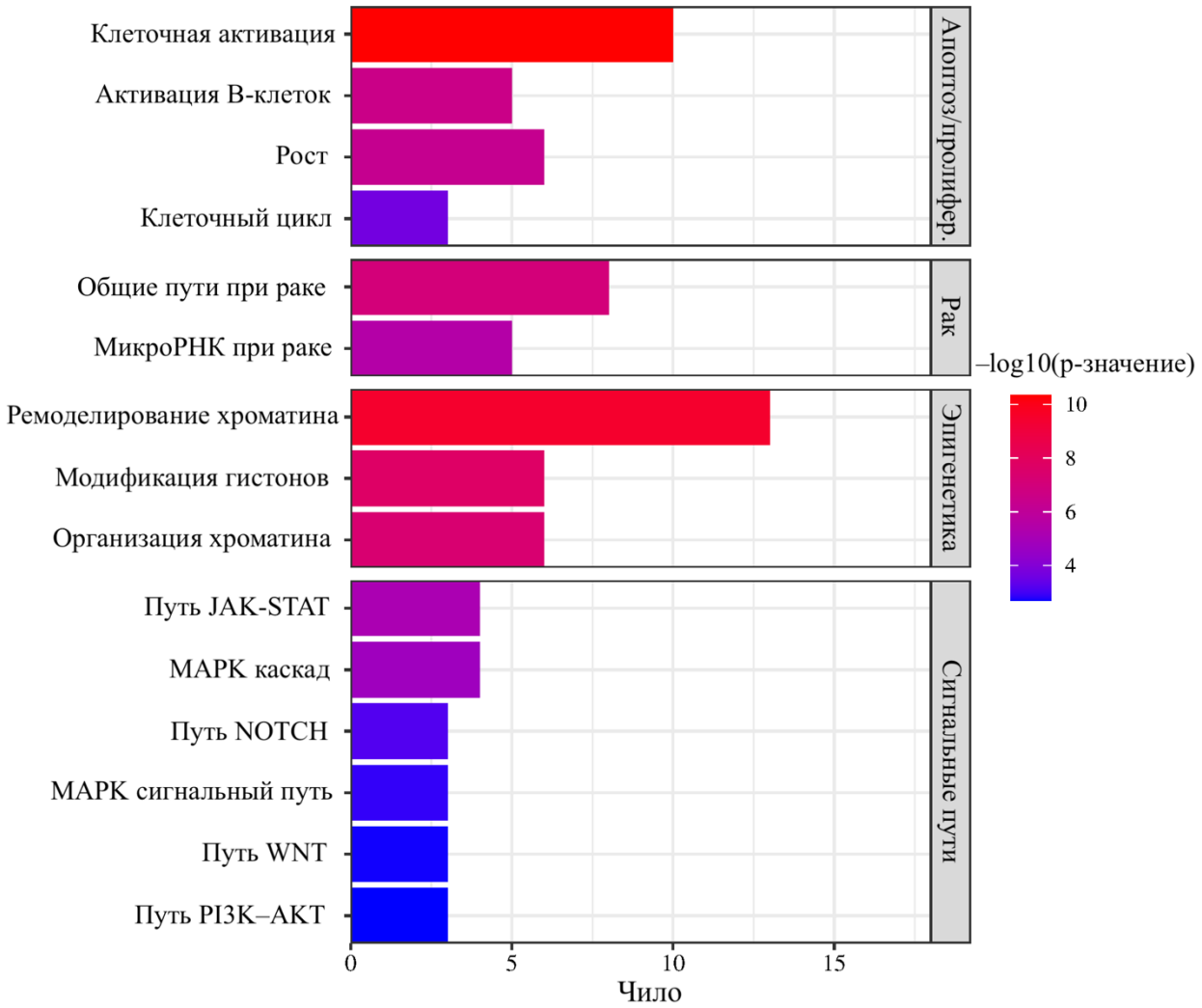


Рисунок 21 – Анализ функционального обогащения набора генов; по оси X – количество мутировавших генов, принадлежащих конкретному клеточному процессу; по оси Y – название клеточных путей, сгруппированных по функциональной принадлежности: апоптоз/пролиферация, общие онкологические процессы, эпигенетика/транскрипция, передача сигнала; $-\log_{10}$(p-значение) – отрицательный логарифм от p-значения с основанием 10

Для визуализации ассоциаций между мутировавшими генами и клеточными путями, мы построили диаграмму Sankey (рисунок 22), на которой размер каждого узла и ширина каждой дуги представляют определенное количество объектов. Например, узел (расположены вертикально и представляют собой разноцветные прямоугольники), состоящий из 5 элементов, будет вдвое меньше, чем узел с 10 элементами. Дуга (серые линии, соединяющие узлы на графике), проходящая через 20 объектов, будет пропорционально шире/толще дуги, проходящей через 10 объектов. В нашем случае размер дуг одинаковый, так как каждый клеточный путь состоит из набора неповторяющихся генов.

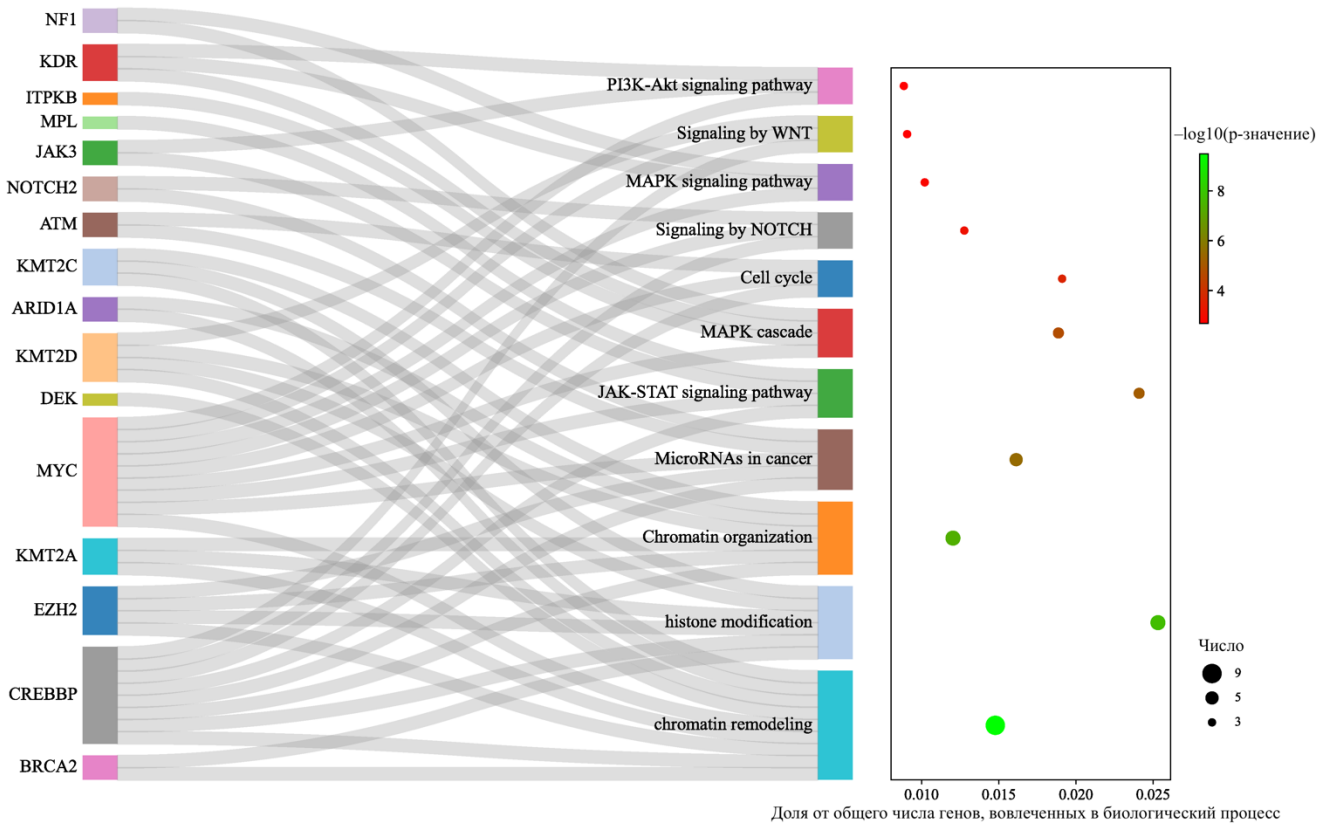


Рисунок 22 – Диаграмма Sankey, демонстрирующая вовлеченность мутировавших генов в основные онкогенные пути. На правом графике размер точки определяется количеством генов в конкретном клеточном пути, цвет точки представляет собой шкалу значений $-\log_{10}$(p-значение)

Наибольший размер узлов левой половины графика имеют гены *MYC*, *CREBBP*, *EZH2*, *KMT2D*. Ген *MYC* представляет собой транскрипционный фактор, являющийся протоонкогеном и регулирующий процессы прогрессирования клеточного цикла, апоптоза и клеточной трансформации. Аберрации гена *MYC* характерны для большинства онкологических новообразований (около 70% всех известных форм рака) [65, 186], 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 *MYC*, *CREBBP*, *EZH2* и *KMT2D* могут приводить к дисрегуляции в нескольких внутриклеточных процессах, опосредуя более сложные молекулярные изменения при ФЛ. Размер узлов, описывающих клеточные пути (прямоугольники правой половины графика), также пропорционален степени вовлеченности в патологический процесс и соответствует ранее представленным результатам (рисунок 21).

Нами также проводился анализ обогащения белок-белковых взаимодействий с использованием следующих баз данных: STRING, BioGrid, OmniPath, InWeb_IM. Начальная сеть содержит подмножество белков, которые образуют физические взаимодействия по крайней мере с одним из членов в списке. Если сеть содержит от 3 до 500 белков, для идентификации связи между компонентами сети применяется алгоритм обнаружения молекулярных комплексов (MCODE) [30]. Итоговая сеть представлена на рисунок 23. Можно заметить, что в функциональном плане продукты генов *MYC*, *CREBBP* и *EZH2* имеют наибольшую степень взаимодействия с другими белками и, тем самым, при изменении их функции (усиление или снижение активности, потеря функции) отмечается наиболее выраженный по своей интенсивности эффект.

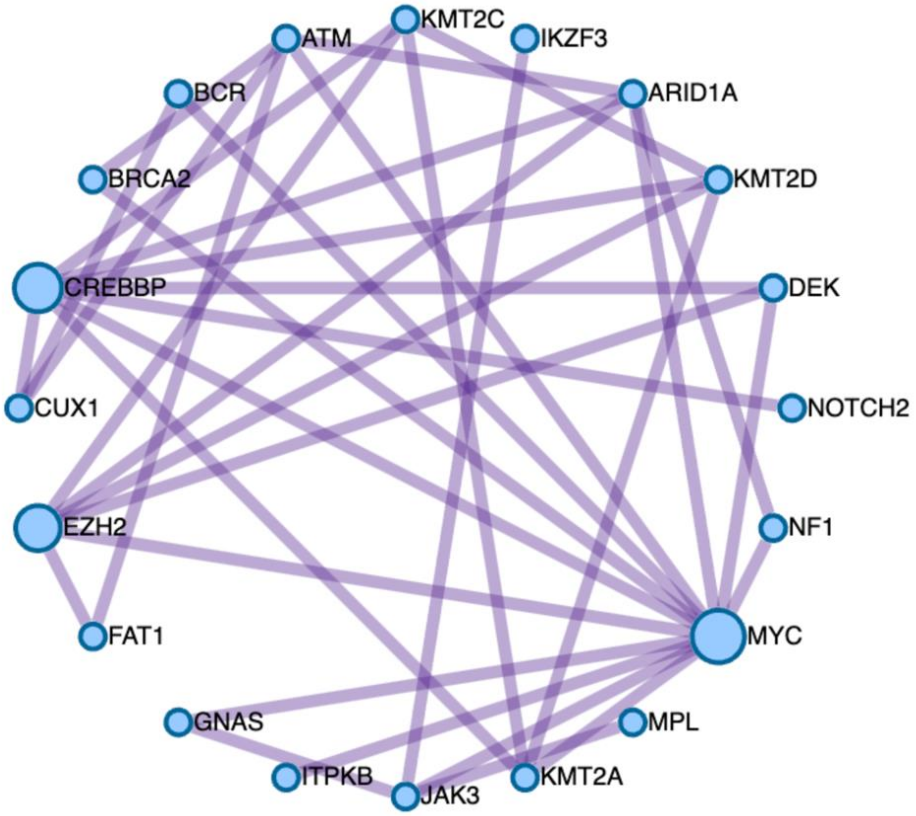


Рисунок 23 – Радиальная сеть белок-белковых взаимодействий

С целью определения связи между генетическими событиями, нами была построена матрица парных корреляций 23 наиболее часто мутировавших генов, которые ранее исследовались в анализе GSEA. К полученной матрице применялся иерархический кластерный анализ для идентификации кластеров ассоциированных генетических изменений. По результатам анализа было выделено 5 основных кластеров генетических мутаций, возникающих совместно, а также показано, мутации каких генов не могут сочетаться друг с другом, рисунок 24.

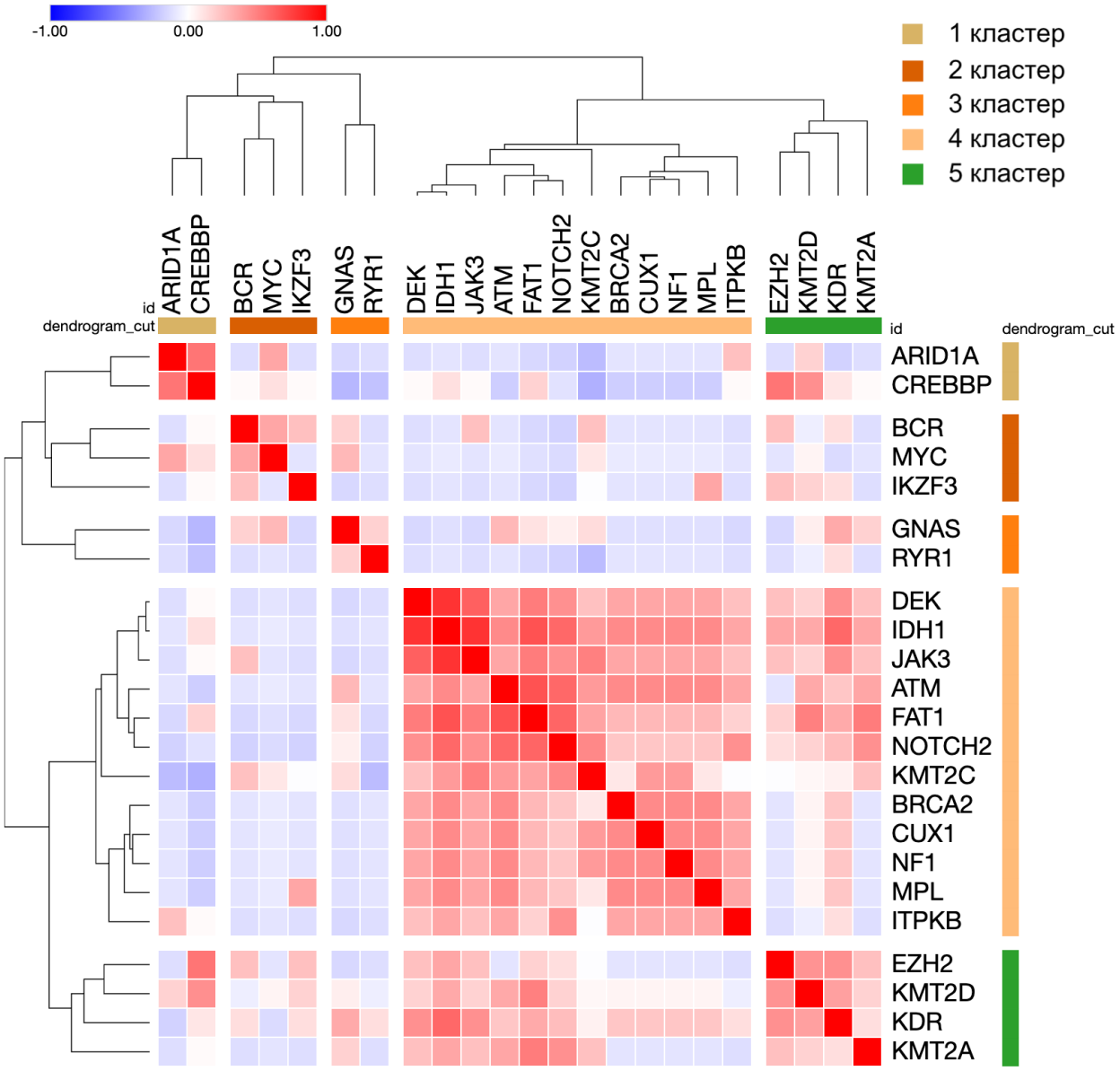


Рисунок 24 – Матрица парных корреляций генетических мутаций с иерархическим кластерным анализом; красный цвет обозначает наличие ассоциированных мутаций, синий – взаимоисключающие мутации

Первый кластер (n = 2) составили гены *ARID1A* и *CREBBP*, относящиеся к группе генов, участвующих в организации хроматина. Ассоциации мутаций в генах второго и третьего кластера не имеют общей функциональной принадлежности и, вероятно, сочетание данных генетических событий носит случайный характер. Третий кластер (n = 12), в соответствии с результатами GSEA, наиболее обогащен мутациями в генах, участвующих в гемопоэзе (n = 6, $-\log_{10}$(p-значение) = 7,01), общих онкологических процессах (n = 4, $-\log_{10}$(p-значение) = 4,38) и ремоделировании хроматина (n = 3, $-\log_{10}$(p-значение) = 2,81). Примечательно, что 75% пятого кластера (n = 4) также составляют гены, участвующие в модификации гистонов: *EZH2*, *KMT2A*, *KMT2D* – метилирование гистонов ($-\log_{10}$(p-значение) = 7,77); и только ген *KDR*, кодирующий сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), участвует в процессах трансдукции сигналов ростовых факторов (совместно с генами *BCR*, *CUX1*, *MYC*), МАРК-каскаде и регуляции клеточной пролиферации. Закономерно, что гены четвертого и пятого кластеров имеет общую функциональную принадлежность, что говорит об относительно высокой степени корреляции между ними.

И наконец, обладая данным о генетических мутациях конкретного больного, с помощью анализа GSEA можно проводить дифференциальную диагностику, сопоставляя мутационный профиль пациента с известным генетическим ландшафтом заболеваний. Обогащение списка генов проводилось с использованием базы данных DisGeNET [184], содержащей более 1 миллиона ассоциаций генов и заболеваний (GDA), таблица 12.

Таблица 12 – Результаты анализа обогащения согласно данным DisGeNET

Код	Заболевание	n	%	$\log_{10}$(p)	$\log_{10}$(q)
C0278876	медуллобластома взрослых	14	61	–17,00	–17,00
C0278510	медуллобластома у детей	14	61	–17,00	–12,00
C0023470	острый миелоидный лейкоз	11	48	–15,00	–11,00
C1961099	Т-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома	12	52	–14,00	–10,00
C0024301	фолликулярная лимфома	11	48	–14,00	–10,00
C0079772	Т-клеточная лимфома	11	48	–14,00	–10,00
C1332201	ДВККЛ у взрослых	11	48	–14,00	–9,90

Примечание: ДВККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома; код – кодирование заболевания согласно унифицированному языку медицинских систем (UMLS); n – количество генов из изучаемого списка, ассоциированных с заболеванием; % – доля генов, связанных с заболеванием, от общего количества генов из изучаемого списка

Так, например, у первого пациента из исследуемой выборки (FL005) были выявлены мутации в генах *BRAF*, *CREBBP*, *DEK*, *EZH2*, *FAT1*, *IDH1*, *JAK3*, *KDR*, *KMT2A*, *KMT2C*, *KMT2D*, *NOTCH2*, всего 12 мутаций. По результатам GSEA, наличие ассоциаций мутаций в указанных генах наиболее характерно для ДВККЛ (n = 9, $-\log_{10}$(p-значение) = 14,00), в то время как для ФЛ такой мутационный профиль менее характерен, но, тем не менее, высоковероятен (n = 7, $-\log_{10}$(p-значение) = 9,80). Следовательно, NGS (предпочтительнее полногеномное, а не таргетное секвенирование) с последующим анализом GSEA может помочь в вопросе дифференциальной диагностики и принятия решения.

Таким образом, нами была оценена распространенность мутаций генов, ассоциированных с патогенезом НХЛ, у пациентов с ФЛ методом NGS, разработан алгоритм оценки TMB и доказана ее прогностическая значимость.

ГЛАВА 5. КЛИНИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА У ПАЦИЕНТОВ С ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ

5.1 Сравнительная характеристика клинических факторов прогноза

С целью оценки влияния различных клинических факторов на выживаемость всей выборки предварительно был проведен факторный анализ для уменьшения количества переменных и выделения наиболее значимых из них, а также с целью взаимоисключающего использования одного из факторов, принадлежащих конкретной совокупности (компоненте). Извлечение факторов проводилось методом главных компонент на основании критерия Кайзера, вращение факторов осуществлялось с помощью метода ВАРИМАКС (VARIMAX), в повернутую матрицу компонент включались факторы, имеющие коэффициент корреляции $\geq 0{,}5$. Первоначальная повернутая матрица компонент показана в таблице 13. Мера адекватности выборки Кайзера-Майера-Олкина составила 0,543, $p < 0{,}001$. Доля объясненной совокупной дисперсии извлеченных 9 компонент, содержащих 21 фактор, равнялась 73,7%, что в целом говорит об адекватности полученной модели.

Таблица 13 – Повернутая матрица компонент, полученная на первом этапе факторного анализа

Факторы	Компонент								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
WBC (КАК)	0,958								
Лф (КАК)	0,948								
$> 5 \times 10^9$/л опух. клеток	0,796								
Индекс Charlson		0,925							
Возраст		0,836							
Стадия (Ann Arbor)			0,896						
Пораж. КМ			0,870						
Пол				0,703					
Hb (КАК)				0,696					
PLT (КАК)				–0,63					
СОЭ (КАК)									
SPD					0,881				
Bulky					0,838				
Экстранод. поражение						0,718			
β2-МГ						0,713			
Grade							0,826		
Bcl-6 (ИГХ)							0,675		

Продолжение таблицы 13

Факторы	Компонент								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
СИ								0,790	
В-симптомы								0,597	
Bcl-2									–0,711
ЛДГ, Ед/л									0,625

Примечание: ИМТ – индекс массы тела, КАК – клинический анализ крови, КМ – костный мозг, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, СИ – селезеночный индекс, СОЭ – скорость оседания эритроцитов, Bulky – образование размерами 7 см и более, Grade – цитологический тип, SPD – сумма произведений перпендикулярных диаметров, β2-МГ – бета-2-микроглобулин

Далее последовательно исключались незначимые или неподдающиеся логической интерпретации факторы. В конечном счете была получена 7-и компонентная модель, содержащая 14 наиболее значимых факторов, таблица 14. Мера адекватности выборки составила 0,505, $p < 0,001$. Доля объясненной совокупной дисперсии извлеченных 7 компонент равнялась 77,1%. Таким образом, при применении множественного регрессионного анализа, факторы, принадлежащие одной компоненте, могут использоваться, как взаимоисключающие.

Таблица 14 – Повернутая матрица компонент, полученная на заключительном этапе факторного анализа

Факторы	Компонент						
	1	2	3	4	5	6	7
Индекс Charlson	0,926						
Возраст	0,890						
$> 5 \times 10^9$/л опух. клет.		0,895					
WBC (КАК)		0,862					
Стадия (Ann Arbor)			0,925				
Поражение КМ			0,893				
SPD				0,896			
Bulky disease				0,852			
Grade					0,835		
Bcl-6 (ИГХ)					0,668		
Bcl-2 (ИГХ)						0,770	
β2-МГ						0,599	
Пол							0,849
PLT (КАК)							–0,669

Примечание: ИГХ – иммуногистохимическое исследование, КАК – клинический анализ крови, КМ – костный мозг, Bulky – образование размерами 7 см и более, Grade – цитологический тип, SPD – сумма произведений перпендикулярных диаметров, β2-МГ – бета-2-микроглобулин

Учитывая индолентный характер течения ФЛ, в отношении анализа ОВ оценивали влияние факторов на пятилетнем интервале наблюдения, в отношении ВБП, ВБР и БСВ проводилась оценка факторов на двухлетнем временном промежутке. В однофакторном регрессионном анализе на пятилетнюю ОВ оказывали значимое влияние лейкемический состав крови, цитологический тип, наличие экстранодального поражения, количество лейкоцитов и тромбоцитов, уровень гемоглобина, экспрессия CD38 и CD79b по данным ИФТ, индекс коморбидности Charlson, а также прогностические системы FLIPI, FLIPI-2, FLIPI-L, FCG, FLEX. Значимость клинических факторов без учета прогностических индексов показана на рисунке 25.

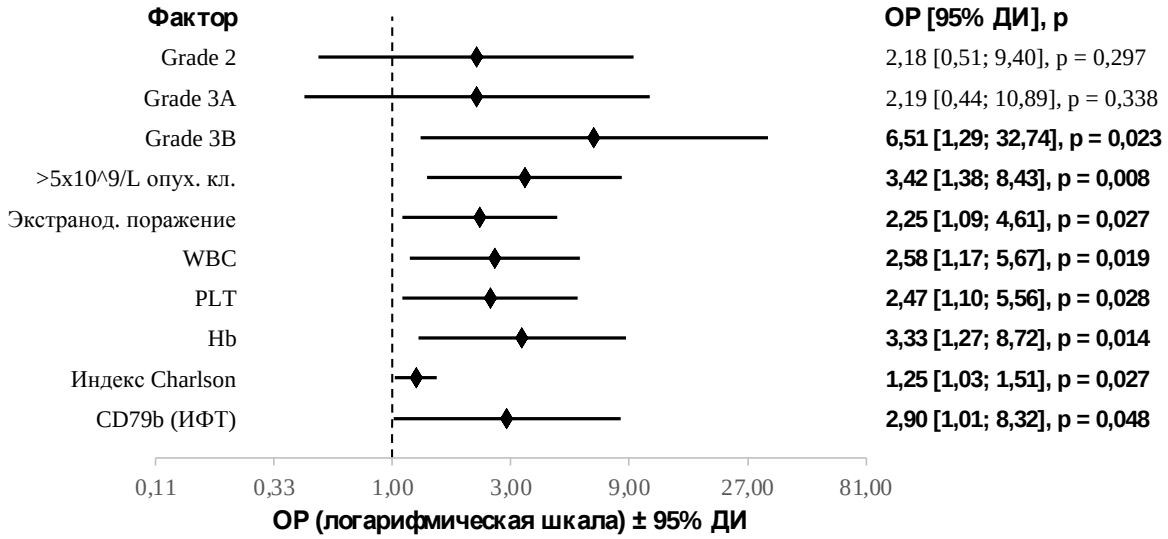


Рисунок 25 – Влияние клинических факторов на пятилетнюю ОВ в однофакторном регрессионном анализе (высокий риск > 1,0; низкий риск < 1,0)

Анализ пятилетней выживаемости в соответствии с прогностическими системами PRIMA-PI и RSM, включающих два и три фактора риска соответственно, не показал значимых различий ($p > 0,05$). 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, рисунок 26.

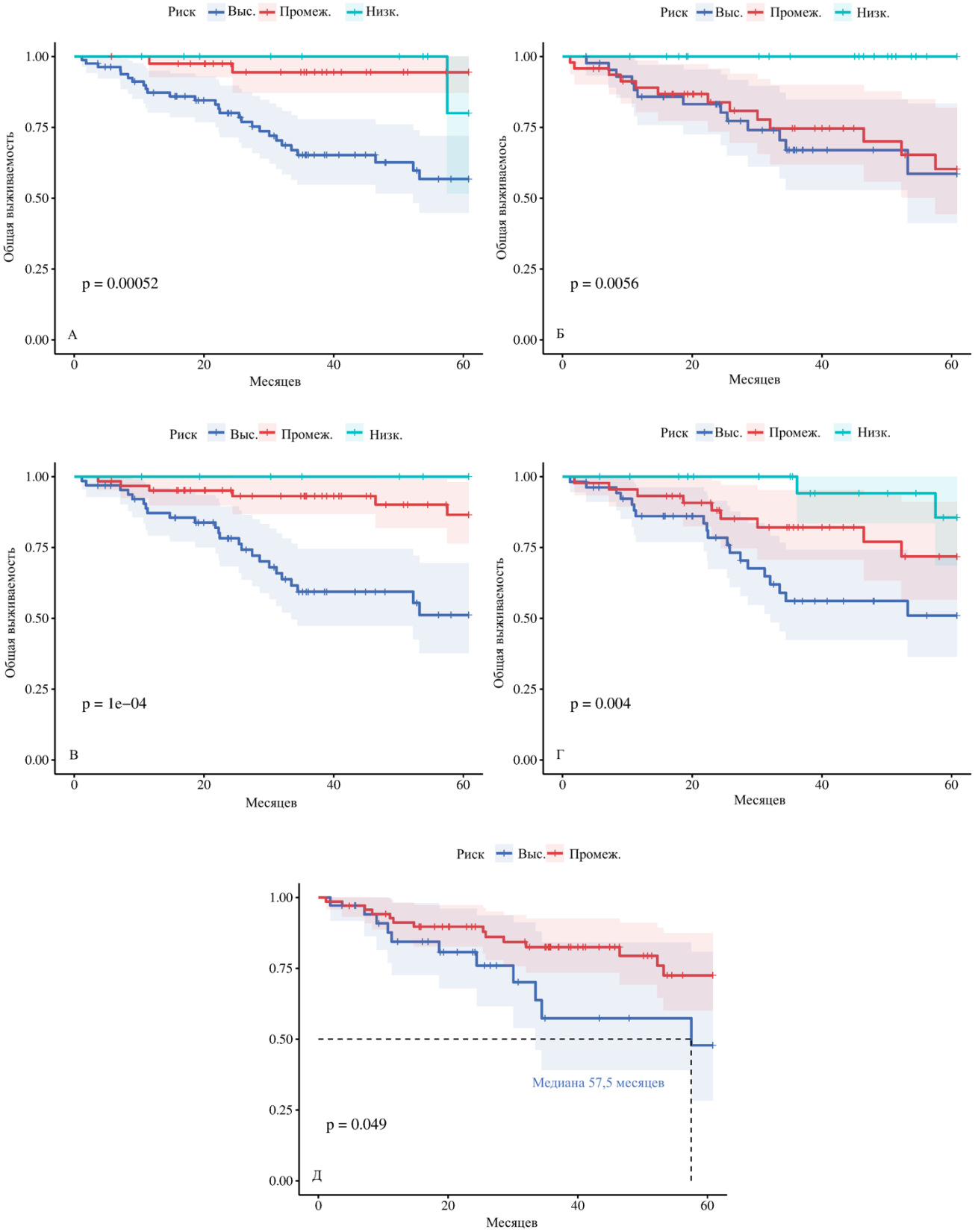


Рисунок 26 – Пятилетняя ОВ пациентов с ФЛ в зависимости от группы риска индексов FLIPI (А), FLIPI-2 (Б), FLIPI-L (В), FCG (Г), FLEX (Д)

В многофакторном регрессионном анализе Кокса (характеристики модели: $\chi^2 = 26{,}123$, $p = 0{,}001$) значимое влияние на пятилетнюю ОВ оказывали лейкемический состав крови (> 5×10^9/л опухолевых клеток) и индекс коморбидности Charlson, рисунок 27.

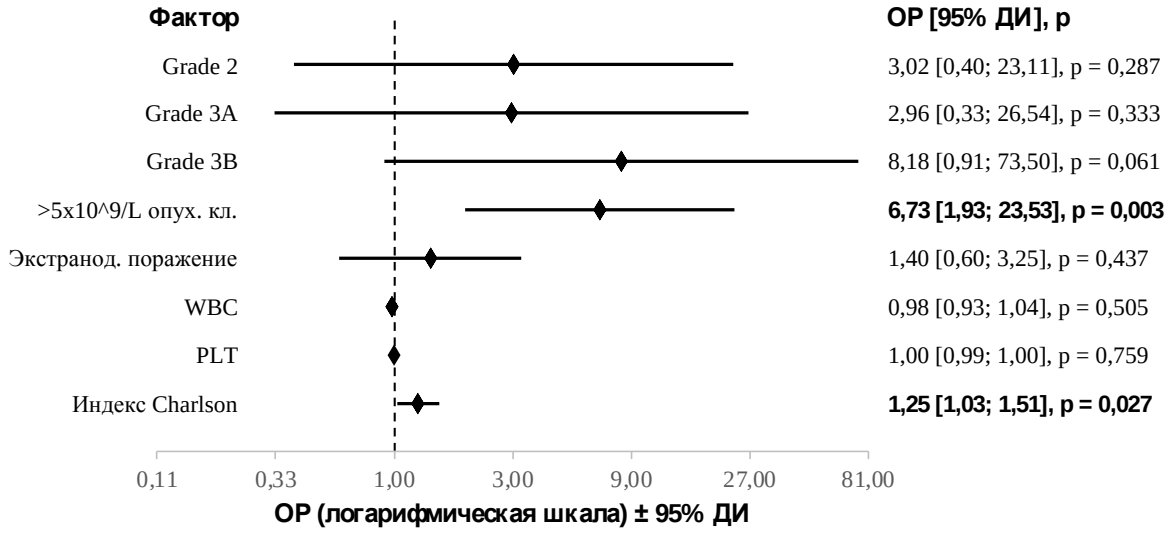


Рисунок 27 – Влияние клинических факторов на пятилетнюю ОВ в многофакторном регрессионном анализе (высокий риск > 1,0; низкий риск < 1,0)

Среди параметров, достоверно оказывающих влияние на двухлетнюю ВБП по данным однофакторного регрессионного анализа, были: лейкемический состав крови, наличие экстранодального поражения, экспрессия CD38 (ИФТ) и CD79b (ИФТ), рисунок 28.

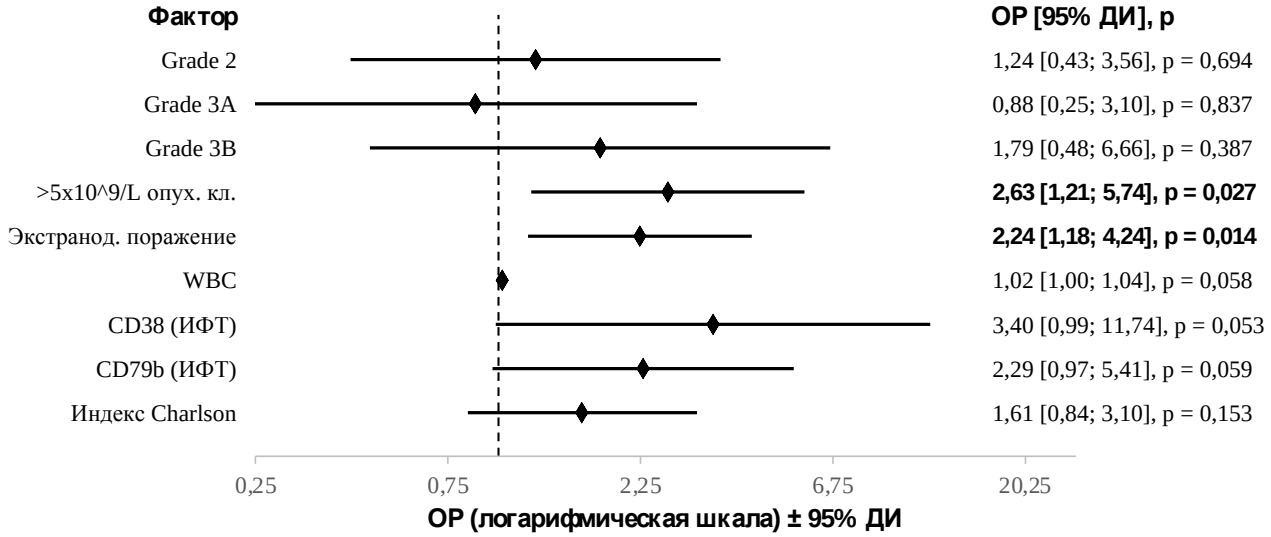


Рисунок 28 – Влияние клинических факторов на двухлетнюю ВБП в однофакторном регрессионном анализе (высокий риск > 1,0; низкий риск < 1,0)

В отношении двухлетней ВБП статистическую достоверность продемонстрировали прогностические системы, стратифицирующие пациентов на три группы риска – FLIPI-2 (p = 0,0099) и FCG (p = 0,029) и на две группы – FLEX (p = 0,029), рисунок 29. Обращают на себя внимание худшие показатели двухлетней ВБП в группах промежуточного риска индексов FLIPI-2 и FCG по сравнению с группой высокого риска. Однако различия между группами промежуточного и высокого риска для индекса FLIPI-2 и FCG недостоверны, p = 0,332 и p = 0,983 соответственно.

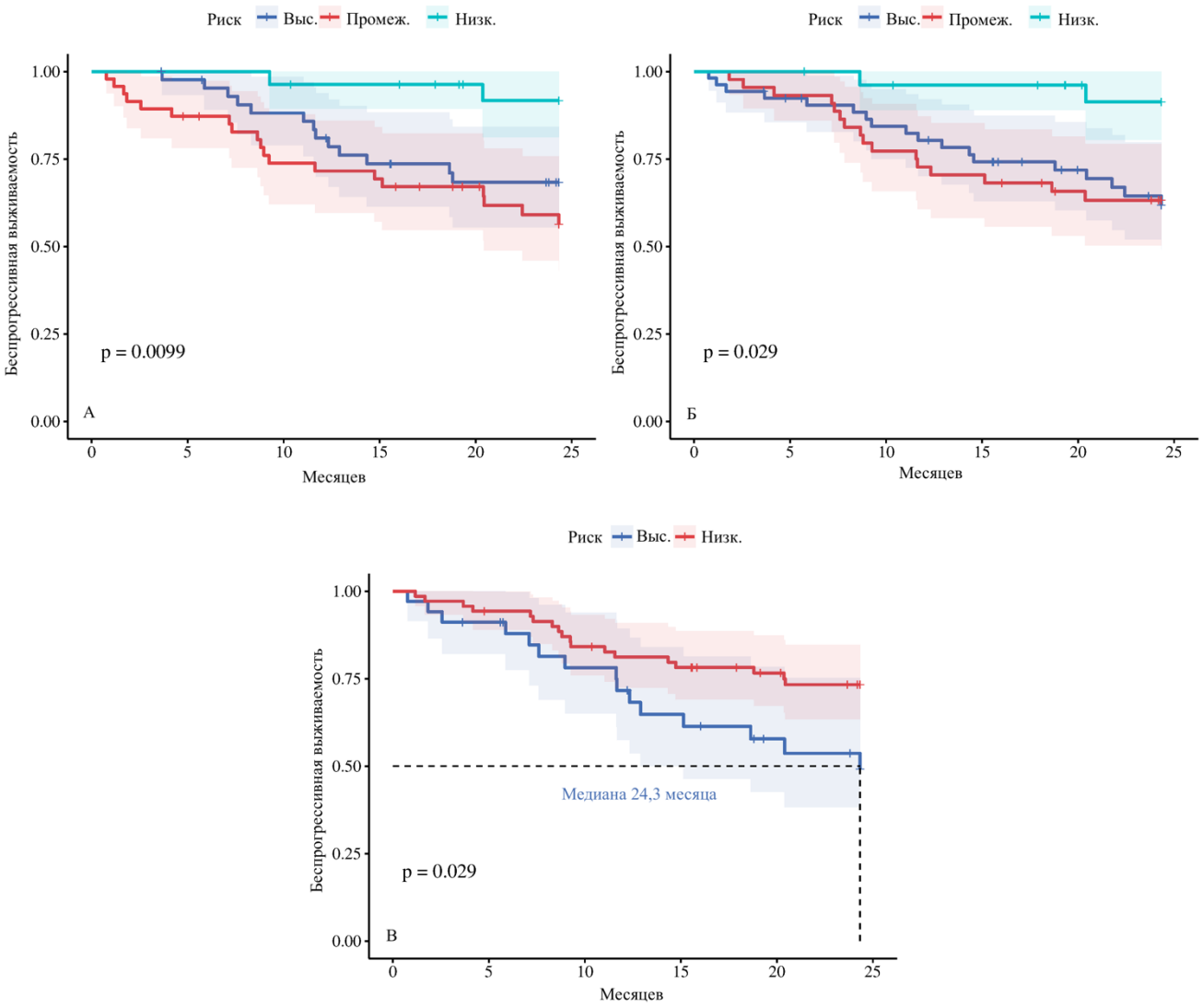


Рисунок 29 – Двухлетняя ВБП в зависимости от группы риска FLIPI-2 (А), FCG (Б) и FLEX (В)

В многофакторном регрессионном анализе Кокса (характеристики модели: χ^2 = 13,376, p = 0,001) наличие экстранодальных поражений и лейкемический состав крови оказывали достоверно значимое влияние на двухлетнюю ВБП, ОР составил 2,34 (95% ДИ: 1,23–4,44), p = 0,009 и 2,81 (95% ДИ: 1,28–6,14), p = 0,01 соответственно.

Частота ПО в общей когорте больных составила 62,3% (94/144), следовательно в анализ ВБР было включено 94 пациента. По причине небольшого объема выборки добавление

в многофакторный регрессионный анализ Кокса параметров, ранее использовавшихся при описании ОВ и ВБП, представляется нецелесообразным, так как несмотря на получение адекватных характеристик модели, показатели ОР для некоторых факторов существенно превышают 100 (в частности, для факторов лейкемический состав крови и цитологический тип), что затрудняет их интерпретацию. Исследование параметров в однофакторном анализе представлено на рисунке 30. Ни один из показателей не оказывает значимого влияния на двухлетнюю ВБР.

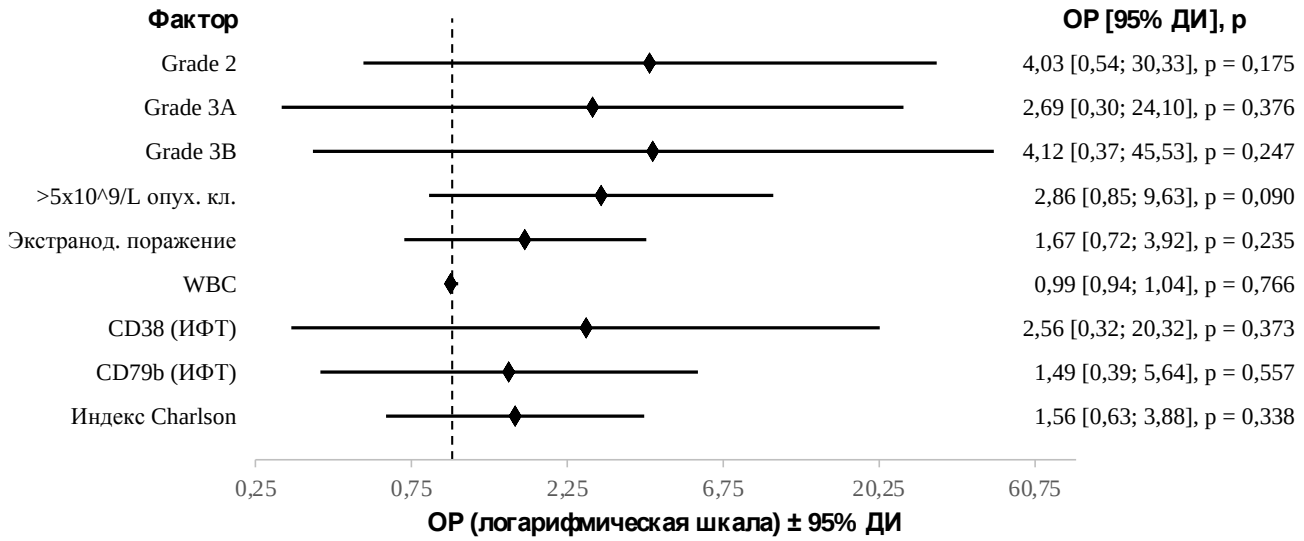


Рисунок 30 – Влияние клинических факторов на двухлетнюю ВБР в однофакторном регрессионном анализе (высокий риск > 1,0; низкий риск < 1,0)

На двухлетнюю бессобытийную выживаемость статистически достоверно влияют лейкемический состав крови, а также распределение пациентов по прогностическим группам FLIPI-2 (p = 0,0095) и FCG (p = 0,021), рисунок 31. По данным однофакторного анализа лейкемический состав крови значимо повышает риск наступления неблагоприятного события (ПЗ, рецидив, трансформация), ОР составил 2,2 (95% ДИ: 1,03–4,71), p = 0,043.

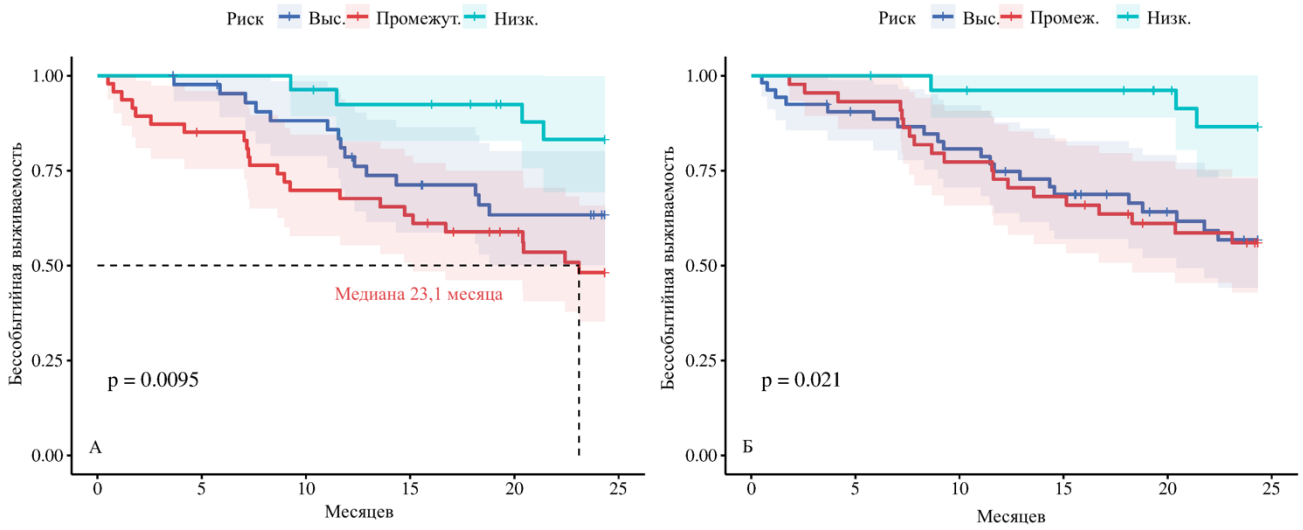
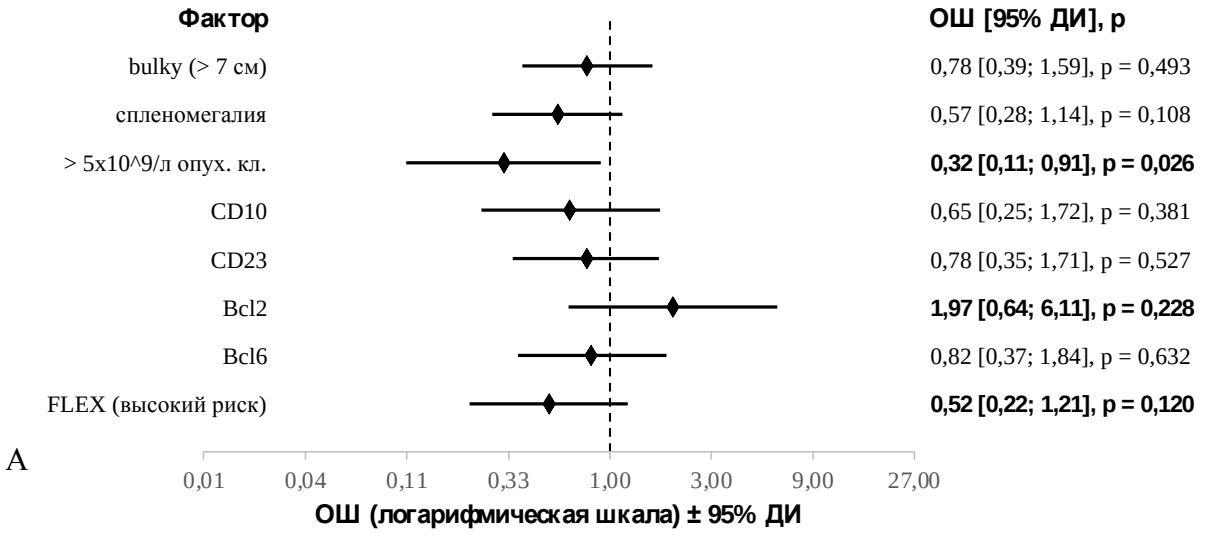


Рисунок 31 – Двухлетняя БСВ в зависимости от группы риска FLIPI-2 (А) и FCG (Б)

В многофакторном регрессионном анализе Кокса (характеристики модели: $\chi^2 = 8{,}339$, $p = 0{,}04$) в отношении прогнозировании двухлетней БСВ лейкемический состав крови был единственным достоверно значимым прогностическим фактором, ОР составил 2,64 (95% ДИ: 1,2–5,81), $p = 0{,}016$. Другие параметры, включенные в модель, также имели негативное влияние на двухлетнюю БСВ. ОР для экстранодального поражения составил 1,66 (95% ДИ: 0,86–3,20), $p = 0{,}134$, ОР для индекса коморбидности Charlson равнялся 1,30 (95% ДИ: 0,694–2,43), $p = 0{,}414$. Иные, ранее исследуемые факторы, были исключены из модели по причине неадекватности последней. Таким образом, в отношении всех показателей выживаемости только прогностические модели FLIPI-2 и FCG обладают статистически значимой предсказательной способностью.

Отдельно рассмотрим ассоциацию изучаемых факторов с вероятностью наступления неблагоприятных исходов (ПЗ, рецидив), а также с вероятностью достижения объективного ответа после завершения индукционного этапа терапии первой линии. Из всех рассчитанных индексов, только FLEX и FLIPI-L значимо были связаны с неблагоприятными исходами. Так, у пациентов высокого риска FLEX и FLIPI-L отмечалось снижение ЧОО, ОШ составило 0,30 (95% ДИ: 0,10–0,97, $p = 0{,}036$) и 0,30 (95% ДИ: 0,09–1,00, $p = 0{,}038$) соответственно. Влияние ассоциированных с лимфомой факторов на частоту ПО и ЧОО (высокий риск < 1,0; низкий риск > 1,0) в логарифмической шкале представлено на рисунке 32.



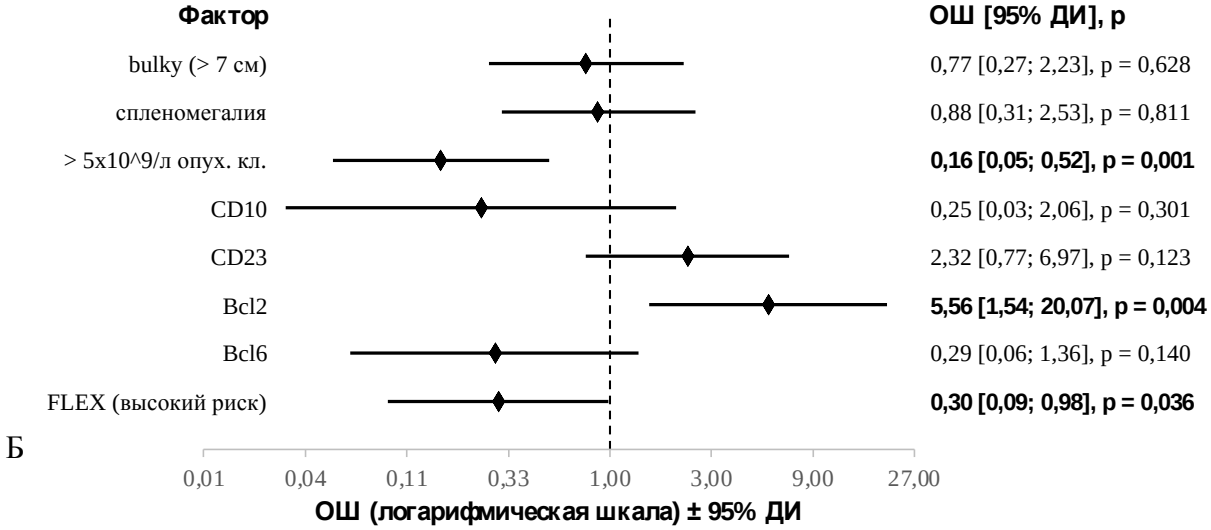


Рисунок 32 – Связь клинических факторов с достижением ПО (А) и с ЧОО (Б) (высокий риск < 1,0; низкий риск > 1,0)

Действие лимфома ассоциированных факторов на вероятность прогрессирования ФЛ (высокий риск > 1,0; низкий риск < 1,0) в логарифмической шкале представлено на рисунке 33.

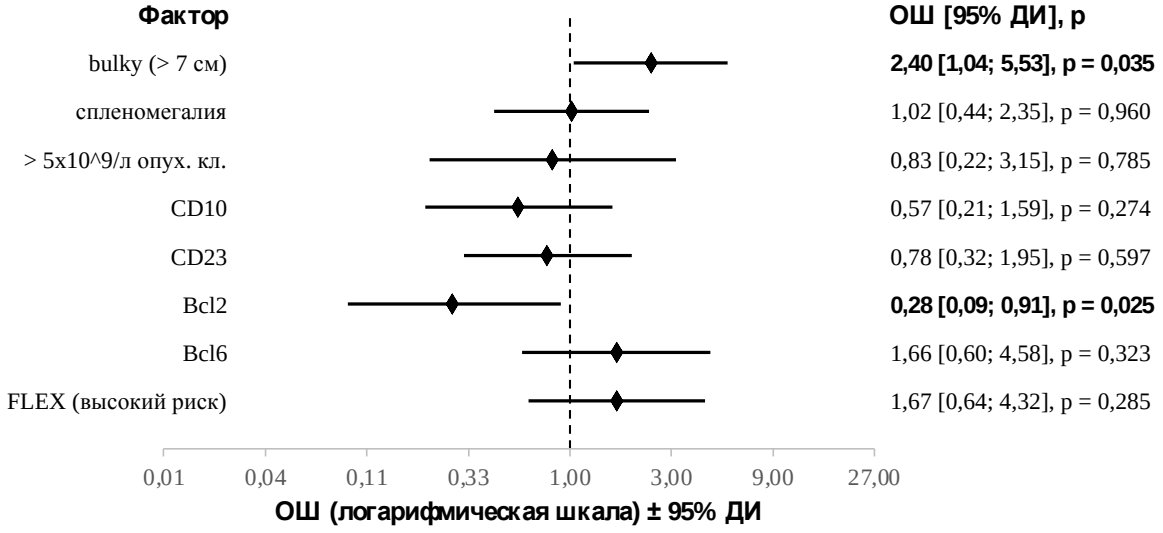


Рисунок 33 – Связь клинических факторов с ПЗ (высокий риск > 1,0; низкий риск < 1,0)

Ко всему прочему следует рассмотреть параметры, которые не учитывались в факторном анализе, а также показатели, прогностическая роль которых была изучена в предыдущих исследованиях. Курение ассоциировано с повышенной вероятностью наступления рецидива, ПЗ или трансформации, ОШ 2,37 (95% ДИ: 1,10–5,12, $\chi^2 = 5{,}013$, p = 0,025). У пациентов с избыточной массой тела и ожирением (ИМТ ≥ 25 кг/м^2) отмечалась более высокая частота прогрессирования, ОШ 4,48 (95% ДИ: 1,45–13,84, $\chi^2 = 7{,}875$, p = 0,005) и более низкая частота рецидивов ФЛ, ОШ 0,41 (95% ДИ: 0,17–1,00, $\chi^2 = 4{,}07$, p = 0,044), что, с другой стороны, может быть обусловлено возрастом пациентов, так как, теоретически, с увеличением возраста, растет доля пациентов с избыточной массой тела. Для проверки данного предположения был проведен логлинейный анализ с построением насыщенной модели (включающей 4 переменных: возраст, ИМТ, ПЗ и рецидив) с последующим пошаговым исключением факторов. Показано, что взаимодействие четырех факторов не оказывает существенного влияния на модель ($\chi^2 = 0{,}001$, p = 0,971), в то время как взаимодействие двух факторов является статистически значимым ($\chi^2 = 22{,}358$, p = 0,022). Критерий χ^2 полученной модели составил 3,419, p = 0,905 (отсутствуют различия между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами, вычисленными с помощью модели). К значимым взаимодействиям относятся параметры: ИМТ и рецидив ($\chi^2 = 3{,}924$, p = 0,048, коэффициент регрессионного уравнения λ составил –0,317), ИМТ и ПЗ ($\chi^2 = 8{,}828$, p = 0,003, $\lambda = 0{,}218$), возраст и рецидив ($\chi^2 = 6{,}186$, p = 0,013, $\lambda = -0{,}29$). Таким образом, показано, что отсутствует зависимость между возрастом и ИМТ в исследуемой группе пациентов.

Опухолевое образование 7 см и более связано с повышенной вероятностью ПЗ, ОШ составило 2,40 (95% ДИ: 1,04–5,53, $\chi^2 = 4{,}343$, p = 0,035). Наличие спленомегалии в дебюте ФЛ было расценено, как неблагоприятный прогностический фактор. Показано, что у пациентов

со спленомегалией отмечалась более низкая частота ПО, ОШ 0,46 (95% ДИ: 0,22–0,94, χ^2 = 4,693, p = 0,03). Лейкемический состав крови также ассоциирован с низкой частотой ПО, ОШ 0,32 (95% ДИ: 0,11–0,91, χ^2 = 4,94, p = 0,026) и ЧОО, ОШ 0,16 (95% ДИ: 0,05–0,52, χ^2 = 11,414, p = 0,001).

Объем опухолевой массы в дебюте заболевания не имеет прогностического значения по данным однофакторного регрессионного анализа Кокса в отношении как ОВ (ОР = 1,0, p = 0,94), так и ВБП и БСВ (ОР = 1,0, p = 0,056 и ОР = 1,0, p = 0,024 соответственно). С другой стороны, процент редукции опухолевой массы (доля от начального значения) после окончания индукционного этапа терапии первой линии является значимым прогностическим фактором у пациентов с ФЛ. Пятилетняя ОВ у больных со степенью редукции SPD ≥ 50% составила 70,7% (95% ДИ: 60,2–80,0, медиана не достигнута), а у пациентов с незначительной редукцией SPD (< 50%) равнялась 45,8% (95% ДИ: 17,7–71,1, медиана 46,5 месяцев), p = 0,017, рисунок 34. Объем опухолевой массы не различался в зависимости от стадии по Ann Arbor (p > 0,2) и цитологического типа (p > 0,4).

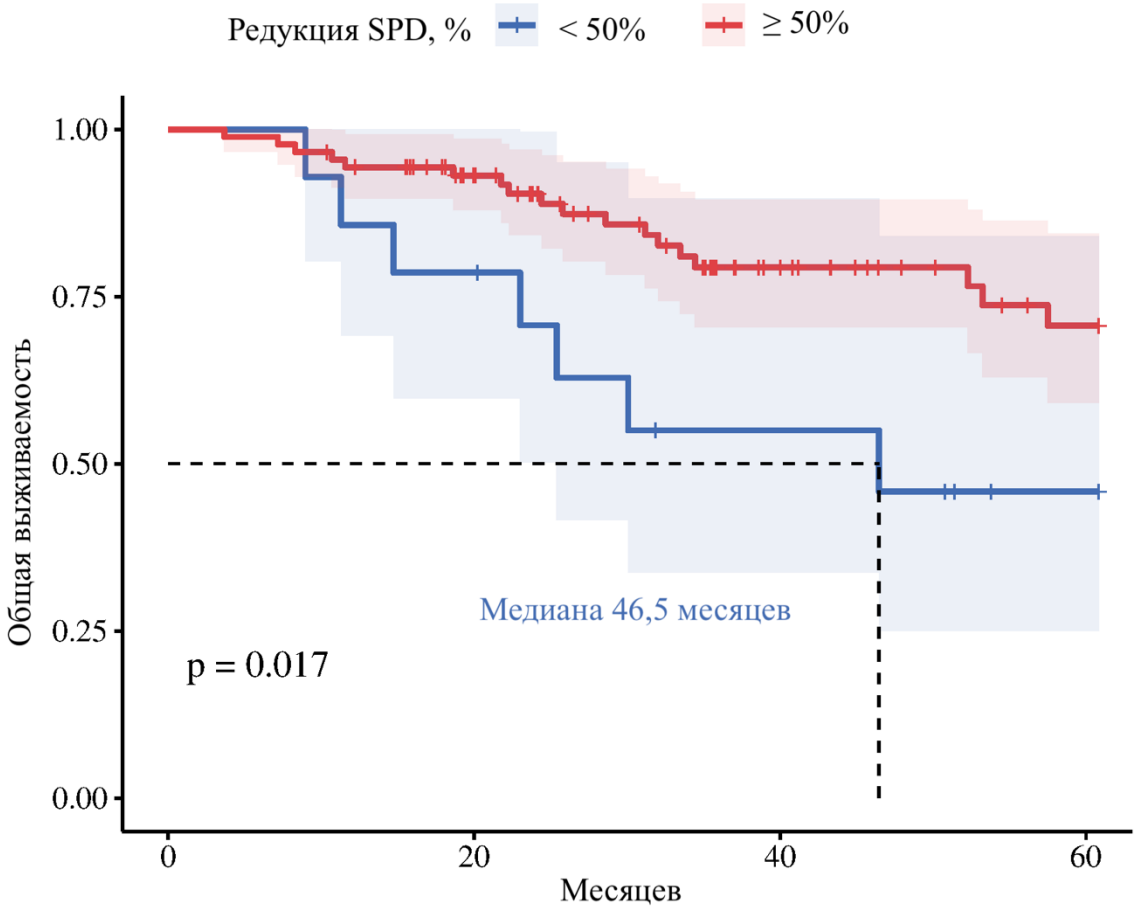


Рисунок 34 – Пятилетняя ОВ в зависимости степени редукции опухолевой массы по значению SPD: ответ – ≥ 50%; нет ответа – < 50%

По данным ИГХ-исследования экспрессия CD10, CD23 и Bcl-2 была ассоциирована с благоприятным прогнозом. Так, у пациентов с экспрессией CD10 отмечалась более низкая частота рецидивов, ОШ 0,29 (95% ДИ: 0,11–0,80, χ^2 = 6,312, p = 0,012) и всех неблагоприятных исходов (ПЗ, рецидив, трансформация), ОШ 0,19 (95% ДИ: 0,08–0,51, χ^2 = 12,815, p < 0,001). Экспрессия CD23 связана с высокой частотой ЧО, ОШ 2,51 (95% ДИ: 1,14–5,52, χ^2 = 5,44, p = 0,02). Пациенты с экспрессией Bcl-2 характеризовались значимо более высокой ЧОО, ОШ 5,56 (95% ДИ: 1,53–20,07, χ^2 = 8,278, p = 0,004) и более низкой частотой ПЗ, ОШ 0,28 (95% ДИ: 0,09–0,91, χ^2 = 5,05, p = 0,025). Однако в анализе пятилетней ВБП данные различия не были статистически значимыми, пятилетняя ВБП в группе с экспрессией Bcl-2 составила 60,3% (95% ДИ: 50,2–69,2, медиана не достигнута), в группе без экспрессии – 45,7% (95% ДИ: 17,7–71,1, медиана 45,0 месяцев), p = 0,183. Наоборот, пациенты с экспрессией Bcl-6 реже достигали ЧО, ОШ 0,14 (95% ДИ: 0,07–0,30, χ^2 = 8,627, p = 0,003) и характеризовались меньшей ЧОО, ОШ 0,29 (95% ДИ: 0,06–1,36, χ^2 = 2,797, p = 0,094), однако различия недостоверны. Медиана индекса пролиферативной активности Ki-67 составила 25% (10 и 90 процентили: 10; 80, n = 76). В зависимости от цитологического типа значение Ki-67 значимо различалось между группами. Так у пациентов с 3B цитологическим типом медиана Ki-67 равнялась 90% (95% ДИ: 62–93), что достоверно больше, чем у пациентов с 3A – 48% (95% ДИ: 31–55), p = 0,0019, 2 типом – 20% (95% ДИ: 20–31), p < 0,0001 и первым – 18% (95% ДИ: 4–43), p = 0,0027, рисунок 35.

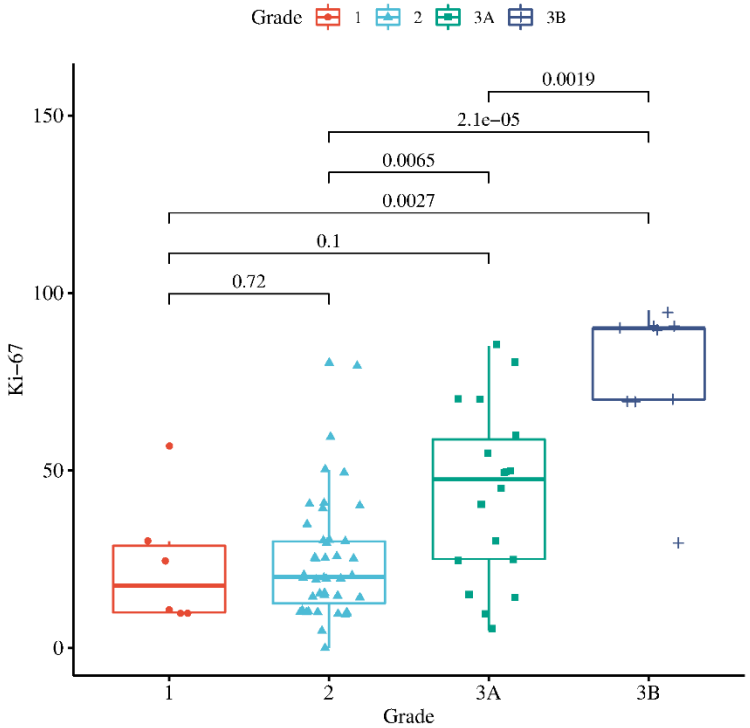


Рисунок 35 – Значение Ki-67 в зависимости от цитологического типа (Grade) с указанием степени достоверности различий между группами

В клиническом анализе крови лейкоцитоз ассоциирован с низкой частотой ПО, ОШ 0,28 (95% ДИ: 0,12–0,66, χ^2 = 9,012, p = 0,003) и низкой ЧОО, ОШ 0,18 (95% ДИ: 0,06–0,54, χ^2 = 10,905, p = 0,001). Лимфоцитоз также оказывал негативный эффект в отношении частоты ПО, ОШ 0,28 (95% ДИ: 0,11–0,73, χ^2 = 7,414, p = 0,06) и ЧОО, ОШ 0,18 (95% ДИ: 0,06–0,60, χ^2 = 9,636, p = 0,002). У пациентов с повышенным уровнем ЛДГ наблюдалась более низкая ЧОО, ОШ равнялось 0,34 (95% ДИ: 0,11–1,04, χ^2 = 3,915, p = 0,048).

По результатам обследования среднее значение β2-МГ, равное 5,54 мг/л, и медиана – 5,18 мг/л (10 и 90 процентили: 2,03; 9,35) значительно превышали верхний показатель (2,64 мг/л) референтного интервала (только у 18 (15,3%) пациентов значение β2-МГ было ниже верхней границы референтного интервала). Учитывая данный аспект, мы провели ROC-анализ с целью определения прогностически значимого уровня β2-МГ у пациентов с ФЛ в отношении ОВ и ВБП. При значении β2-МГ, равном 4,59 мг/л, отмечалась наибольшая чувствительность и специфичность полученных моделей, рисунок 36. По результатам ROC-анализа в отношении пятилетних ОВ и ВБП чувствительность модели составила 69,2% и 67,4%, специфичность – 51,1% и 52,0% соответственно. Площадь под кривой 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.

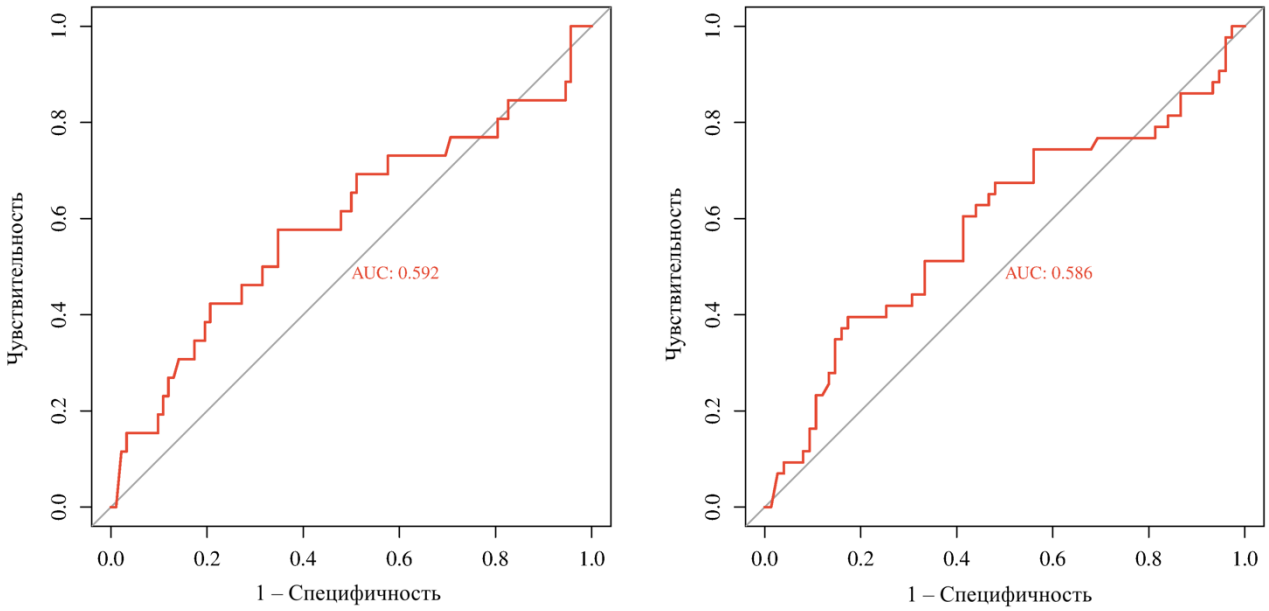


Рисунок 36 – ROC-анализ в отношении пятилетних ОВ (А) и ВБП (Б) для определения порогового значения β2-МГ

В соответствии с полученным значением β2-МГ все пациенты (n = 118) были разделены на 2 группы: пациенты с низким (< 4,59 мг/л) уровнем β2-МГ – 53 (44,9%) больных (контрольная

группа) и пациенты с высоким (≥ 4,59 мг/л) значением β2-МГ – 65 (55,1%) человек. У больных с высоким уровнем β2-МГ чаще отмечались экстранодальные поражения – 40,0% против 11,3% (p = 0,001), имелась тенденция к более высокой частоте лимфоцитоза в дебюте заболевания – 20,0% против 7,5% (p = 0,068). Пациенты с высоким уровнем β2-МГ чаще стратифицировались в группу высокого риска в соответствии с прогностическими индексами по сравнению с больными из контрольной группы: FLIPI-2 (53,8% пациентов из группы высокого риска против 15,1%, p < 0,001), PRIMA-PI (56,9% против 18,9%, p < 0,001), RSM (16,4% против 4,0%, p = 0,036), FLEX (41,1% против 22,9%, p = 0,049). Стратификация пациентов по другим прогностическим системам, в том числе FLIPI (p = 0,412), не имела статистически значимых различий. Также обе группы не различались по частоте встречаемости генетических изменений и экспрессии молекул по данным ИФТ (p > 0,05). Не было выявлено различий между группами и по частоте ПО, ЧО, ЧОО, а также количеству рецидивов и ПЗ (p > 0,05).

Пятилетняя ОВ в группе с высоким значением β2-МГ составила 63,8% (95% ДИ: 50,2–74,7, медиана не достигнута), в контрольной группе – 76,5% (95% ДИ: 63,8–87,7, медиана не достигнута), p = 0,066. В анализе пятилетней ВБП в группе с высоким уровнем β2-МГ выживаемость была достоверно ниже, чем в контрольной группе и составила 46,2% (95% ДИ: 33,7–59,0, медиана 54,1 месяца) против 68,1% (95% ДИ: 53,7–80,1, медиана не достигнута) в контрольной группе, p = 0,043, рисунок 37.

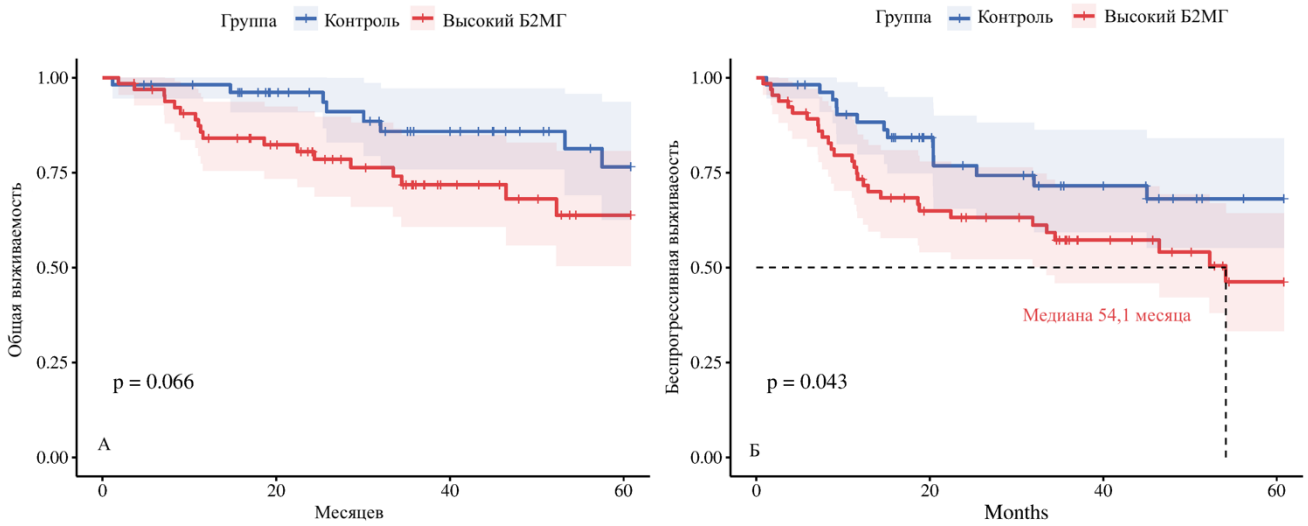


Рисунок 37 – Пятилетние ОВ (А) и ВБП (Б) у пациентов с ФЛ в зависимости от уровня β2-МГ (группа с высоким уровнем – ≥ 4,59 мг/л и контрольная группа – < 4,59 мг/л)

По данным однофакторного регрессионного анализа (характеристики модели: χ^2 = 4,113, p = 0,043) ОР для высокого уровня β2-МГ (≥ 4,59 мг/л) в отношении пятилетней ВБП составил 1,914 (95% ДИ: 1,011–3,624), p = 0,046.

Учитывая неудовлетворительные параметры стратификации пациентов из обследуемой выборки на группы риска с использованием различных прогностических шкал, в том числе FLIPI-2, а также ранее определенное пороговое значение β2-МГ (4,59 мг/л), нами была предпринята попытка модификации данной прогностической системы. В базовой версии модели при превышении β2-МГ верхней границы референтного интервала суммируется 1 балл, однако мы показали, что у 84,7% пациентов уровень β2-МГ значительно превосходит верхнюю границу и целесообразнее использовать значение 4,59 мг/л для стратификации пациентов по данному показателю с целью прогнозирования ОВ и ВБП. Согласно полученным данным, мы предлагаем более дифференцированную оценку для β2-МГ в зависимости 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, ≥ 4,59 мг/л – 1 балл. Использование шага суммирования 0,5 вместо 1 основано на двух аспектах. Во-первых, в базовом индексе FLIPI-2 [78] для каждого из 5 факторов ОР лежал в диапазоне от 1,38 до 2,04, то есть вклад каждого фактора в модель был соизмеримым. Использование двухбалльной системы оценки для фактора β2-МГ (суммирование 2 баллов при превышении уровня β2-МГ ≥ 4,59 мг/л вместо 1 балла) искусственно повышает вклад данного параметра в общий исход. Во-вторых, проведенный нами ROC-анализ в отношении пятилетней ОВ и пятилетней ВБП показал, что при кодировании β2-МГ значениями 0, 0,5 и 1 в индексе FLIPI-2 AUC составила 0,696 (95% ДИ: 0,599–0,793), $p < 0,001$ и 0,652 (95% ДИ: 0,554–0,749), $p = 0,002$ соответственно, а при кодировании значениями 0, 1 и 2 AUC равнялась 0,673 (95% ДИ: 0,568–0,777), $p = 0,001$ и 0,632 (95% ДИ: 0,532–0,733), $p = 0,01$ соответственно. Для сравнения, площадь под графиком в отношении пятилетних ОВ и ВБП для базового FLIPI-2 составила 0,665 (95% ДИ: 0,561–0,770), $p = 0,002$ и 0,625 (95% ДИ: 0,526–0,725), $p = 0,014$ соответственно. Остальные параметры индекса FLIPI-2 и правила начисления баллов оставили без изменений.

В связи с тем, что при разработке FLIPI-2 [78] в качестве первичной конечной точки использовалась ВБП, далее для оценки классификационной способности индексов будем рассчитывать данный показатель выживаемости. Сравнивали 6 моделей: 1) базовый FLIPI-2, 2) FLIPI-2 с распределением на две группы (FLIPI-2_2gr), 3) FLIPI-2 с интервальной оценкой β2-МГ (0, 1, 2 балла) и распределением на три группы (FLIPI-2_Int(0-2)_3gr), 4) FLIPI-2 с интервальной оценкой β2-МГ (0, 1, 2 балла) и распределением на две группы (FLIPI-2_Int(0-2)_2gr), 5) FLIPI-2 с интервальной оценкой β2-МГ (0, 0,5, 1 балл) и распределением на три группы (FLIPI-2_Int(0-1)_3gr) и 6) FLIPI-2 с интервальной оценкой β2-МГ (0, 0,5, 1 балл) и распределением пациентов на две группы риска (FLIPI-2_Int(0-1)_2gr), рисунок 38.

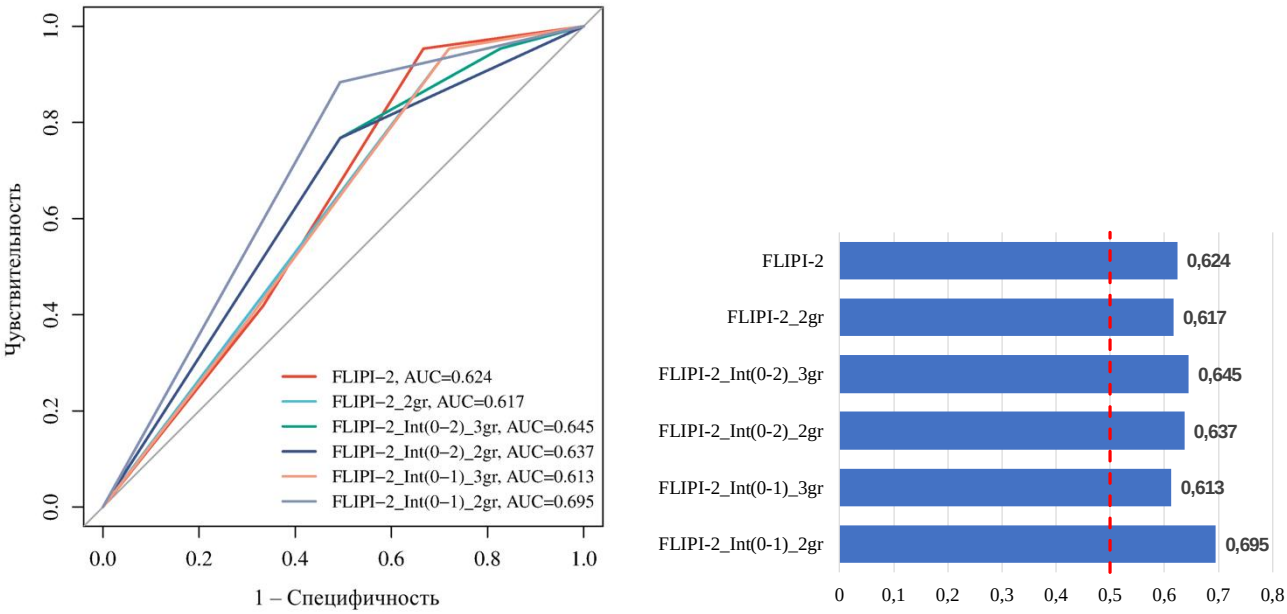


Рисунок 38 – ROC-кривые шести моделей (пояснение в тексте) в отношении пятилетней ВБП и общее качество модели (качественная модель характеризуется AUC > 0,5)

Таким образом, согласно результатам ROC-анализа наиболее качественными моделями прогнозирования риска являются FLIPI-2 с интервальной оценкой β2-МГ (0, 1, 2 балла) и распределением пациентов на три группы риска (FLIPI-2_Int(0-2)_3gr) – третья модель, и FLIPI-2 с интервальной оценкой β2-МГ (0, 0,5, 1 балл) и распределением больных на две группы (FLIPI-2_Int(0-1)_2gr) – шестая модель. Для третьей модели AUC составила 0,645 (95% ДИ: 0,545–0,746), p = 0,005, для шестой – 0,695 (95% ДИ: 0,600–0,790), p < 0,001. Пятилетняя ВБП пациентов из группы низкого риска в третьей модели составила 85,6% (95% ДИ: 59,5–98,3, медиана не достигнута), из группы промежуточного риска – 73,4% (95% ДИ: 54,5–86,7, медиана не достигнута), из группы высокого риска – 40,6% (95% ДИ: 28,5–52,4, медиана 46,5 месяцев), p = 0,0071. Отмечались достоверные межгрупповые различия: между группой низкого и высокого риска (p = 0,018) и между группой промежуточного и высокого риска (p = 0,019). Различий между группами низкого и промежуточного риска выявлено не было, p = 0,379. В группе низкого риска шестой модели пятилетняя ВБП равнялась 87,6% (95% ДИ: 74,9–96,1, медиана не достигнута), в группе высокого риска – 37,4% (95% ДИ: 24,0–46,5, медиана 34,4 месяцев), p < 0,0001, рисунок 39.

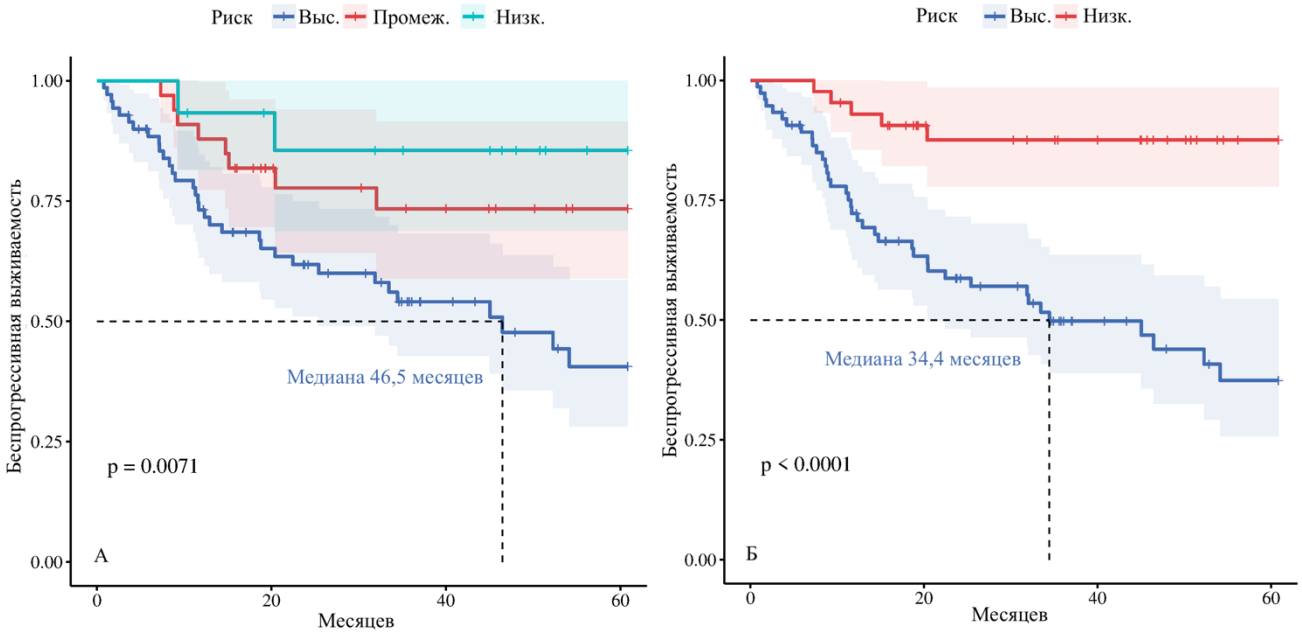


Рисунок 39 – Пятилетняя ВБП у пациентов с ФЛ в зависимости от группы риска третьей модели (А) и шестой модели (Б), разработанных на базе FLIPI-2

В связи с тем, что шестая модель характеризуется самой высокой прогностической силой (AUC = 0,695, p < 0,001; уровень значимости в анализе пятилетней ВБП – p < 0,0001), далее в анализе будем рассматривать данную модель (для упрощения назовем ее FLIPI-2 mod. – FLIPI-2 модифицированный). Особенностью модифицированного индекса является значимое увеличение доли пациентов из группы высокого риска по сравнению с базовым FLIPI-2 (p < 0,001) за счет больных из группы промежуточного риска, таблица 15.

Таблица 15 – Распределение пациентов с ФЛ по группам риска в зависимости от прогностической модели (FLIPI-2 и FLIPI-2 mod.)

Группа риска	FLIPI-2	Группа риска	FLIPI-2 mod.
низкий (0–1)	27 (22,9%)	низкий (0–1,5)	43 (36,4%)
промежуточный (2)	48 (40,7%)		
высокий (≥ 3)	43 (36,4%)	высокий (≥ 2,0)	75 (63,6%)

Примечание: в столбцах «группа риска» в скобках указано суммарное количество баллов, необходимое для стратификации больных в соответствующую группу

Полученная модель (FLIPI-2 mod.) продемонстрировала устойчивые результаты стратификации в том числе в анализе пятилетних ОВ (p < 0,001), БСВ (p < 0,001) и ВБР (p = 0,006), рисунок 40.

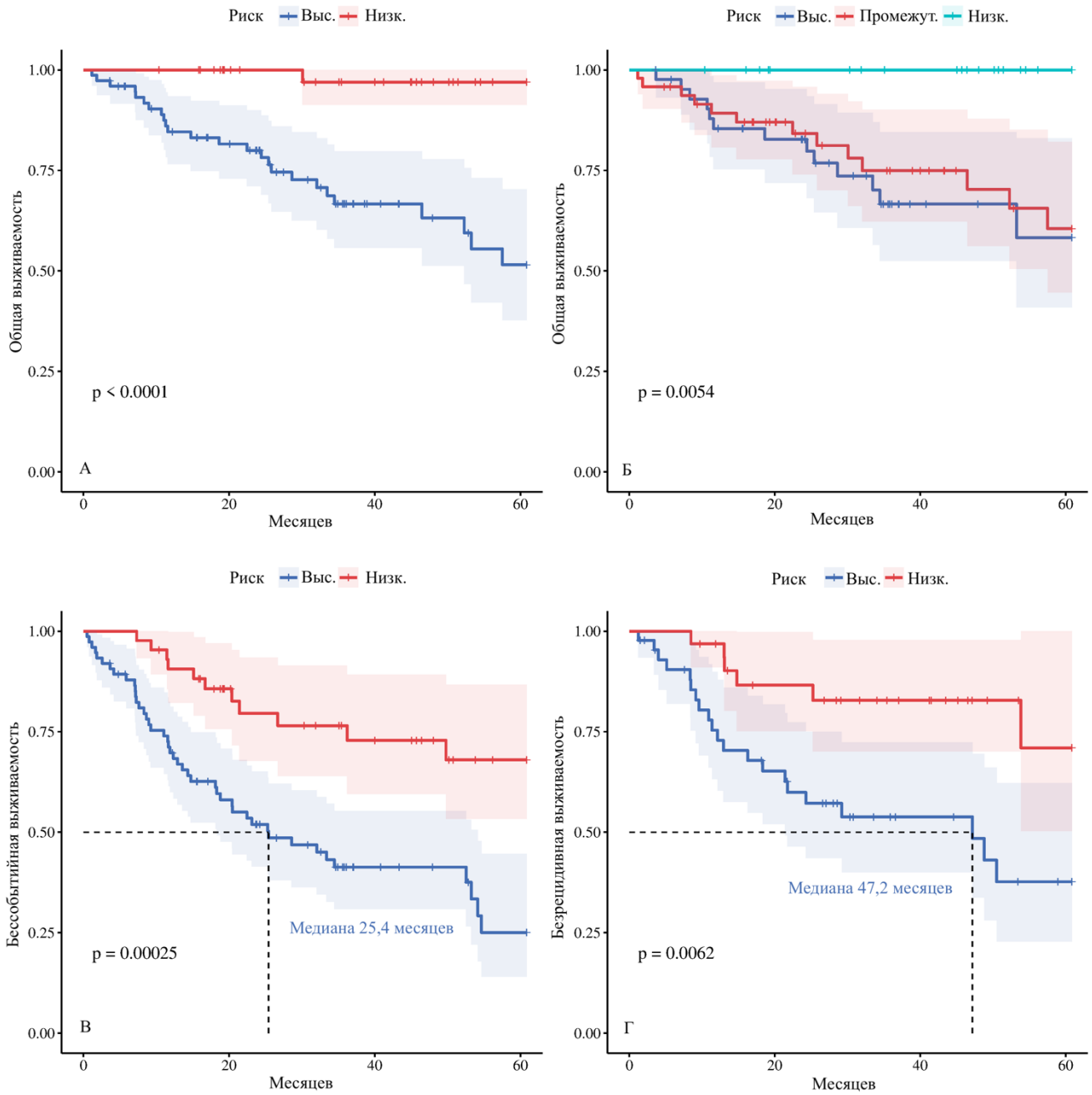


Рисунок 40 – Пятилетняя ОВ в зависимости от группы риска FLIPI-2 mod. (А) и FLIPI-2 (Б) и пятилетние БСВ (В) и ВБР (Г) в зависимости от группы риска FLIPI-2 mod.

Таким образом, нами были выявлены наиболее значимые клинические параметры, определяющие прогноз у пациентов с ФЛ. Мы показали, что для пациентов с ФЛ значение β2-МГ, равное 4,59 мг/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 2 группы риска.

5.2 Эффективность стандартных режимов иммунохимиотерапии у больных фолликулярной лимфомой

В сравнительный анализ оценки эффективности режимов терапии включено 117 пациентов, среди которых у 45 (38,5%) пациентов применялась схема RB, у 72 (61,5%) – схема терапии R-CHOP. Сравнительная характеристика указанных групп больных представлена в таблице 16.

Таблица 16 – Характеристика пациентов в группах RB и R-CHOP

Параметр	RB (n = 45)	R-CHOP (n = 72)	p
Возраст			
медиана, лет (10; 90 процентили)	63,0 (37,8; 75,4)	51,5 (32,2; 69,7)	0,001*
Пол			
мужчины женщины	13 (29%) 32 (71%)	26 (36%) 46 (64%)	0,420
ECOG			
0–1 ≥ 2	36 (80%) 9 (20%)	55 (76%) 17 (24%)	0,899
Цитологический тип			
1–2 3A–3B	37 (82%) 8 (18%)	41 (57%) 31 (43%)	0,005*
GELF-критерии			
bulky disease спленомегалия B-симптомы лейкемический состав крови (опухолевые клетки > 5,0 × 10^9/л)	21 (47%) 24 (53%) 19 (42%) 6 (13%)	23 (32%) 27 (38%) 36 (50%) 7 (10%)	0,110 0,093 0,412 0,545
Поражение костного мозга	27 (60%)	36 (50%)	0,291
Экстранодальные поражения	14 (31%)	19 (26%)	0,581
Стадия (Ann Arbor)			
I–II III–IV	1 (2%) 44 (98%)	5 (7%) 67 (93%)	0,404
Клинический анализ крови			
Лейкоциты, × 10^9/л Гемоглобин, г/л Эритроциты, × 10^{12}/л Тромбоциты, × 10^9/л Лимфоциты, × 10^9/л СОЭ, мм/ч	5,8 (3,3; 11,3) 133 (104; 147) 4,5 (3,2; 4,9) 206 (128; 295) 1,5 (0,4; 5,5) 14 (5; 42)	6,2 (3,3; 16,9) 133 (108; 152) 4,5 (3,8; 5,2) 227 (148; 399) 1,5 (0,8; 11,0) 10 (3; 30)	0,880 0,184 0,605 0,120 0,974 0,040*
Биохимические показатели			
β2-МГ, мг/л ЛДГ, Ед/л СКФ, мл/мин	6,2 (1,7; 10,2) 245 (146; 492) 81,5 (51,5; 124,4)	4,9 (2,2; 9,0) 218 (144; 430) 84,6 (53,7; 131,8)	0,337 0,159 0,442
Миелограмма			
Всего Нф, % Всего Лф, %	50,2 (14,4; 67,6) 23,0 (7,5; 77,8)	56,6 (14,5; 65,3) 12,6 (4,5; 79,0)	0,256 0,151

Продолжение таблицы 16

Параметр	RB (n = 45)	R-CHOP (n = 72)	p
ИГХ-исследование			
Bcl-2	38 (95%)	54 (89%)	0,264
Bcl-6	26 (65%)	43 (71%)	0,562
Ki-67, %	25 (10; 63)	33 (10; 90)	0,111

Примечание: ЛДГ – лактатдегидрогеназа, Лф – лимфоциты, Нф – нейтрофилы, СКФ – скорость клубочковой фильтрации (формула Кокрофта-Голта), β2-МГ – бета-2-микроглобулин;

* – различия между группами достоверны (p < 0,05)

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 (3А–3В цитологический тип) чаще отдавалось предпочтение более агрессивному режиму ИХТ R-CHOP, как более эффективному (лечение ФЛ 3В типа соответствует терапии ДВККЛ), а в старшей возрастной группе пациентов с ФЛ 1–2 цитологического типа чаще использовался режим RB. В группе R-CHOP медиана длительности наблюдения составила 36 месяцев (10 и 90 процентили: 12; 152), в группе RB – 116 месяцев (10 и 90 процентили: 29; 547), p < 0,001, рисунок 41.

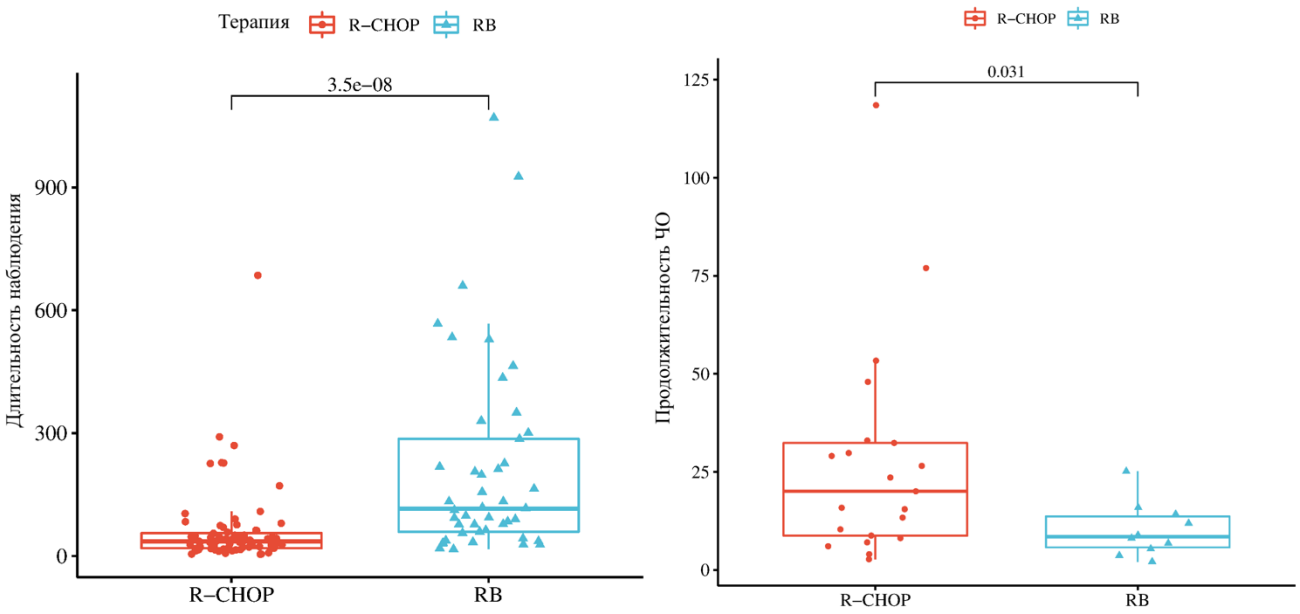


Рисунок 41 – Длительность наблюдения (А) и продолжительность ЧО (Б) в зависимости от схемы терапии

Медиана времени, в течение которого сохранялся ЧО, в группе R-CHOP равнялась 20,1 месяцев (10 и 90 процентили: 4,4; 72,2) и была достоверно выше, чем в группе RB – 8,5 месяцев (10 и 90 процентили: 2,3; 24,2), p = 0,03. Продолжительность ПО не отличалась между исследуемыми выборками, p = 0,89. Подробная характеристика результатов терапии в обоих группах представлена в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты терапии в группах RB и R-CHOP

Параметр	RB (n = 45)	R-CHOP (n = 72)	p
Время, месяцев (10; 90 процентили)			
длительность наблюдения	116 (29; 547)	36 (22; 152)	< 0,001*
время до ЧО	3,3 (2,2; 5,5)	3,5 (1,5; 7,0)	0,522
длительность ЧО	8,5 (2,3; 24,2)	20,1 (4,4; 72,2)	0,030*
время до ПО	5,1 (2,5; 13,8)	5,4 (2,8; 23,0)	0,515
длительность ПО	31,1 (5,0; 70,9)	29,2 (8,8; 99,3)	0,890
время до ЧОО	3,4 (2,2; 6,3)	3,9 (1,9; 9,1)	0,215
длительность ЧОО	15,9 (0; 57,8)	25,9 (4,2; 75,6)	0,038*
время до ПЗ	10,8 (1,9; 69,7)	9,0 (1,3; 42,2)	0,468
время до рецидива	44,4 (11,9; НД)	26,7 (9,7; 87,5)	0,549
Частоты (%)			
ЧО	20 (44%)	32 (44%)	1,000
ПО	28 (62%)	51 (71%)	0,333
ЧОО	38 (84%)	69 (96%)	0,032*
частота ПЗ	10 (22%)	12 (17%)	0,454
частота рецидивов	4 (9%)	15 (21%)	0,088
частота трансформаций	2 (4%)	0	–

Примечание: ПЗ – прогрессирование заболевания, ПО – полный ответ, ЧО – частичный ответ, ЧОО – частота объективных ответов

* – различия между группами достоверны (p < 0,05)

Сравнение двух режимов терапии по способности редуцировать опухолевую массу проводилось путем оценки динамики изменения SPD 6 таргетных очагов. Перед началом терапии SPD значимо не различалась в исследуемых группах. Медиана SPD в группе R-CHOP и RB составила 5170 мм^2 (10 и 90 процентили: 1041; 19838) и 4709 мм^2 (10 и 90 процентили: 1526; 13785) соответственно, p = 0,274. После завершения индукционного этапа терапии первой линии проводилось контрольное измерение таргетных очагов и рассчитывался процент редукции, как доля от первоначального значения. В группе R-CHOP отмечалось снижение объема опухолевой массы на –85,1% (10 и 90 процентили: –94,7; –48,2) и после терапии первой линии медиана SPD составила 569 мм^2 (10 и 90 процентили: 216; 4296). В группе RB объем опухолевой массы уменьшился на –83,7% (10 и 90 процентили: –95,3; –46,1) и составил 640 мм^2 (10 и 90 процентили: 354; 2425), однако межгрупповые различия недостоверны, p = 0,953, рисунок 42.

У пациента FL063 на фоне проводимой терапии R-CHOP развилось ПЗ в виде увеличения объема опухолевой массы на 32,3%. Пациенту была инициирована терапия второй линии по схеме RB, однако пациент умер менее чем через 2 года от даты верификации диагноза.

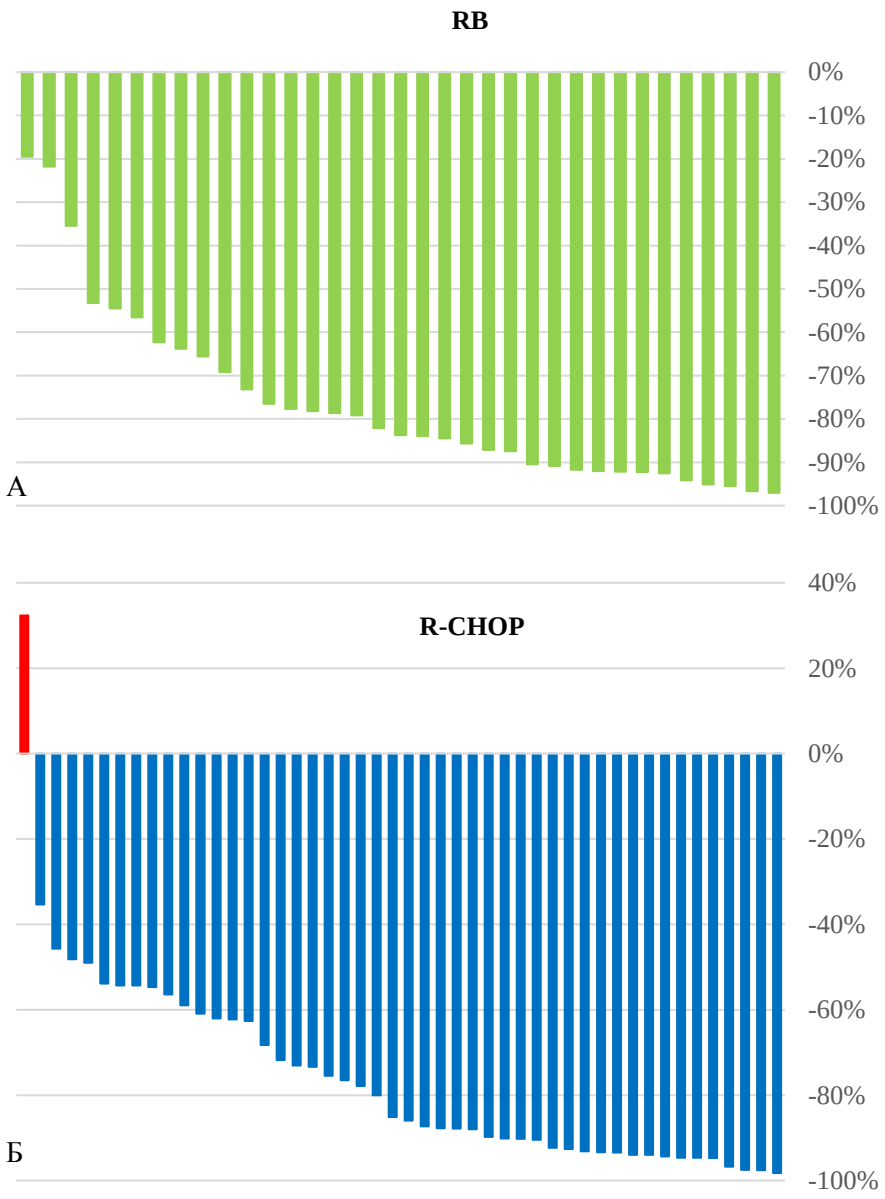


Рисунок 42 – Изменение SPD (%) после терапии RB (А) и R-CHOP (Б)

Пятилетняя ОВ в группе RB составила 63,4% (95% ДИ: 48,8–78,1, медиана не достигнута), в группе R-CHOP – 78,5% (95% ДИ: 67,7–87,3, медиана не достигнута), p = 0,084. Двухлетняя ВБП значимо не различалась в исследуемых группах (p = 0,117) и в группе RB равнялась 65,1% (95% ДИ: 48,8–78,1, медиана не достигнута), а в группе R-CHOP – 77,3% (95% ДИ: 66,4–86,7, медиана не достигнута). Анализ двухлетней ВБР и БСВ также не выявил различий между режимами RB и R-CHOP, p = 0,499 и p = 0,115 соответственно, рисунок 43.

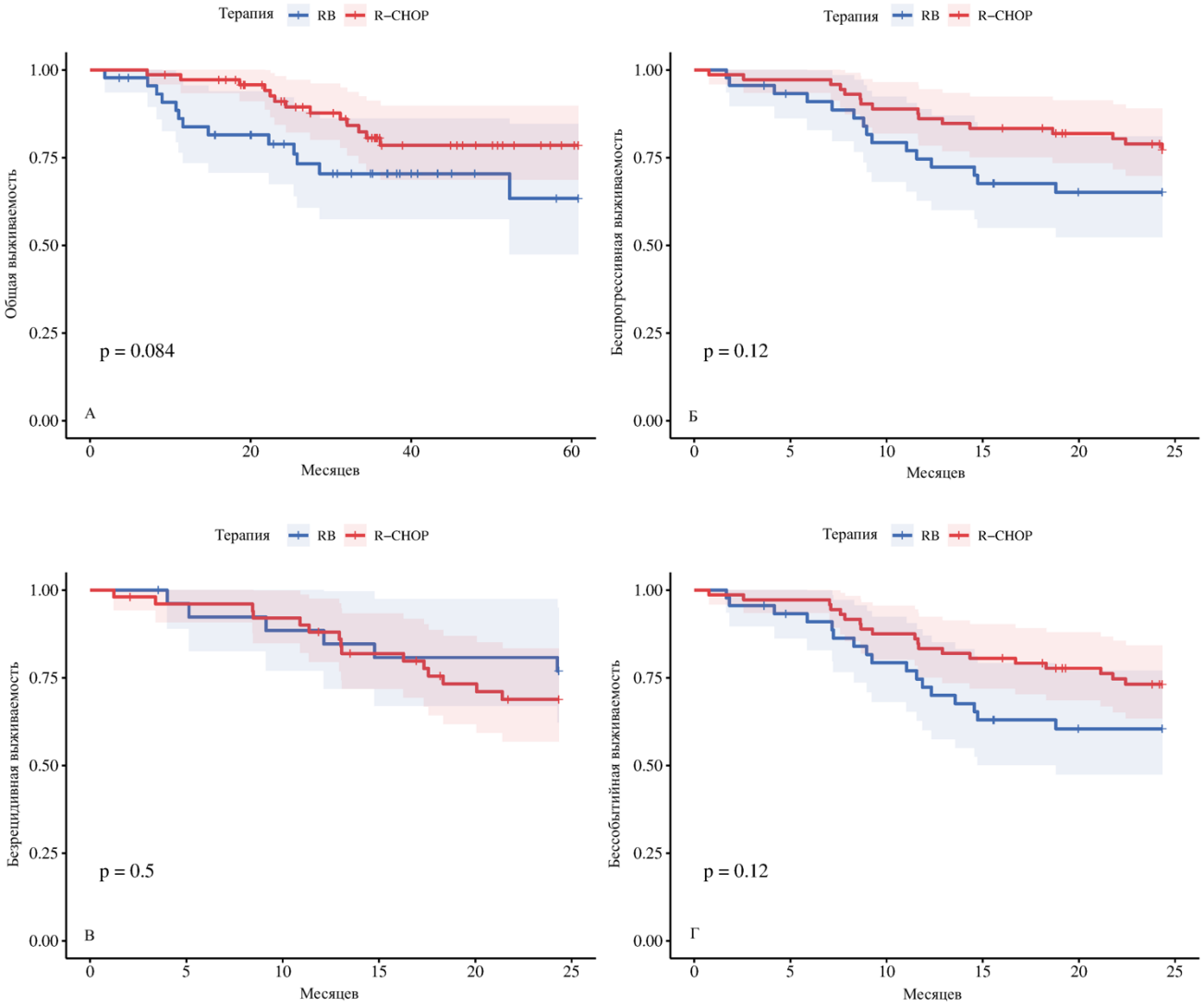


Рисунок 43 – Пятилетняя ОВ (А) и двухлетние ВБП (Б), ВБР (В) и БСВ (Г) в группах RB и R-CHOP

Поддерживающая терапия ритуксимабом проводилась у 54 (75%) пациентов из группы R-CHOP и у 19 (42%) из группы RB, p < 0,001. Медиана количества циклов поддерживающей терапии в группе R-CHOP составила 12 (10 и 90 процентили: 6; 12). Имеется тенденция к снижению частоты ПЗ у пациентов, получивших поддерживающую терапию ритуксимабом после R-CHOP, – 13% против 28%, p = 0,16. Частота рецидивов у пациентов с поддерживающей терапией составила 15%, а частота всех неблагоприятных событий (ПЗ, рецидив, трансформация) – 24%, что существенно ниже, чем у пациентов без поддержки – 39% (p = 0,044) и 67% (p = 0,02) соответственно. Общая пятилетняя выживаемость в группе с поддерживающей терапией составила 84,6% (95% ДИ: 72,9–93,4, медиана не достигнута), в группе без поддержки – 57,8% (95% ДИ: 30,8–78,5, медиана не достигнута), p = 0,019. Достоверно лучшие показатели двухлетней ВБП, ВБР и БСВ были получены у пациентов, которым проводилась поддерживающая терапия, рисунок 44.

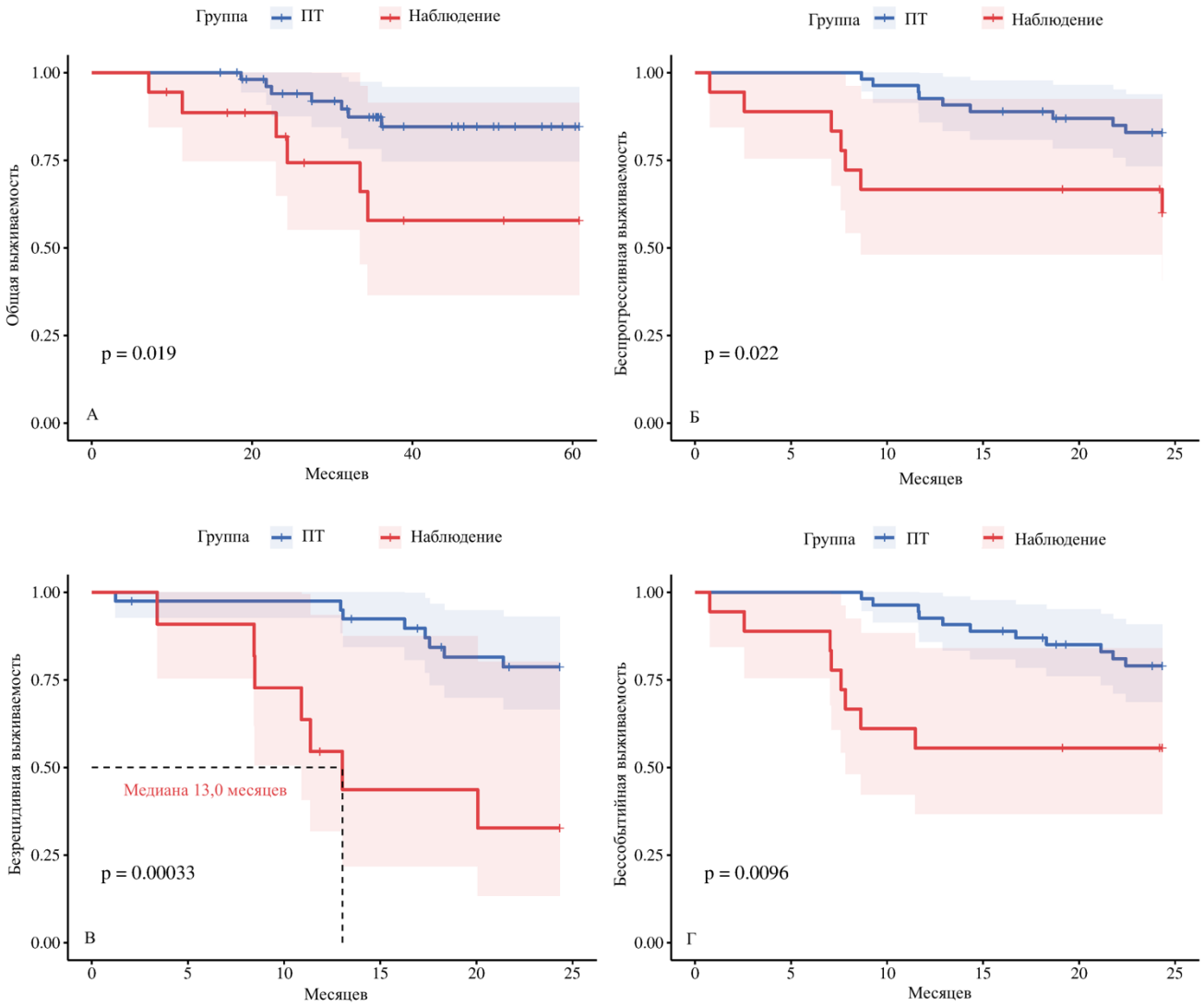


Рисунок 44 – Пятилетняя ОВ (А) и двухлетние ВБП (Б), ВБР (В) и БСВ (Г) у пациентов из группы R-CHOP в зависимости от проведения поддерживающей терапии (ПТ)

Значения показателей выживаемости в зависимости от поддерживающей терапии у пациентов в группе R-CHOP представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Выживаемость в группе R-CHOP в зависимости от поддерживающей терапии

Параметр	Поддерживающая терапия (n = 54)	Без поддерживающей терапии (n = 18)	p
Выживаемость, % (95% ДИ)			
2-летняя ОВ	94,0% (95% ДИ: 84,6–98,8)	81,7% (95% ДИ: 58,6–96,4)	0,104
5-летняя ОВ	84,0% (95% ДИ: 72,9–93,4)	57,8% (95% ДИ: 30,8–78,5)	0,019*
2-летняя ВБП	82,9% (95% ДИ: 70,7–92,1)	60,0% (95% ДИ: 35,8–82,7)	0,022*
5-летняя ВБП	70,0% (95% ДИ: 56,4–82,0)	45,8% (95% ДИ: 21,5–69,2)	0,016*
2-летняя ВБР[1]	78,7% (95% ДИ: 64,4–88,0)	32,7% (95% ДИ: 13,3–59,0)[a]	< 0,001*
5-летняя ВБР[1]	68,8% (95% ДИ: 54,5–80,5)	10,9% (95% ДИ: 1,4–34,7)[b]	< 0,001*
2-летняя БСВ	79,0% (95% ДИ: 66,5–89,4)	55,6% (95% ДИ: 30,8–78,5)	0,010*

Продолжение таблицы 18

Параметр	Поддерживающая терапия (n = 54)	Без поддерживающей терапии (n = 18)	p
5-летняя БСВ	63,8% (95% ДИ: 48,7–75,1)	8,1% (95% ДИ: 0,1–27,3)[c]	< 0,001*

Примечание: БСВ – бессобытийная выживаемость, ВБП – выживаемость без прогрессирования, ВБР – выживаемость без рецидива, ОВ – общая выживаемость

[1] – параметр оценивался только у 51 пациента, достигшего полного ответа, [a] – медиана двухлетней ВБР 13,0 месяцев, [b] – медиана пятилетней ВБР 13,0 месяцев, [c] – медиана пятилетней БСВ 25,3 месяца

* – различия между группами достоверны (p < 0,05)

Медиана количества циклов поддерживающей терапии в группе RB равнялась 12 (10 и 90 процентили: 1; 12). У пациентов с поддерживающей терапией отмечались более низкие частоты ПЗ (16% против 27%), рецидивов (0% против 15%) и неблагоприятных событий (16% против 42%), однако различия между группами недостоверны, p = 0,481, p = 0,126 и p = 0,102 соответственно. Пятилетняя ОВ у пациентов с поддерживающей терапией составила 78,3% (95% ДИ: 54,4–94,0, медиана не достигнута), у пациентов без поддержки – 50,9% (95% ДИ: 29,9–70,1, медиана не достигнута), p = 0,188. Как и в группе R-CHOP, у пациентов после RB с последующей поддерживающей терапией показатели двухлетней ВБП, ВБР и БСВ выше, чем у пациентов, находящихся под наблюдением, рисунок 45.

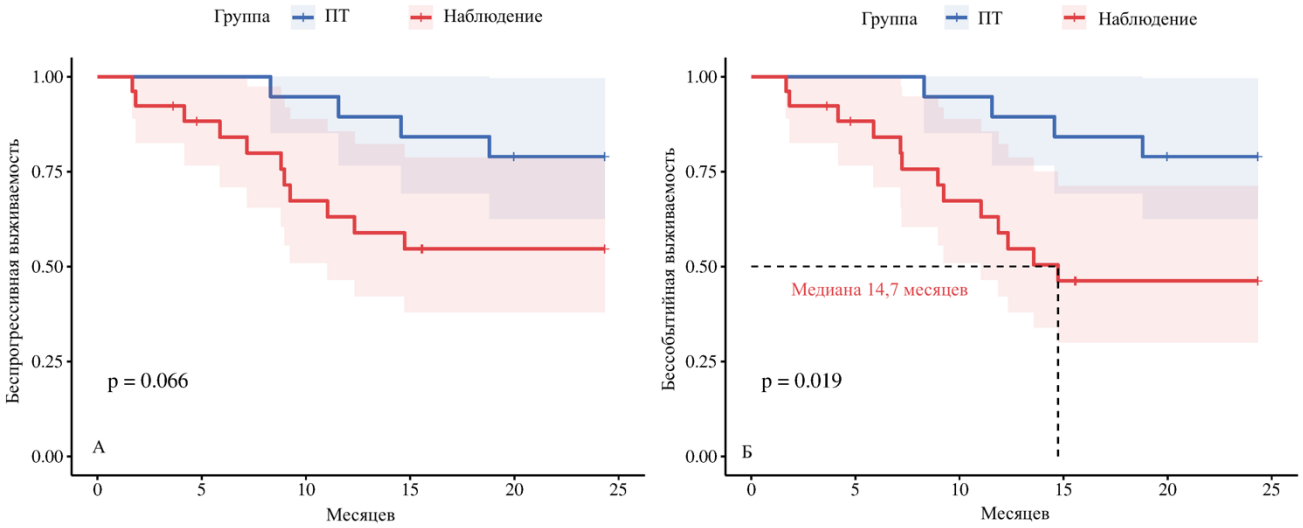


Рисунок 45 – Двухлетние ВБП (А) и БСВ (Б) у пациентов из группы RB в зависимости от проведения поддерживающей терапии (ПТ)

Подробная характеристика показателей выживаемости пациентов из группы RB в зависимости от поддерживающей терапии представлена в таблице 19.

Таблица 19 – Выживаемость в группе RB в зависимости от поддерживающей терапии

Параметр	Поддерживающая терапия (n = 19)	Без поддерживающей терапии (n = 26)	p
Выживаемость, % (95% ДИ)			
2-летняя ОВ	83,9% (95% ДИ: 60,4–96,6)	75,3% (95% ДИ: 56,4–91,0)	0,423
5-летняя ОВ	78,3% (95% ДИ: 54,4–94,0)	50,9% (95% ДИ: 29,9–70,1)	0,188
2-летняя ВБП	78,9% (95% ДИ: 54,4–94,0)	54,7% (95% ДИ: 33,4–73,4)	0,066
5-летняя ВБП	78,9% (95% ДИ: 54,4–94,0)	35,3% (95% ДИ: 17,2–55,7) [a]	0,014*
2-летняя ВБР[1]	87,5% (95% ДИ: 61,7–98,5)	63,6% (95% ДИ: 34,9–90,1)	0,135
5-летняя ВБР[1]	87,5% (95% ДИ: 61,7–98,5)	20,0% (95% ДИ: 6,6–39,4)[b]	0,015*
2-летняя БСВ	78,9% (95% ДИ: 54,4–94,0)	46,2% (95% ДИ: 26,6–66,6)[c]	0,019*
5-летняя БСВ	78,9% (95% ДИ: 54,4–94,0)	11,0% (95% ДИ: 2,5–30,2)[d]	0,001*

Примечание: БСВ – бессобытийная выживаемость, ВБП – выживаемость без прогрессирования, ВБР – выживаемость без рецидива, ОВ – общая выживаемость

[1] – параметр оценивался только у 28 пациентов, достигших полного ответа, [a] – медиана пятилетней ВБП 25,4 месяца, [b] – медиана пятилетней ВБР 47,2 месяца, [c] – медиана двухлетней БСВ 14,7 месяцев, [d] – медиана пятилетней БСВ 14,7 месяцев

* – различия между группами достоверны ($p < 0,05$)

Нами также была оценена эффективность поддерживающей терапии ритуксимабом после RB в зависимости от варианта ответа (ПО или ЧО) на индукционный этап лечения. Пятилетние ОВ и ВБП у пациентов, достигших ЧО (n = 20), не различались между обоими группами ($p = 0,882$ и $p = 0,219$ соответственно), а пятилетняя БСВ у пациентов, получивших поддерживающую терапию после достижения ЧО, составила 77,8% (95% ДИ: 40,0–97,2, медиана не достигнута) и была достоверно выше, чем у больных без поддерживающей терапии – 0% (медиана 36,2 месяца), $p = 0,034$. У пациентов, достигших ПО (n = 28), были получены аналогичные результаты: пятилетние ОВ и ВБП не различались между группами ($p = 0,432$ и $p = 0,227$ соответственно), в то время как пятилетняя БСВ в группе поддерживающей терапии составила 87,5% (95% ДИ: 61,7–98,5, медиана не достигнута), а в контрольной группе – 17,8% (95% ДИ: 2,1–48,4, медиана 52,5 месяцев), $p = 0,01$, рисунок 46. Таким образом, мы показали, что поддерживающая терапия после RB одинаково эффективна в независимости от полученного ответа после индукционного лечения.

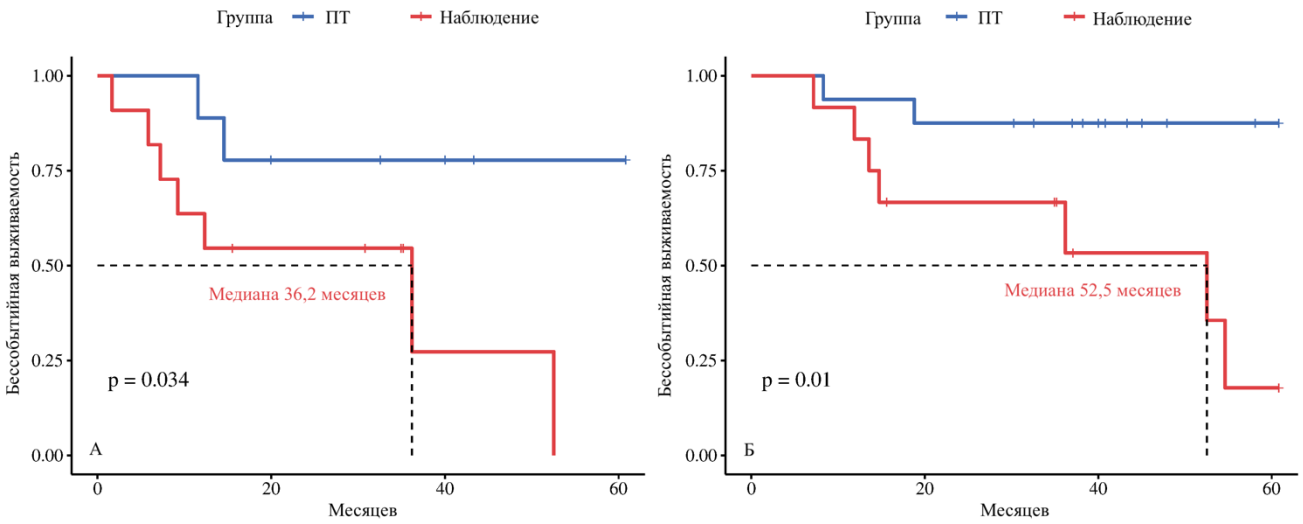


Рисунок 46 – Пятилетняя БСВ у пациентов из группы RB, достигших ЧО (А) и ПО (Б) в зависимости от проведения поддерживающей терапии (ПТ)

У пациентов, достигших ЧО после индукционной терапии R-CHOP, поддерживающая терапия давала преимущества только в анализе пятилетней ВБП и БСВ (p = 0,024 для обоих показателей). При достижении ПО, у пациентов с поддерживающей терапией пятилетняя ОВ равнялась 73,5% (95% ДИ: 56,1–85,4, медиана не достигнута), у больных без поддержки – 61,4% (95% ДИ: 30,8–89,1, медиана не достигнута), p = 0,069. Пятилетняя БСВ была достоверно выше у пациентов, получивших поддерживающую терапию, и составила 65,4% (95% ДИ: 48,3–79,4, медиана не достигнута) против 10,4% (95% ДИ: 61,7–98,5, медиана 31,6 месяцев) у больных, находящихся под наблюдением, p < 0,001, рисунок 47.

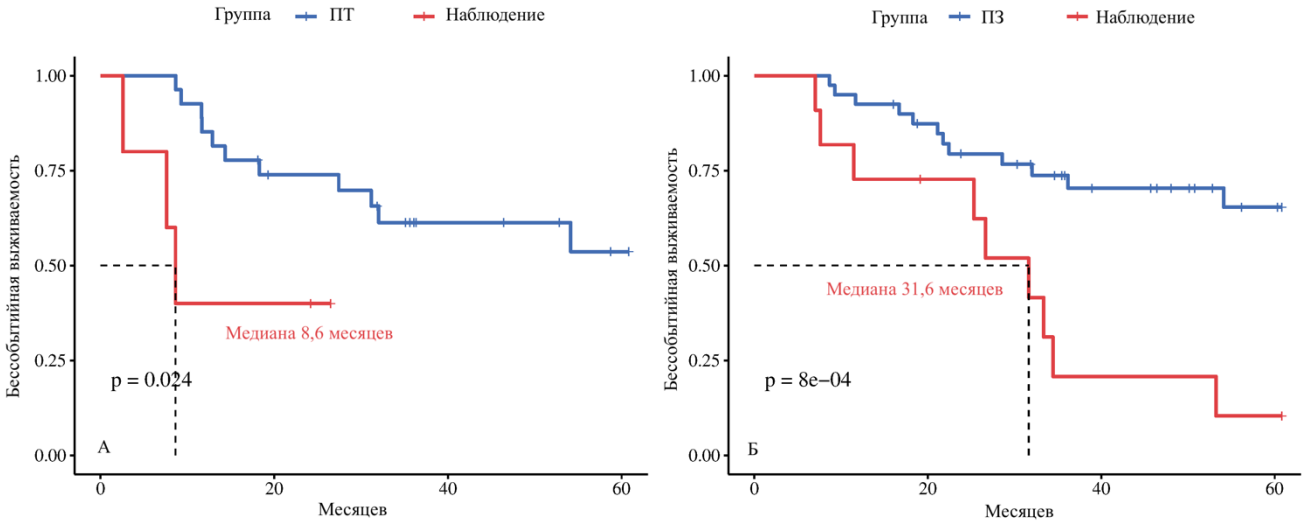


Рисунок 47 – Пятилетняя БСВ у пациентов из группы R-CHOP, достигших ЧО (А) и ПО (Б) в зависимости от проведения поддерживающей терапии (ПТ)

Пятилетние показатели выживаемости в группах R-CHOP и RB в зависимости от проведения поддерживающей терапии представлены на рисунке 48.

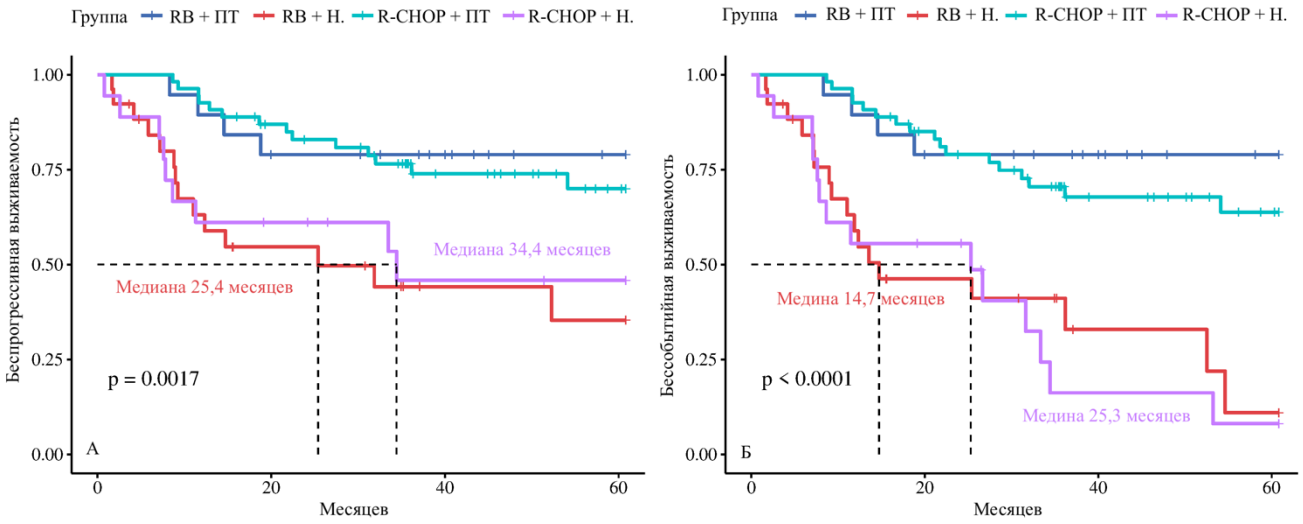


Рисунок 48 – Пятилетние ВБП (А) и БСВ (Б) у пациентов из группы R-CHOP и RB в зависимости от проведения поддерживающей терапии (ПТ) или наблюдения (Н.)

Пятилетняя выживаемость (ОВ, ВБП, ВБР и БСВ) в группах R-CHOP и RB при выборе одинаковой стратегии после завершения индукционного этапа лечения не отличалась, таблица 20.

Таблица 20 – Степень достоверности различий в анализе выживаемости в группах RB и R-CHOP в зависимости от поддерживающей терапии (ПТ) или наблюдения

Параметр	R-CHOP +ПТ против RB +ПТ	R-CHOP + наблюдение против RB + наблюдение	R-CHOP + наблюдение против RB + ПТ	R-CHOP + ПТ против RB + 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[1]	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

[1] – параметр оценивался только у 78 пациентов, достигших полного ответа

* – различия между группами достоверны (p < 0,05)

Таким образом, показано, что поддерживающая терапия ритуксимабом дает существенное преимущество в выживаемости пациентов с ФЛ как после RB, так и после R-CHOP в сравнении с наблюдением.

Также нами была оценена эффективность ИХТ по схеме GB (8 пациентов) и ритуксимаба в монорежиме (12 пациентов) в сравнении с режимами R-CHOP и RB. Группа GB по клиническим показателям значимо не отличалась от группы RB и R-CHOP ($p > 0,05$). В группе ритуксимаба отмечалась достоверно более низкая частота встречаемости 3A и 3B цитологического типа (16,7% и 0% соответственно) по сравнению с группой R-CHOP ($p = 0,013$), а также более низкая частота III и IV стадий (Ann Arbor) – 16,7% и 50,0% соответственно по сравнению с группой R-CHOP ($p = 0,013$) и группой RB ($p = 0,007$). С учетом медианы длительности наблюдения за пациентами из группы GB, равной 12,4 месяцев, а также малого размера выборок (8 и 12 пациентов в группе GB и ритуксимаба соответственно), проводился только анализ двухлетней БСВ. В группе GB двухлетняя БСВ составила 75,0%, что значимо не отличается от группы R-CHOP, RB и ритуксимаба ($p = 0,428$, $p = 0,928$ и $p = 0,608$ соответственно), в группе ритуксимаба – 12,2%, что достоверно ниже, чем в группе R-CHOP ($p = 0,003$) и значимо не отличается от других групп (против RB $p = 0,184$, против GB $p = 0,608$). У 2 пациентов из группы GB отмечались неблагоприятные события (смерть от COVID-19 – пациент FL007 и трансформация в ДВККЛ – пациент FL160), значимо повлиявших на общие результаты.

Таким образом, в данном разделе нами было показано, что режим R-CHOP обладает определенными преимуществами в эффективности лечения пациентов с ФЛ по сравнению с RB, а поддерживающая терапия терапевтическими анти-CD20-МКАТ достоверно улучшает показатели выживаемости в независимости от варианта индукционной терапии.

ГЛАВА 6. АЛГОРИТМ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМОЙ

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

В 2022 г. Клиническим консультативным комитетом (CAC) была пересмотрена международная консенсусная классификация (ICC) зрелых лимфоидных новообразований. В связи с характерными, клиническими, морфологическими и молекулярными особенностями ICC выделила в отдельную группу t(14;18)-негативные ФЛ с положительной экспрессией CD23 [52], для которых характерно преобладание диффузного характера роста, частая встречаемость у женщин, поражение паховых лимфатических узлов, дебют заболевания в непродвинутой стадии и наличие мутаций гена *STAT6*.

Перестройки гена *BCL2* и экспрессия CD23 были одновременно оценены у 95 пациентов, в группу BCL2-негативной и CD23-позитивной ФЛ (*BCL2*–CD23+) вошло 40 (42,1%) больных, в контрольную группу (все оставшиеся варианты сочетаний *BCL2* и CD23) – 55 (57,9%) пациентов. 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 в дебюте, которое в группе *BCL2*–CD23+ равнялось $1,40 \times 10^9$/л (10 и 90 процентили: 0,48; 3,70) и было достоверно ниже, чем в контрольной группе – $1,83 \times 10^9$/л (10 и 90 процентили: 0,82; 20,5), $p = 0,008$. Частота встречаемости IV стадии в группе *BCL2*–CD23+ составила 55,0%, что значимо ниже, чем в контроле – 72,7%, $p = 0,033$. Распределение больных по гистологическому типу достоверно не различалось между группами, $p = 0,229$. У пациентов контрольной группы в качестве терапии первой линии чаще использовался режим R-CHOP – у 63,4% больных, в группе *BCL2*–CD23+ – у 54,3%, однако различия недостоверны, $p = 0,42$. Частота высокой ТМВ в группе *BCL2*–CD23+ составила 22,2% против 77,8% в контроле, $p = 0,110$ ($n = 26$). В группе *BCL2*–CD23+ регистрировалась более высокая частота мутаций гена *RYR1* – 33,3% против 0% в контрольной группе, $p = 0,037$. Так как мутация гена *STAT6* была выявлена у 1 больного, анализ не проводился, в отношении мутаций других генов достоверных межгрупповых различий получено не было ($p > 0,05$).

Значение SPD в дебюте заболевания в группе *BCL2*–CD23+ составило 5313 см^2 (10 и 90 процентили: 894; 16368) и значимо не отличалось от SPD контрольной группы – 4848 см^2 (10 и 90 процентили: 992; 14236), $p = 0,55$. После окончания индукционного этапа терапии первой линии и рестадирования показатель SPD в группе *BCL2*–CD23+ был достоверно ниже, чем в контрольной группе и равнялся 458 см^2 (10 и 90 процентили: 256; 2171) против 710 см^2 (10 и 90

процентили: 325; 4274) в контрольной группе, p = 0,042. Таким образом, степень регрессии объема опухолевой массы по значению SPD в группе BCL2–CD23+ составила –90,2% (10 и 90 процентили: –96,7; –41,4), в контрольной группе – –65,6% (10 и 90 процентили: –94,1; –20,0) p = 0,016, рисунок 49.

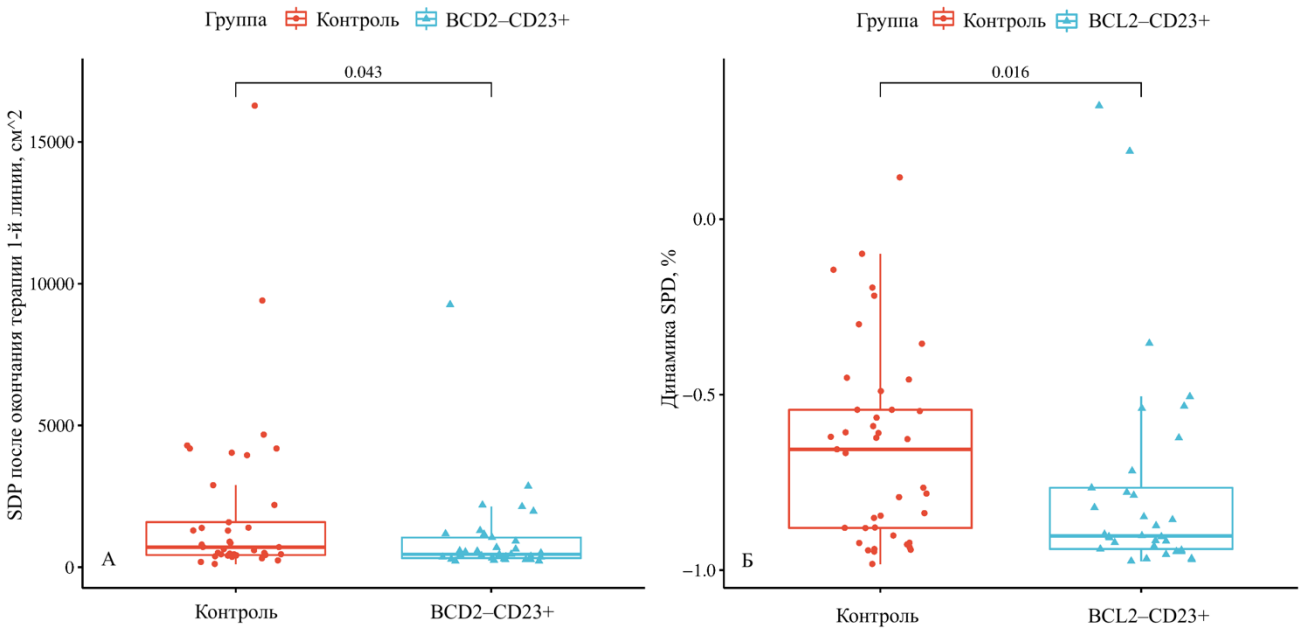


Рисунок 49 – Значение SPD после окончания индукционного этапа лечения (А) и динамика SPD (Б) у пациентов с ФЛ из группы *BCL2*–CD23+ в сравнении с контролем

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, медиана не достигнута), в контрольной группе – 60,3% (95% ДИ: 45,9–73,0, медиана не достигнута), p = 0,187. Пятилетняя ВБП также была лучше в группе *BCL2*–CD23+ и равнялась 62,8% (95% ДИ: 45,8–77,3, медиана не достигнута) против 48,3% (95% ДИ: 35,4–62,9, медиана 46,5 месяцев) в контроле, p = 0,066. Безрецидивная пятилетняя выживаемость значимо не различалась в обоих группах (p = 0,683) и у пациентов из группы *BCL2*–CD23+ составила 35,7% (95% ДИ: 20,6–51,7, медиана 50,5 месяцев), у больных контрольной группы – 56,1% (95% ДИ: 42,3–69,7, медиана не достигнута).

Не было выявлено преимущества в использовании какого-либо из режимов ИХТ в первой линии в группе *BCL2*–CD23+. Показатели пятилетней ОВ (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.

Разработанный прогностический индекс FLIPI-2 mod. характеризуется статистически значимой способностью стратифицировать больных на группы риска. Пятилетняя ОВ у *BCL2*-негативных CD23-позитивных пациентов из группы низкого риска составила 100%, а в группе высокого риска – 37,1% (95% ДИ: 18,1–61,6), p = 0,04 (n = 34). В отношении пятилетней ВБП были получены аналогичные результаты, но с большей степенью достоверности различий между группами низкого и высокого риска, p = 0,0047, рисунок 50.

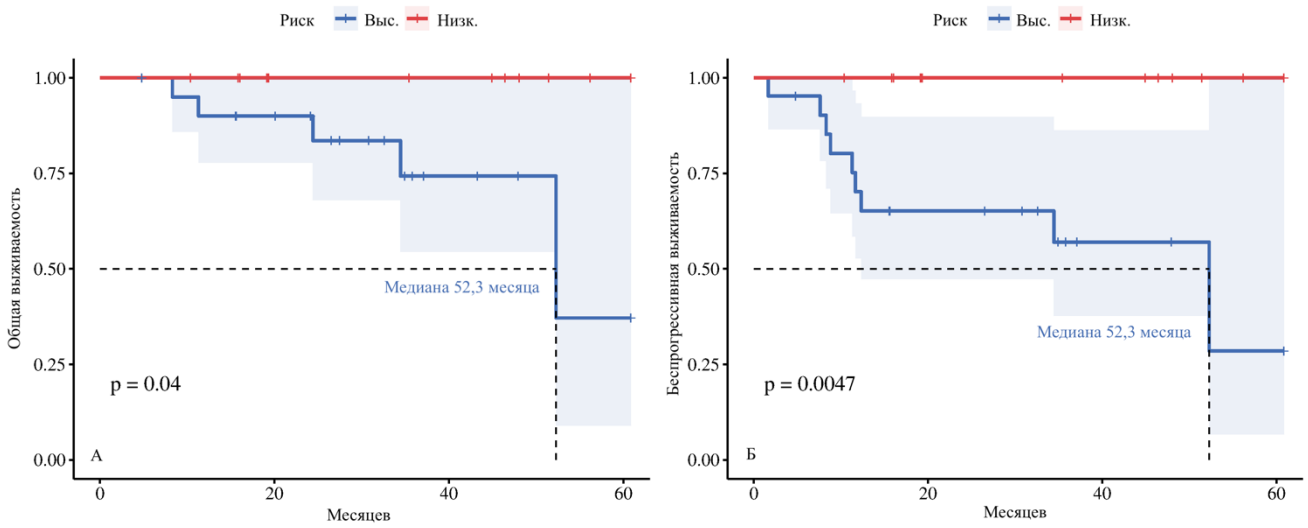


Рисунок 50 – Пятилетние ОВ (А) и ВБП (Б) у BCL2-негативных CD23-позитивных пациентов с ФЛ в зависимости от группы риска FLIPI-2 mod.

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.

6.2 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), рисунок 51. Из алгоритма были исключены пациенты с I стадией (Ann Arbor) по причине низкой встречаемости (3/144) и невозможности провести сравнительный анализ.

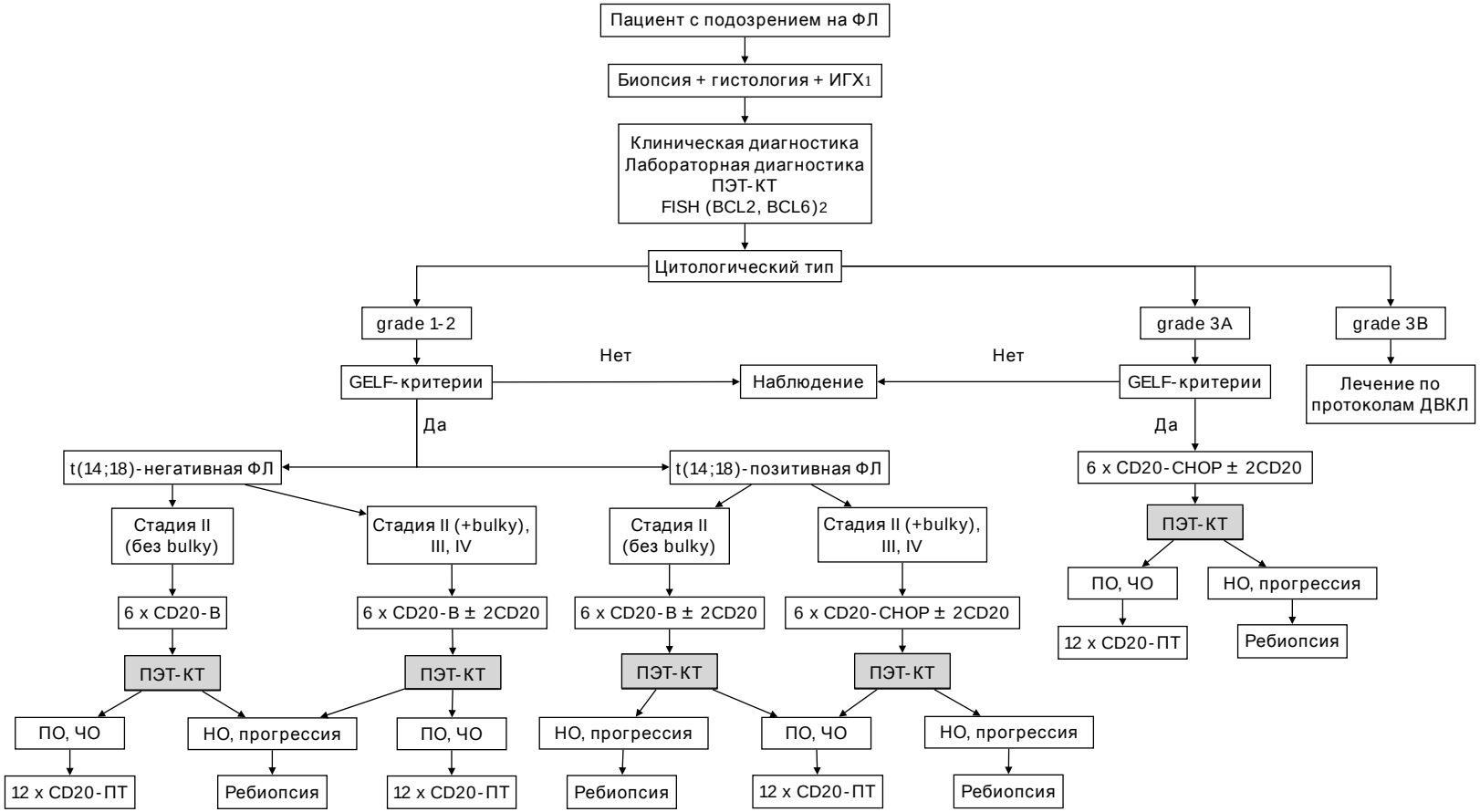


Рисунок 51 – Алгоритм выбора терапии первой линии у некоморбидных пациентов с ФЛ возрастом до 70 лет[1]

[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 [12]; [2] – При выявлении методом FISH перестроек гена *BCL6*, дополнительно необходимо оценить наличие реаранжировки гена *MYC*.

В обследуемой выборке 13 пациентов имели 3В цитологический тип, из них 12 (92%) получили терапию R-CHOP, 1 (8%) пациент лечился по схеме RB. Пятилетняя ОВ у больных из группы R-CHOP составила 36,4% (95% ДИ: 10,9–69,2, медиана 33,4 месяца), пациент, леченный RB, умер через 22,3 месяца с момента постановки диагноза в связи с ПЗ. Лечение данной группы больных осуществляется по протоколам, действующих в отношении ДВККЛ.

В настоящий момент не определен алгоритм терапии пациентов с 3А цитологическим типом [11]. Часть исследователей относят ФЛ 3А к индолентным лимфомам, характеризующихся медленной прогрессией и частыми рецидивами, другая часть считает, что ФЛ 3А ближе по течению к агрессивной ФЛ 3В и может быть излечена с использованием высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. 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. Пятилетняя ОВ составила 73,0% (95% ДИ: 54,1–87,7, медиана не достигнута), 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 $p = 0,812$ и $p = 0,027$ 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 ОВ составила 100% против 71,4% (95% ДИ: 29,0–96,3, медиана не достигнута) в группе RB, $p = 0,015$. В отношении ВБП и БСВ отмечалась аналогичная тенденция, однако межгрупповые различия недостоверны, $p = 0,224$ и $p = 0,093$ соответственно. Сравнение выживаемости в зависимости от стадии (Ann Arbor) выявило тенденцию к улучшению данных показателей у пациентов с II стадией по сравнению с больными с распространенными стадиями (III, IV), но различия также недостоверны, $p > 0,2$.

С прогностической точки зрения разделение пациентов на группы с наличием или отсутствием транслокации t(14;18) не является целесообразным, так как прогноз в обоих 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 (см. выше). Однако пациенты из группы *BCL2*-негативной CD23-позитивной ФЛ характеризуются тенденцией к лучшему прогнозу по сравнению с больными без t(14;18) у которых пятилетние ОВ 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.

Резюмируя вышесказанное, нами был разработан алгоритм терапии пациентов с ФЛ, учитывающий данные молекулярно-генетических исследований, что, несомненно, соответствует вектору развития таргетной и персонифицированной терапии в онкогематологии. Мы продемонстрировали, что у *BCL2*-позитивных пациентов с распространенными стадиями и у больных с 3А цитологическим типом режим ИХТ R-CHOP достоверно эффективнее схемы терапии RB.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фолликулярная лимфома является индолентной лимфомой с преимущественно благоприятным течением и удовлетворительными результатами терапии в сравнении с другими типами НХЛ. Однако, несмотря на достигнутые успехи в лечении, сохраняются относительно высокие частоты рецидива и ПЗ. В нашем исследовании частота ПЗ составила 20,1%, а рецидивов – 16,7%, что полностью соответствует ранее опубликованным данным [53]. Учитывая такой характер течения, в настоящее время активно изучается молекулярный патогенез ФЛ как для выявления новых прогностических факторов, так и с целью реализации персонифицированного подхода в терапии.

Частота транслокаций t(14;18), определяемая методом FISH, в нашем исследовании составила 41,0%, что незначительно ниже 56% в соответствии с данными крупных международных исследований [197], однако существенно меньше, в случае использования более точных методов диагностики (ПЦР, секвенирование) – 85–90%. Частота встречаемости перестроек гена *BCL6* составила 14,1% и согласуется с результатами других исследований – 6,4–14,3% [176]. Аберрации гена *TP53* редко встречаются в дебюте ФЛ, частота которых составляет до 5–8%. Тем не менее, приобретение мутаций гена *TP53* отмечается при прогрессировании или гистологической трансформации ФЛ, частота которых может достигать 20% [50]. Высокая частота перестроек гена *TP53* (14,0%) в нашем исследовании, вероятнее всего, обусловлена малым размером выборки (были оценены у 93 пациентов), а также включением в исследование пациентов с 3А и 3В цитологическим типом, при которых частота встречаемости делеции del17p/*TP53* достоверно выше, чем при высокодифференцированной ФЛ (по нашим данным частота del17p/*TP53* у пациентов с 3А и 3В цитологическим типом составила 17,2%, у пациентов с 1–2 цитологическим типом – 12,5%, однако различия незначимы, p = 0,377).

Наличие перестроек гена *BCL2* является достоверно неблагоприятным прогностическим фактором в отношении выживаемости пациентов с ФЛ и риска трансформации [63]. В нашем исследовании пациенты с аберрациями гена *BCL2* характеризовались более низкой ВБП, по сравнению с больными с нормальным геном, однако различия недостоверны (p = 0,296), ОР составил 1,43. С другой стороны ВБР у пациентов с t(14;18) была выше, чем у t(14;18)-негативных больных (p = 0,162), а ОР по данным регрессионного анализа составил 0,497 (p = 0,169), что согласуется с данными другого исследования, в котором было показано, что аберрации гена *BCL2* не оказывают негативного влияния на прогноз пациентов с ФЛ, получающих терапию на основе ритуксимаба [110]. В нашем исследовании впервые было продемонстрировано, что у t(14;18)-позитивных пациентов степень редукции опухолевой массы, оцененная по SPD, была ниже, чем у t(14;18)-негативных больных (p = 0,007), также первая

группа характеризовалась более высоким значением СИ, p = 0,033. Несмотря на то, что в соответствии с ранее опубликованными данным [114], у пациентов с реаранжировками гена *BCL6* отмечалась более низкая частота продвинутых стадий, прогрессий и тенденция к благоприятной выживаемости (p = 0,06), в нашем исследовании аберрации гена *BCL6* не продемонстрировали значимого влияния на показатели выживаемости. С другой стороны, мы впервые показали, что пациенты с сочетанием перестроек генов *BCL2* и *BCL6* обладают достоверно худшими показателями выживаемости (p < 0,045) в сравнении с пациентами, без данного сочетания.

Нами проводилось сравнение эффективности режимов ИХТ R-CHOP и RB у пациентов с ФЛ в зависимости от наличия транслокации t(14;18). Оказалось, что пятилетняя ОВ у t(14;18)-позитивных пациентов, получивших в качестве терапии первой линии R-CHOP, достоверно выше, чем у пациентов, получивших RB (p = 0,0013), однако в анализе ВБП и БСВ не было выявлено достоверных различий. Насколько нам известно, это первое упоминание о сравнении двух режимов терапии в зависимости от перестроек гена *BCL2*. В то же время у t(14;18)-негативных пациентов режим R-CHOP не оказывает преимущества в выживаемости по сравнению с RB (p = 0,61), что отражено в предлагаемом нами алгоритме терапии первой линии у некоморбидных пациентов с ФЛ возрастом до 70 лет.

Частота мутаций 16 экзона гена *EZH2*, определяемая с помощью секвенирования по Сэнгеру, в нашем исследовании составила 17,1%, что соответствует ранее опубликованным данным – 7–28%. Недавно были представлены результаты отечественного исследования с включением 80 пациентов с впервые диагностированной ФЛ 1–3А цитологического типа, у 10 (13%) из которых была выявлена мутация 16 экзона гена *EZH2* [8, 14]. Авторы проводили оценку полиморфизма гена *EZH2* и установили, что генотип GG полиморфизма rs2072407 в гене *EZH2* является значимым благоприятным прогностическим фактором. В соответствии с нашими данными для пациентов с аллелем дикого типа гена *EZH2* была характерна более высокая степень редукции опухолевой массы на фоне терапии R-CHOP и RB, по сравнению с пациентами, имеющими мутацию данного гена. Сравнение эффективности терапии (R-CHOP и RB) в группе дикого типа и в группе с мутацией продемонстрировало улучшение результатов лечения в последней: более высокая ЧОО (p = 0,044) и низкая вероятность неблагоприятных событий (p = 0,012). Также отмечалась тенденция в виде сокращения времени до достижения ЧО (p = 0,069), времени до ЧОО (p = 0,053) и снижении частоты ПЗ в группе с мутацией (p = 0,063).

По данным анализа выживаемости мутация гена *EZH2* выступала в качестве благоприятного прогностического признака. Была продемонстрирована высокая степень достоверности различий, в частности, в анализе пятилетних ВБП (p = 0,004) и БСВ (p < 0,001). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными, в соответствии

с которыми мутации гена *EZH2* связаны с более длительной ВБП [120] у пациентов, получавших в качестве индукционной терапии R-CHOP/CVP, однако аналогичные результаты не были подтверждены у пациентов, принимающих терапию на основе бендамустина. В недавнем исследовании авторы подтвердили более высокую эффективность R-CHOP у пациентов с мутацией гена *EZH2*, что проявляется в низкой частоте рецидивов и более длительной ОВ, в то время как у больных с вариантом аллеля дикого типа предпочтительнее использовать терапию RB [143]. Также в данном исследовании впервые была показана разница по частоте встречаемости мутаций гена *EZH2* в зависимости от гистологического типа ФЛ: у пациентов с ФЛ 1–3А цитологического типа частота мутаций составила 26%, у пациентов с ФЛ 3В – 46%. Нами проводилась сравнительная оценка эффективности режимов R-CHOP и RB в группе пациентов с мутацией гена *EZH2* (n = 18, один пациент лечился по схеме GB), которая продемонстрировала полное отсутствие межгрупповых различий ($p > 0,682$), вероятно, по причине малой выборки. ОР наличия мутации гена *EZH2* по данным однофакторного регрессионного анализа в нашем исследовании был меньше 0,22 ($p < 0,03$). Таким образом, наличие мутации достоверно снижает риск наступления неблагоприятного события более чем в 4 раза, что согласуется с данными, полученными в исследовании по m7-FLIPI, в котором ОР в отношении выживаемости, свободной от неудач лечения, равнялся 0,46 ($p = 0,03$) [183].

Наше исследование не выявило каких-либо аномалий в мутационном профиле и частоте мутаций по данным NGS у пациентов с ФЛ согласно ранее представленным данным. В 2022 г. был опубликован отчет Британской сети по исследованию гематологических злокачественных новообразований (HMRN) с включением 852 пациентов с ФЛ в период с 2004 по 2012 гг. 548 (64,3%) из которых было выполнено таргетное секвенирование с использованием панели, содержащей 293 гена. Наибольшая частота мутаций отмечалась в генах *KMT2D, CREBBP, TNFRSF14, EZH2* (Y646X), *STAT6*. Авторы также продемонстрировали, что пациенты с ФЛ могут быть разделены на подгруппы в соответствии с выявленными мутациями подобно ДВККЛ [66]. Мы показали, что мутации в гене *ARID1A* сопряжены с худшим прогнозом в анализе ВБП и БСВ по сравнению с группой дикого типа, ОР составил 4,630 (95% ДИ: 1,205–17,793), $p = 0,026$ и 3,940 (95% ДИ: 1,045–14,856), $p = 0,043$ соответственно. Однако в исследовании по m7-FLIPI с включением 154 пациентов ОР мутации гена *ARID1A* равнялся 0,40 (95% ДИ: 0,16–0,996), $p = 0,049$ [183]. Подобное расхождение в результатах, с одной стороны, может быть обусловлено малым размером выборки (n = 26). С другой стороны, известно, что ген *ARID1A* действует как супрессор опухоли, регулирует транскрипцию генов, участвует в реакции на повреждение ДНК и оказывает влияние на иммунное опухолевое микроокружение. Мутации с потерей функции гена *ARID1A* ассоциированы с онкогенезом, включая процессы пролиферации, инвазивности и метастазирования [248]. В другом исследовании с включением 113 пациентов с ФЛ авторы

показали, что наличие мутации в гене *ARID1A* не влияет на ВБП, в то время как мутации гена *CREBBP* достоверно ухудшают прогноз согласно анализу двухлетней ВБП (ОР = 2,68, p = 0,0344) [127]. В нашем исследовании не было выявлено межгрупповых статистически значимых различий в зависимости от мутационного статуса гена *CREBBP*. Таким образом, высокая частота мутаций в генах, участвующих в модификации гистонов (в том числе *EZH2, KMT2C, EP300* и др.) при ФЛ является существенным доказательством того, что эпигенетическая дисрегуляция в В-клетках ГЦ представляет собой ключевой аспект патогенеза ФЛ, однако прогностическая роль некоторых генов требует дальнейших уточнений.

С внедрением NGS в клиническую практику появилась потребность в поиске унифицированного показателя, отражающего прогностическую совокупность всех мутаций, возникающих в опухоли. Одним из таких параметров является ТМВ. Так в 2015 г. впервые у пациентов с немелкоклеточным раком легкого было продемонстрировано, что больные с высокой ТМВ лучше реагируют на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек (иИКТ) в сравнении с пациентами с низкой ТМВ [194]. Позже было установлено, что экспрессия неоантигенов положительно коррелирует с ТМВ, объясняя лучшую эффективность иИКТ у пациентов с высокой ТМВ [92]. В настоящий момент четко не определен алгоритм оценки ТМВ. При различных видах опухолей применяются разные методы: от расчета количества всех выявленных мутаций до определения удельного веса соматических мутаций (отношение количества мутаций к длине кодирующей последовательности). К настоящему времени опубликовано только одно исследование с включением 300 различных НХЛ, в том числе 29 пациентов с ФЛ [58], у которых была оценена ТМВ с использованием таргетной панели из 405 генов, высокоспецифичных для различных типов НХЛ. В исследовании рассчитывалось общее количество однонуклеотидных вариантов и Indel (инсерции и делеции), медиана которых у пациентов с ФЛ составила 18 (диапазон 8–35). Авторами было показано, что ФЛ 3А–3В цитологического типа характеризуется более высокой ТМВ (p = 0,013) по сравнению с ФЛ 1–2 цитологического типа и по данному показателю соответствует таковой при ДВККЛ (p = 0,973).

В нашем исследовании оценка ТМВ проводилась в расчете на длину кодирующей последовательности. Мы использовали панель из 118 генов, мутации которых высокоспецифичны для ЛПН. Длина всех экзонов исследуемых генов равнялась 602917 пар оснований или 0,603 Mb. Медиана ТМВ составила 5,0 мутаций/Mb. С помощью ROC-анализа мы определили классификационный порог для ТМВ, равный 6,0 мутаций/Mb и распределяющий пациентов на две группы: больные с низкой (n = 14) и высокой (n = 12) ТМВ. Нами было показано, что у пациентов с высокой ТМВ достоверно более худший прогноз по результатам анализа двухлетней БСВ (p = 0,037). Также отмечалась аналогичная тенденция в анализе двухлетней ОВ, однако различия не достоверны (p = 0,098). Таким образом, нами был определен

алгоритм расчета TMB у пациентов с ФЛ и доказана ее прогностическая значимость. В отличие от ранее опубликованных исследований [72, 180], в которых порог количества мутаций определялся в соответствии со средним значением, медианой или в соответствии с риском, в нашем исследовании использовался ROC-анализ, который является общепризнанным инструментом бинарной классификации, что исключает субъективизм исследователя (так как нет оснований полагать, что средняя или медиана реально могут отражать пороговое значение TMB). И в то же время наше исследование имеет несколько ограничений. Во-первых, малый размер выборки (n = 26), во-вторых – использование таргетной панели, содержащей 118 генов вместо полногеномного секвенирования. Применение таргетных панелей может не отражать реальную мутационную нагрузку, так как в анализ включаются гены, мутации в которых будут характерны для конкретной нозологии. Также, в настоящее время отсутствует консенсус в отношении алгоритма расчета TMB при таргетном секвенировании: различные наборы генов и методы определения порога мутаций. Однако, не смотря на указанные ограничения, нами, а также другими исследователями, однозначно показано, что высокая TMB является значимым прогностическим фактором, в том числе и при ФЛ.

Первое исследование, в котором была описана методика GSEA на основании данных полноэкзомного секвенирования, было опубликовано в 2005 г. [221]. С тех пор технология секвенирования стала значительно эффективнее и доступнее, что инициировало работы по поиску наиболее вовлеченных клеточных путей в патогенез различных онкологических заболеваний, в том числе и при лимфомах. Несмотря на небольшой объем выборки (n = 26), на основании данных о мутациях 23 генов нами было определено более 250 различных клеточных процессов (базы данных Gene Ontology (GO) Biological Processes, KEGG Pathway, Reactome Gene Sets, Canonical Pathways и WikiPathways) с вовлечением 3 и более генов, что имело статистическую значимость с учетом поправки на множественные сравнения. Мы показали, что у пациентов с ФЛ наиболее часто наблюдаются аберрации в пути регуляции клеточной активации и экспрессии генов, а также в общих сигнальных путях при раке.

В соответствии с полученными результатами путь JAK-STAT имеет высокую степень обогащения при ФЛ, однако сообщений о вовлечении данного сигнального пути в патогенез ФЛ нами найдено не было. С другой стороны, имеются косвенные доказательства, показывающие, что при ФЛ высокая активность гена *KMT2D*, приводящая к метилированию гистонов H3K4, нарушает экспрессию большого числа генов, включая гены JAK-STAT пути [179]. Мутации, приводящие к потере функции гена *SOCS1,* и делеции *PTPN2* также могут приводить к нарушению регуляции JAK-STAT пути при ФЛ, о чем было сообщено ранее [167]. Мы показали, что мутации генов *MYC*, *CREBBP*, *EZH2* и *KMT2D* у больных ФЛ имеют наибольшую патогенетическую значимость, так как аберрации указанных генов могут приводить

к нарушению передачи сигнала в большинстве внутриклеточных сигнальных каскадах. Таким образом, изучение аберраций внутриклеточных сигнальных путей, участвующих в онкогенезе, расширяет наши представления о патогенетических механизмах, лежащих в основе биологии лимфом, а поиск новых молекулярных мишеней может привести к разработке более эффективных таргетных методов лечения.

Объем опухолевой массы, оцененный по сумме произведений перпендикулярных диаметров 6 таргетных очагов в дебюте заболевания, в соответствии с полученными результатами, не имеет прогностического значения (p = 0,94). Однако по данным литературы, TMTV является значимым прогностическим фактором при ФЛ в отношении ОВ и ВБП [64, 147]. С одной стороны, расхождение результатов может быть обусловлено различными методами оценки объема опухолевой массы (мы измеряли 6 наиболее крупных очагов), с другой – малым объемом выборки (SPD в дебюте был оценен у 113 больных) и неоднородностью исследуемой группы пациентов.

Экспрессия Bcl-2 и интенсивность экспрессии Bcl-2 по данным литературы не являются значимыми прогностическими показателями для ОВ и ВБП при ФЛ [139], однако нами продемонстрировано, что у пациентов с экспрессией Bcl-2 прогноз достоверно лучше, что выражается в более низкой частоте ПЗ (p = 0,025) и более высокой ЧОО (p = 0,004), однако в анализе пятилетней ВБП различия были статистически недостоверными (p = 0,183).

По результатам нашего исследования повышение сывороточного уровня β2-МГ отмечалось у 84,7% пациентов, причем медиана составила 5,18 мг/л, что значительно превышает верхнюю границу референтного интервала (2,64 мг/л). Согласно данным крупных международных исследований [78, 79, 217] превышение β2-МГ верхней границы нормы отмечается у 35–42% пациентов с ФЛ. Большая доля (84,7%) повышенных уровней β2-МГ в нашем исследовании может быть обусловлена относительно высокой частотой (29,8%) пациентов с низкодифференцированной ФЛ (3А и 3В цитологический тип), так как по данным международных исследований чаще отмечается выявление данной особенности при злокачественных лимфомах [243]. Мы показали, что в отношении пятилетних ОВ и ВБП значение β2-МГ, равное 4,59 мг/л, является прогностически значимым, по сравнению со значением, равным верхней границе референтного интервала. Учитывая данные обстоятельства, а также тот факт, что применяемые в настоящее время прогностические индексы для ФЛ не продемонстрировали устойчивых результатов классификации на представленной выборке пациентов, нами была предпринята попытка модифицировать FLIPI-2, используя более дифференцированную систему начисления баллов в зависимости от уровня β2-МГ: 0–2,64 мг/л – 0 баллов, 2,65–4,58 мг/л – 0,5 баллов, ≥ 4,59 мг/л – 1 балл. Модифицированный FLIPI-2 (FLIPI-2 mod.) продемонстрировал более качественную стратификационную способность в виде строгого

разделения пациентов на 2 группы риска в сравнении со стандартной моделью. Особенностью модифицированного индекса является увеличение доли пациентов с высоким риском за счет группы пациентов с промежуточным риском (63,6% против 36,4%, p < 0,001). Также по данным ROC-анализа модифицированный FLIPI-2 mod. обладает наибольшим значением AUC в анализе пятилетней ВБП (0,695) в сравнении с другими тестируемыми моделями, в том числе со стандартным FLIPI-2 (0,624). Модифицированный индекс характеризуется высокой прогностической способностью также в отношении пятилетних ОВ (p < 0,0001), ВБР (p = 0,0062) и БСВ (p = 0,00025). Насколько нам известно, это первая подобная попытка модификации FLIPI-2, однако ранее предпринимались шаги по улучшению прогностической способности других индексов. В 2008 г. был предложен расширенный FLIPI с более дифференцированным кодированием возраста пациентов [207], однако модель не прошла валидацию и широко не применяется в клинической практике. Таким образом, полученный прогностический индекс (FLIPI-2 mod.) является чрезвычайно простым и воспроизводимым прогностическим инструментом у пациентов с ФЛ, основанным на легкодоступных клинических параметрах.

В анализ сравнения эффективности режимов ИХТ R-CHOP против RB было включено 72 и 45 пациентов соответственно (n = 117). По результатам анализа выживаемости отмечалась тенденция к улучшению эффективности лечения при использовании режима R-CHOP по сравнению с RB, также первый вариант терапии характеризовался большей длительностью ЧО и высокой ЧОО, что в конечном итоге делает его предпочтительным у пациентов из группы высокого риска. Полученные результаты согласуются с данными недавно опубликованного исследования, в котором авторы продемонстрировали более высокую эффективность R-CHOP в достижении ПО и снижении риска гистологической трансформации в сравнении с RB у больных ФЛ с высоким показателем стандартного значения поглощения (SUV) в дебюте заболевания [160]. В многоцентровом рандомизированном исследовании III фазы StiL NHL1 по сравнению эффективности RB и R-CHOP было показано, что RB превосходит R-CHOP по ВБП. При медиане наблюдения 45 месяцев ВБП составила 69 месяцев в группе RB и 31 месяц в группе R-CHOP (p < 0,0001), при этом частота ПО была значительно выше у пациентов, получающих RB (40% против 30%, p = 0,021) [200]. По данным другого международного рандомизированного исследования III фазы BRIGHT различий в эффективности обоих режимов ИХТ получено не было. При медиане наблюдения 5 лет ВБП составила 70% и 62% (p = 0,05) для RB и R-CHOP соответственно, ОВ не различалась между группами [82].

Нами было показано, что поддерживающая терапия анти-CD20-МКАТ (преимущественно оценивалась поддержка ритуксимабом) каждые 2 месяца в течение 2 лет достоверно улучшает прогноз у пациентов с ФЛ в независимости от варианта индукционной терапии. Аналогичные результаты ранее были опубликованы в исследовании PRIMA [203]. Авторы показали значимое

улучшение выживаемости у пациентов с высокой опухолевой массой после индукционной терапии R-CHOP или R-CVP. В многоцентровом исследовании, в котором оценивалась эффективность поддерживающей терапии ритуксимабом по сравнению с наблюдением после терапии первой линии по схеме RB, поддерживающая терапия была связана со значительным улучшением ВБП только у пациентов, достигших ЧО, но не у больных, достигших ПО [102]. По нашим данным улучшение пятилетней БСВ после RB отмечалось в независимости от варианта полученного ответа.

Так как одной из задач исследования являлась разработка алгоритма терапии первой линии пациентов с ФЛ и в связи с тем, что в 2022 г. в соответствии с ICC была отдельно выделена *BCL2*-негативная и CD23-позитивная ФЛ, необходимо было оценить течение и прогноз данного варианта лимфомы. В группу *BCL2*–CD23+ вошло 40 пациентов, в контрольную группу – 55 больных (n = 95). Для *BCL2*-негативной и CD23-позитивной ФЛ характерны нераспространенные стадии заболевания (более низкая частота IV стадии, p = 0,033). Также нами впервые было показано, что у пациентов из группы *BCL2*–CD23+ имеется тенденция к более низкой ТМВ, по сравнению с контрольной группой (22,2% против 77,8% соответственно, p = 0,208) и достоверно более высокая частота мутаций гена *RYR1,* p = 0,037. В литературе описывается высокая частота мутаций гена *STAT6* и комутаций с геном *KMT2D* [238], однако, по причине малой выборки (NGS оценивалось только у 26 пациентов), мутация гена *STAT6* была выявлена у одного пациента, в связи с чем дальнейший анализ не проводился. Нами было показано, что у пациентов с *BCL2*-негативной и CD23-позитивной ФЛ нет преимуществ в использовании режима R-CHOP против RB, p > 0,6. Таким образом, основываясь на собственных данных, а также принимая во внимание действующие в настоящий момент отечественные и международные клинические рекомендации по диагностике и лечению ФЛ, нами был разработан алгоритм терапии некоморбидных пациентов с ФЛ возрастом до 70 лет. Мы не стали рассматривать группу пожилых пациентов, так как в исследуемую выборку было включено только 19 больных старше 70 лет. Также разработанный алгоритм не распространяется на пациентов с выраженной коморбидной патологией (значимая коморбидность в общей выборке с суммой баллов ≥ 4 по шкале Charlson отмечалась у 10,5% пациентов). Принципиальным отличием разработанного алгоритма является выделение пациентов с 3А цитологическим типом в отдельную группу, у которых режим терапии R-CHOP продемонстрировал достоверно лучшую эффективность по сравнению с RB (p = 0,015). Второй особенностью является определение наличия транслокации t(14;18), так как у t(14;18)-позитивных больных эффективность режима R-CHOP достоверно выше, чем RB (p = 0,0013). Мы также рекомендуем проведение поддерживающей терапии анти-CD20-МКАТ после достижении объективного ответа в первой линии терапии, так как данная опция достоверно улучшает прогноз у пациентов с ФЛ.

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 4 раза и более ($p < 0,03$).

2. Наибольшая частота мутаций выявлена в генах *KMT2C*, *KMT2D*, *CREBBP*, 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 значимым неблагоприятным прогностическим фактором у пациентов с фолликулярной лимфомой ($p = 0,037$).

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 в независимости 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 особенностью которого является определение наличия транслокации t(14;18), обуславливающей выбор и влияющей на эффективность стандартных программ 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 для 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 3А 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БСВ –бессобытийная выживаемость

ВБП – выживаемость без прогрессирования

ВБР – выживаемость без рецидива

ГЦ – герминальный центр

ДВККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома

ДИ – доверительный интервал

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ИХТ – иммунохимиотерапия

ИМТ – индекс массы тела

ИФТ – иммунофенотипирование

КМ – костный мозг

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛПН – лимфопролиферативное новообразование

МКАТ – моноклональное антитело

НХЛ – неходжкинская лимфома

НЯ – нежелательное явление

ОВ – общая выживаемость

ОР – относительный риск

ОШ – отношение шансов

ПЗ – прогрессирование заболевания

ПО – полный ответ

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

р/р – рефрактерный и/или рецидивирующий

СИ – селезеночный индекс

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

ФЛ – фолликулярная лимфома

ЧО – частичный ответ

ЧОО – частота объективных ответов

AUC – area under curve (площадь под кривой)

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group (Восточная Кооперативная Онкологическая группа)

FCG – FLIPI, Charlson comorbidity index, and histological grade (FLIPI, индекс коморбидности Чарлсона и гистологический тип)

FDA – U.S. Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США)

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

FLEX – follicular lymphoma evaluation index (индекс оценки фолликулярной лимфомы)

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

GELF – Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires (Группа по изучению фолликулярной лимфомы)

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

Mb – Megabase (Мегабаза)

NGS – next generation sequencing (секвенирование следующего поколения)

POD24 – progression of disease within 2 years (прогрессирование заболевания в течение 2 лет)

PRIMA-PI – PRIMA-Prognostic Index (прогностический индекс PRIMA)

ROC – receiver operating characteristic (рабочая характеристика приемника)

SPD – sum of the product of perpendicular diameters (сумма произведений перпендикулярных диаметров)

TMB – tumor mutation burden (опухолевая мутационная нагрузка)

VAF – variant allele frequency (частота встречаемости аллеля)

β2-МГ – бета-2-микроглобулин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончарова, О.В. Оценка распространенности неходжкинских лимфом / О.В. Гончарова, О.Н. Липатов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2009. – Т. 4, № 1. – С. 25–28.

2. Горбунова, А.В. Экспрессия генов в опухоли и ее микроокружении при фолликулярной лимфоме / А.В. Горбунова, Ю.А. Криволапов, Е.С. Божокина и др. // Цитология. – 2021. – Т. 63, № 3. – С. 237–243.

3. Криволапов, Ю.А. Морфологическая диагностика лимфом / Ю.А. Криволапов, Е.Е. Леенман // СПб.: КОСТА, 2006. – 208 с.

4. Куневич, Е.О. Частота встречаемости и прогностическая значимость мутаций гена EZH2 у больных фолликулярной лимфомой / Е.О. Куневич, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич и др. // Вестник гематологии. – 2022. – Т. 18, № 2. – С. 63.

5. Мисюрина, А.Е. Подходы к лечению фолликулярной лимфомы с реаранжировками C-MYC, BCL-2 и/или BCL-6 / А.Е. Мисюрина, С.К. Кравченко, Л.В. Пластинина и др. // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63, № S1. – С. 80.

6. Мисюрина, А.Е. Роль транслокаций с участием локусов генов C-MYC/8Q24, BCL2/18Q21 и/или BCL6/3Q27 у больных фолликулярной лимфомой. Ретроспективный анализ данных одноцентрового исследования / А.Е. Мисюрина, С.К. Кравченко, А.М. Ковригина и др. // Терапевтический архив. – 2019. – Т. 91, № 7. – С. 54–66.

7. Нестерова, Е.С. Итоги десятилетнего опыта лечения больных фолликулярной лимфомой / Е.С. Нестерова, С.К. Кравченко, Э.Г. Гемджян и др. // Гематология и трансфузиология. – 2012. – Т. 57, № 5. – С. 3–8.

8. Нестерова, Е.С. Определение соматических мутаций в гене EZH2 и оценка их прогностической значимости при фолликулярной лимфоме 1–3А цитологического типа / Е.С. Нестерова, Н.А. Северина, Б.В. Бидерман и др. // Клиническая онкогематология. – 2023. – Vol. 16, № 1. – P. 80–87.

9. Нестерова, Е.С. Фолликулярная лимфома: критерии выбора терапии первой линии / Е.С. Нестерова, С.К. Кравченко, А.М. Ковригина и др. // Терапевтический архив. – 2019. – Т. 91, № 8. – С. 75–83.

10. Нестерова, Е.С. Фолликулярная лимфома: результаты многоцентрового исследования терапии первой линии препаратами бендамустин и ритуксимаб, факторы риска неблагоприятных событий (протокол fl-rus-2013) / Е.С. Нестерова, С.К. Кравченко, Ф.М. Ковригина и др. // Онкогематология. – 2013. – Т. 13, №3. – С. 10–24.

11. Пластинина, Л.В. Фолликулярная лимфома 3-го цитологического типа: de novo и трансформированный варианты заболевания (собственные данные) / Л.В. Пластинина, А.М. Ковригина Т.Н. Обухова и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2017. – Т. 10, № 4. – С. 453–463.

12. Рукавицын, О.А. Гематология: Национальное руководство / под ред. О.А. Рукавицына. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 784 с.

13. Рыжкова, О.П. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) / О.П. Рыжкова, О.Л. Кардымон, Е.Б. Прохорчук и др. // Медицинская генетика. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 3–23.

14. Северина, Н.А. Мутации гена EZH2 и реаранжировка гена BCL-2 при фолликулярной лимфоме / Н.А. Северина, Е.С. Нестерова, Б.В. Бидерман и др. // Вестник гематологии. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 76–76.

15. Сычевская, К.А. Микросателлитная нестабильность (MSI, EMAST) в патогенезе фолликулярной лимфомы / К.А. Сычевская, С.К. Кравченко, Н.В. Рисинская и др. // Онкогематология. – 2021. – Т. 16, № 2. – С. 56–69.

16. Сычевская, К.А. Нестабильность микросателлитов и мутации генов иммуноглобулинов в дебюте и рецидиве/прогрессии фолликулярной лимфомы / К.А. Сычевская, С.К. Кравченко, Б.В. Бидерман и др. // Вестник гематологии. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 81.

17. Тумян, Г. С. Фолликулярная лимфома: современные тенденции и мой выбор / Г.С. Тумян // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 20–33.

18. Тумян, Г.С. Фолликулярная лимфома: 10 лет терапии / Г.С. Тумян, А.А. Леонтьева, Н.А. Фалалеева и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2012. – Т. 5, №3. – С. 204–213.

19. Тупицын, Н.Н. Роль костного мозга в прогнозе фолликулярной лимфомы / Н.Н. Тупицын, Н.А. Фалалеева, А.В. Моженкова, А.И. Павловская // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 99–102.

20. Фалалеева, Н.А. Рефрактерное течение фолликулярной лимфомы и короткие сроки жизни больных в эру препаратов направленного действия. В чем причина? / Н.А. Фалалеева // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 79–86.

21. Фалалеева, Н.А. Роль иммунологических и гематологических показателей в патогенезе и прогнозе фолликулярной лимфомы / Н.А. Фалалеева // Иммунология гемопоэза. – 2017. – Т. 15, № 1. – С. 68–97.

22. Фалалеева, Н.А. Сравнение эффективности иммунохимиотерапии и химиотерапии при фолликулярной лимфоме / Н.А. Фалалеева // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 24–31.

23. Advani, R. CD47 blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin's lymphoma / R. Advani, I. Flinn, L. Popplewell et al. // The New England Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 379, № 18. – P. 1711–1721.

24. Alig, S. Impact of age on clinical risk scores in follicular lymphoma / S. Alig, V. Jurinovic, A. Pastore et al. // Blood Advances. – 2019. – Vol. 3, №7. – P. 1033–1038.

25. Ame-Thomas, P. Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells / P. Ame-Thomas, J. Le Priol, H. Yssel et al. // Leukemia. – 2012. – Vol. 26, № 5. – P. 1053–1063.

26. Ambinder, A.J. Exploring risk factors for follicular lymphoma / A.J. Ambinder, P.J. Shenoy, N. Malik et al. // Advances in Hematology. – 2012. – ID: 626035.

27. Andorsky, D.J. An open-label phase 2 trial of entospletinib in indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma / D.J. Andorsky, K.S. Kolibaba, S. Assouline et al. // British Journal of Haematology. – 2019. – Vol. 184. – P. 215–222.

28. Assouline, S.E. Mosunetuzumab shows promising efficacy in patients with multiply relapsed follicular lymphoma: Updated clinical experience from a phase I dose-escalation trial / S.E. Assouline, W.S. Kim, L.H. Sehn et al. // Blood. – 2020. – Vol. 136. – P. 42–44.

29. Bachy, E. A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy / E. Bachy, M.J. Maurer, T.M. Habermann et al. // Blood. – 2018. – Vol. 132, № 1. – P. 49–58.

30. Bader, G.D. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks / G.D. Bader, C.W.V. Hogue // BMC Bioinformatics. – 2003. – Vol. 4:2.

31. Bannerji, R. Odronextamab (REGN1979), a human CD20 x CD3 bispecific antibody, induces durable, complete responses in patients with highly refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma, including patients refractory to CAR-T therapy / R. Bannerji, J.N. Allan, J.E. Arnason et al. // Blood. – 2020. – Vol. 136. – P. 42–43.

32. Barrington, S.F. Baseline PET-derived metabolic tumor volume metrics did not predict outcomes in follicular lymphoma patients treated with first-line immunochemotherapy and antibody maintenance in the phase III GALLIUM study / S.F. Barrington, J. Trotman, D. Sahin et al. // Blood. – 2018. – Vol. 132, Suppl. 1. – P. 2882.

33. Barrington, S.F. The role of PET in the first-line treatment of the most common subtypes of non-Hodgkin lymphoma / S.F. Barrington, J. Trotman // The Lancet Haematology. – 2021. – Vol. 8, № 1. – P. e80–e93.

34. Barrington, S.F. Time to prepare for risk adaptation in lymphoma by standardizing measurement of metabolic tumor burden / S.F. Barrington, M. Meignan // The Journal of Nuclear Medicine. – 2019. – Vol. 60, № 8. – P. 1096–1102.

35. Bartlett, N.L. Single-agent ibrutinib in relapsed or refractory follicular lymphoma: A phase 2 consortium trial / N.L. Bartlett, B.A. Costello, B.R. LaPlant et al. // Blood. – 2018. – Vol. 131. – P. 182–190.

36. Batlevi, C.L. A phase 2 study of mocetinostat, a histone deacetylase inhibitor, in relapsed or refractory lymphoma / C.L. Batlevi, M. Crump, C. Andreadis et al. // British Journal of Haematology. – 2017. – Vol. 178. – P. 434–441.

37. Batlevi, C.L. Follicular lymphoma in the modern era: survival, treatment outcomes, and identification of high-risk subgroups / C.L. Batlevi, F. Sha, A. Alperovich et al. // Blood Cancer Journal. – 2020. – Vol. 10, № 7. – P. 74.

38. Beguelin, W. EZH2 and BCL6 cooperate to assemble CBX8-BCOR complex to repress bivalent promoters, mediate germinal center formation and lymphomagenesis / W. Béguelin, M. Teater, M.D. Gearhart et al. // Cancer Cell. – 2016. – Vol. 30. – P. 197–213.

39. Beguelin, W. EZH2 enables germinal centre formation through epigenetic silencing of CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop / W. Beguelin, M.A. Rivas, M.T.C. Fernandez et al. // Nature Communications. – 2017. – Vol. 8. – P. 877.

40. Beguelin, W. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation / W. Béguelin, R. Popovic, M. Teater et al. // Cancer Cell. – 2013. – Vol. 23. – P. 677–992.

41. Beguelin, W. Mutant EZH2 induces a pre-malignant lymphoma niche by reprogramming the immune response / W. Beguelin, M. Teater, C. Meydan et al. // Cancer Cell. – 2020. – Vol. 37, № 5. – P. 655–673.

42. Biagi, J.J. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation / J.J. Biagi, J.F. Seymour // Blood. – 2002. – Vol. 99. – P. 4265–4275.

43. Bodor, C. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma / C. Bodor, V. Grossmann, N. Popov et al. // Blood. – 2013. – Vol. 122, № 18. – P. 3165–3168.

44. Bodor, C. EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma / C. Bodor, C. O'Riain, D. Wrench et al. // Leukemia. – 2011. – Vol. 25, № 4. – P. 726–729.

45. Bouska, A. Combined copy number and mutation analysis identifies oncogenic pathways associated with transformation of follicular lymphoma / A. Bouska, W. Zhang, Q. Gong et al. // Leukemia. – 2017. – Vol. 31, № 1. – P. 83–91.

46. Boyer, L.A. The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? / L.A. Boyer, R.R. Latek, C.L. Peterson // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2004. – Vol. 5. – P. 158–163.

47. Brahmer, J.R. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer / J.R. Brahmer, S.S. Tykodi, L.Q.M. Chow et al. // The New England Journal of Medicine. – 2012. – Vol. 366. – P. 2455–2465.

48. Brice, P. Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte / P. Brice, Y. Bastion, E. Lepage et al. // Journal of Clinical Oncology. – 1997. – Vol. 15, № 3. – P. 1110–1117.

49. Brooun, A. Polycomb repressive complex 2 structure with inhibitor reveals a mechanism of activation and drug resistance / A. Brooun, K.S. Gajiwala, Y.L. Deng et al. // Nature Communications. – 2016. – Vol. 7. – P. 11384.

50. Burack, R. Subclonal mutations of TP53 are common in untreated follicular lymphoma and mutation status is predictive of PFS when CHOP is combined with 131-Iodine tositumomab but not with rituximab: An analysis of SWOG S0016 / R. Burack, H. Li, J.M. Spence et al. // Blood. – 2018. – Vol. 132, Suppl. 1. – P. 919.

51. Buske, C. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) with respect to treatment outcome / C. Buske, E. Hoster, M. Dreyling et al. // Blood. – 2006. – Vol. 108, № 5. – P. 1504–1508.

52. Campo, E. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee / E. Campo, E.S. Jaffe, J.R. Cook et al. // Blood. – 2022. – Vol. 140, № 11. – P. 1229–1253.

53. Casulo, C. Early relapse of follicular lymphoma after rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone defines patients at high risk for death: an analysis from the National LymphoCare Study / C. Casulo, M. Byrtek, K.L. Dawson et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2015. – Vol. 33, № 23. – P. 2516–2522.

54. Cerhan, J.R. Epidemiology of follicular lymphoma / J.R. Cerhan // Hematology/Oncology Clinics of North America. – 2020. – Vol. 34, № 4. – P. 631–646.

55. Charlson, M.E. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation / M.E. Charlson, P. Pompei, K.L. Ales, C.R. McKenzie // Journal of Chronic Diseases. – 1987. – Vol. 40, № 5. – P. 373–383.

56. Cheson, B.D. Overall survival benefit in patients with rituximab-refractory indolent non-hodgkin lymphoma who received obinutuzumab plus bendamustine induction and obinutuzumab

maintenance in the GADOLIN Study / B.D. Cheson, N. Chua, J. Mayer et al. // Journal of Clininical Oncology. – 2018. – Vol. 36. – P. 2259–2266.

57. Cheson, D.B. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: The Lugano classification / D.B. Cheson, R.I. Fisher, S.F. Barrington et al. // Journal Clinical Oncology. – 2014. – Vol. 32, № 27. – P. 3059–3067.

58. Cho, J. Comparison of tumor mutation burden of 300 various non-Hodgkin lymphomas using panel based massively parallel sequencing / J. Cho, S.E. Yoon, S.J. Kim et al. // BMC Cancer. – 2021. – Vol. 21. – P. 972.

59. Choy, J.S. DNA methylation increases nucleosome compaction and rigidity. / J.S. Choy, S. Wei, J.Y. Lee et al. // Journal of the American Chemical Society. – 2010. – Vol. 132, № 6. – P. 1782–1783.

60. Chu, L. EZH2 W113C is a gain-of-function mutation in B-cell lymphoma enabling both PRC2 methyltransferase activation and tazemetostat resistance / L. Chu, D. Tan, M. Zhu et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2023. – Vol. 299, № 4. – 103073.

61. Clozel, T. Mechanism-based epigenetic chemosensitization therapy of diffuse large B-cell lymphoma / T. Clozel, S.N. Yang, R.L. Elstrom et al. // Cancer Discovery. – 2013. – Vol. 3. – P. 1002–1019.

62. Coffey, G. The novel kinase inhibitor PRT062070 (Cerdulatinib) demonstrates efficacy in models of autoimmunity and B-cell cancer / G. Coffey, A. Betz, F. DeGuzman et al. // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2014. – Vol. 351. – P. 538.

63. Correia, C. BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma / C. Correia, P.A. Schneider, H. Dai et al. // Blood. – 2015. – Vol. 125, № 4. – P. 658–667.

64. Cottereau, A.S. Prognostic model for high-tumor-burden follicular lymphoma integrating baseline and end-induction PET: a LYSA/FIL study / A.S. Cottereau, A. Versari, S. Luminari et al. // Blood. – 2018. – Vol. 131, № 22. – P. 2449–2453.

65. Cotterman, R. N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor / R. Cotterman, V.X. Jin, S.R. Krig et al. // Cancer Research. – 2008. – Vol. 68, № 23. – P. 9654–9662.

66. Crouch, S. Molecular subclusters of follicular lymphoma: a report from the United Kingdom’s Haematological Malignancy Research Network / S. Crouch, D. Painter, S.L. Barrans et al. // Blood Advances. – 2022. – Vol. 6, № 21. – P. 5716–5731.

67. Dave, S.S. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells / S.S. Dave, G. Wright, B. Tan et al. // The New England Journal of Medicine. – 2004. – Vol. 351, № 21. – P. 2159–2169.

68. Davids, M.S. Phase I first-in- human study of venetoclax in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma / M.S. Davids, A.W. Roberts, J.F. Seymour et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2017. –Vol. 35, № 8. – P. 826–833.

69. Davids, M.S. Targeting Bcl-2 in B-cell lymphomas / M.S. Davids / Blood. – 2017. – Vol. 130, № 9. – P. 1081–1088.

70. Delfau-Larue, M-H. Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: distinct prognostic value in follicular lymphoma / M-H. Delfau-Larue, A. van der Gucht, J. Dupuis et al. // Blood Advances. – 2018. – Vol. 2, № 7. – P. 807–816.

71. Devan, J. New concepts in follicular lymphoma biology: From BCL2 to epigenetic regulators and non-coding RNAs / J. Devan, A. Janikova, M. Mraz // Seminars in Oncology. – 2018. – Vol. 45, № 5-6. – P. 291–302.

72. Devarakonda, S. Tumor mutation burden as a biomarker in resected non–small-cell lung cancer / S. Devarakonda, F. Rotolo, M.-S. Tsao et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2018. – Vol. 36, № 30. – P. 2995–3006.

73. Dreyling, M. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by copanlisib in relapsed or refractory indolent lymphoma / M. Dreyling, A. Santoro, L. Mollica et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2017. – Vol. 35. – P. 3898–3905.

74. Dubovsky, J.A. Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes / J.A. Dubovsky, K.A. Beckwith, G. Natarajan et al. // Blood. – 2013. – Vol. 122. – P. 2539–2549.

75. Ehrlich, P. Experimental researches on specific therapy / P. Ehrlich // The Collected Papers of Paul Ehrlich, Elsevier. – 1960. – P. 106–117.

76. Elgueta, R. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system / R. Elgueta, M.J. Benson, V.C. de Vries et al. // Immunological Reviews. – 2009. – Vol. 229. – P. 152–172.

77. Engelberts, P.J. DuoBody-CD3xCD20 induces potent T-cell-mediated killing of malignant B cells in preclinical models and provides opportunities for subcutaneous dosing / P.J. Engelberts, I.H. Hiemstra, B. de Jong et al. // EBioMedicine. – 2020. – Vol. 52. – ID: 102625.

78. Federico, M. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project / M. Federico, M. Bellei, L. Marcheselli et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2009. – Vol 27, № 27. – P. 4555–4562.

79. Federico, M. Prognostic relevance of serum beta2 microglobulin in patients with follicular lymphoma treated with anthracycline-containing regimens. A GISL study / M. Federico, C. Guglielmi, S. Luminari et al. // Haematologica. – 2007. – Vol. 92. – P. 1482–1488.

80. Flinn, I.W. First-line treatment of iNHL or MCL patients with BR or R-CHOP/R-CVP: results of the BRIGHT 5-year follow-up study / I. Flinn, Rvd. Jagt, J.E. Chang et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2017. – Vol. 35, Suppl. 15. – P. 7500.

81. Flinn, I.W. DYNAMO: a phase II study of duvelisib (IPI-145) in patients with refractory indolent non-hodgkin lymphoma / I.W. Flinn, C.B. Miller, K.M. Ardeshna et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2019. – Vol. 37. – P. 912–922.

82. Flinn, I.W. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study / I.W. Flinn, R. vd Jagt, B.S. Kahl et al. // Blood. – 2014. – Vol. 123, № 19. – P. 2944–2952.

83. Fodale, V. Mechanism of cell adaptation: When and how do cancer cells develop chemoresistance? / V. Fodale, M. Pierobon, L. Liotta, E. Petricoin // Cancer. – 2011. – Vol. 17. – P. 89–95.

84. Fowler, N.H. Acalabrutinib alone or in combination with rituximab (R) in follicular lymphoma (FL) / N.H. Fowler, M. Coleman, D.A. Stevens et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2018. – Vol. 36. – P. 7549.

85. Fowler, N.H. Efficacy and safety of tisagenlecleucel in adult patients with relapsed/refractory follicular lymphoma: interim analysis of the phase 2 Elara trial / N.H. Fowler, M. Dickinson, M. Dreyling et al. // Blood. – 2020. – Vol. 136. – P. 1–3.

86. Fowler, N.H. The combination of ibrutinib and rituximab demonstrates activity in first-line follicular lymphoma / N.H. Fowler, L. Nastoupil, S. De Vos et al. // British Journal of Haematology. – 2020. – Vol. 189. – P. 650–660.

87. Fruman, D.A. Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling / D.A. Fruman // Current Opinion in Immunology. – 2004. – Vol. 16, № 3. – P. 314–320.

88. Fukushima, N. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma / N. Fukushima, F. Itamura, C. Urata et al. // The New England Journal of Medicine. – 1993. – Vol. 329. – P. 987–994.

89. Gao, F. Prognostic value of peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio in lymphoma / F. Gao, J. Hu, J. Zhang, Y. Xu // Cancer. – 2021. – Vol. 12, № 12. – P. 3407–3417.

90. Garcia-Ramirez, I. CREBBP loss cooperates with BCL2 overexpression to promote lymphoma in mice / I. Garcia-Ramirez, S. Tadros, I. Gonzalez-Herrero et al. // Blood. – 2017. – Vol. 129, № 19. – P. 2645–2656.

91. Gibaja, V. Development of secondary mutations in wild-type and mutant EZH2 alleles cooperates to confer resistance to EZH2 inhibitors / V. Gibaja, F. Shen, J. Harari et al. // Oncogene. – 2016. – Vol. 35, № 5. – P. 558–566.

92. Goodman, A.M. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers / A.M. Goodman, S. Kato, L. Bazhenova et al. // Molecular Cancer Therapeutics. – 2017. – Vol. 16, № 11. – P. 2598–2608.

93. Goswami, S. Modulation of EZH2 expression in T-cells improves efficacy of anti-CTLA-4 therapy / S. Goswami, I. Apostolou, J. Zhang et al. // Journal of Clinical Investigation. – 2018. – Vol. 128. – P. 3813–3818.

94. Green, M.R. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma / M.R. Green // Blood. – 2018. – Vol. 131, № 6. – P. 595–604.

95. Green, M.R. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma / M.R. Green, A.J. Gentles, R.V. Nair et al. // Blood. – 2013. – Vol. 121, № 9. – P. 1604–1611.

96. Green, M.R. Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation / M.R. Green, S. Kihira, C.L. Liu et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2015. – Vol. 112, № 10. – P. e1116–e1125.

97. Grillo-Lopez, A.J. Rituximab: an insider's historical perspective / A.J. Grillo-Lopez // Seminars of Oncology. – 2000. – Vol. 27. – P. 9–16.

98. Guo, S. EZH2 mutations in follicular lymphoma from different ethnic groups and associated gene expression alterations / S. Guo, J.K.C. Chan, J. Iqbal // Clinical Cancer Research. – 2014. – Vol. 20, № 12. – P. 3078–3086.

99. Hashwah, H. Inactivation of CREBBP expands the germinal center B cell compartment, down-regulates MHCII expression and promotes DLBCL growth / H. Hashwah, C.A. Schmid, S. Kasser et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – Vol. 114, № 36. – P. 9701–9706.

100. He, S. Ezh2 phosphorylation state determines its capacity to maintain CD8(+) T memory precursors for antitumor immunity / S. He, Y. Liu, L. Meng et al. // Nature Communications. – 2017. – Vol. 8. – P. 2125.

101. He, S. Inhibition of histone methylation arrests ongoing graft-versus-host disease in mice by selectively inducing apoptosis of alloreactive effector T cells / S. He, J. Wang, K. Kato et al. // Blood. – 2012. – Vol. 119. – P. 1274–1282.

102. Hill, B.T. Maintenance rituximab or observation after frontline treatment with bendamustine-rituximab for follicular lymphoma / B.T. Hill, L. Nastoupil, A.M. Winter et al. // British Journal of Haematology. – 2019. – Vol. 184, № 4. – P. 524–535.

103. Hochberg, Y. More powerful procedures for multiple significance testing / Y. Hochberg, Y. Benjamini // Statistics in Medicine. – 1990. – Vol. 9, № 7. – P. 811–818.

104. Hockenberry, D. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks

programmed cell death / D. Hockenberry, G. Nunez, C. Milliman et al. // Nature. – 1990. – Vol. 348. – P. 334–336.

105. Hoglund, M. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas / M. Hoglund, L. Sehn, J.M. Connors et al. // Genes Chromosomes Cancer. – 2004. – Vol. 39. – P. 195–204.

106. Horning, S.J. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas / S.J. Horning, S.A. Rosenberg // The New England Journal of Medicine. – 1984. – Vol. 311. – P. 1471–1475.

107. Horsman, D.E. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma / D.E. Horsman, R.D. Gascoyne, R.W. Coupland et al. // The American Journal of Pathology. – 1995. – Vol. 103. – P. 472–478.

108. Huang, Y. Discovery of first-in-class, potent, and orally bioavailable embryonic ectoderm development (EED) inhibitor with robust anticancer efficacy / Y. Huang, J. Zhang, Z. Yu et al. // Journal of Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 60, № 6. – P. 2215–2226.

109. Huet, S. A gene-expression profiling score for prediction of outcome in patients with follicular lymphoma: a retrospective training and validation analysis in three international cohorts / S. Huet, B. Tesson, J-P. Jais et al. // The Lancet Oncology. – 2018. – Vol. 19, № 4. – P. 549–561.

110. Huet, S. BCL2 mutations do not confer adverse prognosis in follicular lymphoma patients treated with rituximab / S. Huet, E. Szafer-Glusman, B. Tesson et al. // American Journal of Hematology. – 2017. – Vol. 92, № 6. – P. 515–519.

111. Huet, S. EZH2 alterations in follicular lymphoma: biological and clinical correlations / S. Huet, L. Xerri, B. Tesson et al. // Blood Cancer Journal. – 2017. – Vol. 7, № 4. – P. e555.

112. Hutchings, M. Glofitamab step-up dosing induces high response rates in patients with hard-to-treat refractory or relapsed non-Hodgkin lymphoma / M. Hutchings, C. Carlo-Stella, E. Bachy et al. // Blood. – 2020. – Vol. 136. – P. 46–48.

113. Hutchings, M. Subcutaneous epcoritamab induces complete responses with an encouraging safety profile across relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma subtypes, including patients with prior CAR-T therapy: updated dose escalation data / M. Hutchings, R. Mous, M.R. Clausen et al. // Blood. – 2020. – Vol. 136, Suppl. 1. – P. 45–46.

114. Ikoma, H. Clinicopathological analysis of follicular lymphoma with BCL2, BCL6, and MYC rearrangements / H. Ikoma, M. Miyaoka, S. Hiraiwa et al. // Pathology International. – 2022. – Vol. 72, № 6. – P. 321–331.

115. Issa, M.E. Epigenetic strategies to reverse drug resistance in heterogeneous multiple myeloma / M.E. Issa, F.S. Takhsha, C.S. Chirumamilla // Clinical Epigenetics. – 2017. – Vol. 9. – P. 17.

116. Izutsu, K. Phase II study of tazemetostat for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma with EZH2 mutation in Japan / K. Izutsu, K. Ando, M. Nishikori et al. // Cancer Science. – 2021. – Vol. 112, № 9. – P. 3627.

117. Jacobson, C.A. Interim analysis of ZUMA-5: A phase II study of axicabtagene ciloleucel (axi-cel) in patients (pts) with relapsed/refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (R/R iNHL) / C.A. Jacobson, J.C. Chavez, A.R. Sehgal et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2020. – Vol. 38. – P. 8008.

118. Jaiswal, S. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis / S. Jaiswal, C.H. Jamieson, W.W. Pang et al. // Cell. – 2009. – Vol. 138, № 2. – P. 271–285.

119. Jurinovic, V. Clinicogenetic risk models predict early progression of follicular lymphoma after first-line immunochemotherapy / V. Jurinovic, R. Kridel, A.M. Staiger et al. // Blood. – 2016. – Vol. 128, № 8. – P. 1112–1120.

120. Jurinovic, V. Evaluation of the M7-FLIPI in patients with follicular lymphoma treated within the gallium trial: EZH2 mutation status may be a predictive marker for differential efficacy of chemotherapy / V. Jurinovic, V. Passerini, M.Z. Oestergaard et al. // Blood. – 2019. – Vol. 134, Suppl. 1. – P. 134.

121. Kahl, B.S. Rituximab extended schedule or re-treatment trial for low-tumor burden follicular lymphoma: eastern cooperative oncology group protocol e4402 / B.S. Kahl, F. Hong, M.E. Williams et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2014. – Vol. 32. – P. 3096–3102.

122. Kimby, E. Rituximab plus lenalidomide versus rituximab monotherapy in untreated follicular lymphoma patients in need of therapy. First analysis of survival endpoints of the randomized phase-2 trial SAKK 35/10 / E. Kimby, S. Rondeau, A. Vanazzi et al. // Blood. – 2016. – Vol. 128, № 22. – P. 1099.

123. Knutsen, T. Cytogenetic mechanisms in the pathogenesis and progression of follicular lymphoma / T. Knutsen // Journal of Cancer Survivorship. – 1997. – Vol. 30. – P. 163–192.

124. Köhler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Köhler, C. Milstein // Nature. – 1975. – Vol. 5517, № 256. – P. 495–497.

125. Kridel, R. Histological transformation and progression in follicular lymphoma: a clonal evolution study / R. Kridel, F.C. Chan, A. Mottok et al. // PLOS Medicine. – 2016. – Vol. 13, № 12. – e1002197.

126. Kridel, R. The prognostic impact of CD163-positive macrophages in follicular lymphoma: a study from the BC cancer agency and the lymphoma study association / R. Kridel, L. Xerri, B. Gelas-Dore et al. // Clinical Cancer Research. – 2015. – Vol. 21, № 15. – P. 3428–3435.

127. Krysiak, K. Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma / K. Krysiak, C. Ramirez, F. Gomez et al. // Blood. – 2017. – Vol. 129, № 4. – P. 473–483.

128. Larrea, E. Identification of recurrent mutations in the microRNA-binding sites of B-cell lymphoma-associated genes in follicular lymphoma / E. Larrea, M. Fernandez-Mercado, J.A. Guerra-Assunção et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, № 22. – P. 8795.

129. Lee, J.M. EZH2 generates a methyl degron that is recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 ubiquitin ligase complex / J.M. Lee, J.S. Lee, H. Kim et al. // Molecular Cell. – 2012. – Vol. 48. – P. 572–586.

130. Leonard, J.P. AUGMENT: A phase III study of lenalidomide plus rituximab versus placebo plus rituximab in relapsed or refractory indolent lymphoma / J.P. Leonard, M. Trneny, K. Izutsu et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2019. – Vol. 37. – P. 1188–1199.

131. Leonard, J.P. Randomized trial of lenalidomide alone versus lenalidomide plus rituximab in patients with recurrent follicular lymphoma: CALGB 50401 (Alliance) / J.P. Leonard, S.H. Jung, J. Johnson et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2015. – Vol. 33. – P. 3635–3640.

132. Li, H. Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma / H. Li, M.S. Kaminski, Y. Li et al. // Blood. – 2014. – Vol. 123, № 10. – P. 1487–1498.

133. Li, M.M. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer / M.M. Li, M. Datto, E.J. Duncavage et al. // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2017. – Vol. 19, № 1. – P. 4–23.

134. Lin, L. MicroRNA-144 suppresses tumorigenesis and tumor progression of astrocytoma by targeting EZH2 / L. Lin, Y. Zheng, Y. Tu et al. // Human Pathology. – 2015. – Vol. 46. – P. 971–980.

135. Linley, A. Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells / A. Linley, S. Krysov, M. Ponzoni et al. // Blood. – 2015. – Vol. 126, № 16. – P. 1902–1910.

136. Liu, E. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors / E. Liu, D. Marin, P. Banerjee et al. // The New England Journal of Medicine. – 2020. – Vol. 382. – P. 545–553.

137. Lockmer, S. M7-FLIPI is not prognostic in follicular lymphoma patients with first-line rituximab chemo-free therapy / S. Lockmer, W. Ren, M. Brodtkorb et al. // British Journal of Haematology. – 2020. – Vol. 188, № 2. – P. 259–267.

138. Lossos, I.S. Transformation of follicular lymphoma / I.S. Lossos, R.D. Gascoyne // Best Practice and Research Clinical Haematology. – 2011. – Vol. 24. – P. 147–163.

139. Maeshima, A.M. Prognostic implications of histologic grade and intensity of Bcl-2 expression in follicular lymphomas undergoing rituximab-containing therapy / A.M. Maeshima, H. Taniguchi, J. Nomoto et al. // Human Pathology. – 2013. – Vol. 44, № 11. – P. 2529–2535.

140. Maharaj, K. The dual PI3Kδ/CK1ε inhibitor umbralisib exhibits unique immunomodulatory effects on CLL T cells / K. Maharaj, J.J Powers, A. Achille et al. // Blood Advances. – 2020. – Vol. 13. – P.3072–3084.

141. Marcus, R. Obinutuzumab for the first-line treatment of follicular lymphoma / R. Marcus, A. Davies, K. Ando et al. // The New England Journal of Medicine. – 2017. – Vol. 377. – P. 1331–1344.

142. Martin, P. Phase 1 study of oral azacitidine (CC-486) plus R-CHOP in previously untreated intermediate- to high-risk DLBCL / P. Martin, N.L. Bartlett, J.C. Chavez et al. // Blood. – 2021. – Vol. 139, № 8. – P. 1147–1159.

143. Martínez-Laperche, C. EZH2 mutations at diagnosis in follicular lymphoma: a promising biomarker to guide frontline treatment / C. Martínez-Laperche, L. Sanz-Villanueva, F.J. Díaz Crespo et al. // BMC Cancer. – 2022. – Vol. 22. – P. 982.

144. Maurer, M.J. Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy / M.J. Maurer, H. Ghesquieres, J.P. Jais et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2014. – Vol. 32, № 10. – P. 1066–1073.

145. McDonnell, T.J. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18) / T.J. McDonnell, S.J. Korsmeyer // Nature. – 1991. – Vol. 349. – P. 254–256.

146. McGowan-Jordan, J. ISCN 2020 – An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020) / J. McGowan-Jordan, R.J. Hastings, S. Moore. – Basel: Karger, 2020. – 170 p.

147. Meignan, M. Baseline metabolic tumor volume predicts outcome in high-tumor-burden follicular lymphoma: a pooled analysis of three multicenter studies / M. Meignan, A.S. Cottereau, A. Versari et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2016. – Vol. 34, № 30. – P. 3618–3626.

148. Mercadal, S. Long-term outcome comparing histological grades of follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy as first-line therapy: a retrospective analysis from two institutions / S. Mercadal, J.M. Sancho, F. Climent et al. // European Journal of Haematology. – 2020. – Vol. 104, № 3. – P. 198–206.

149. Mesin, L. Germinal center B cell dynamics / L. Mesin, J. Ersching, G.D. Victora // Immunity. – 2016. – Vol. 45. – P. 471–482.

150. Meyer-Hermann, M.E. An analysis of B-cell selection mechanisms in germinal centers / M.E. Meyer-Hermann, P.K. Maini, D. Iber // Mathematical Medicine and Biology. – 2016. – Vol. 23. – P. 255–277.

151. Meyer, S.N. Unique and shared epigenetic programs of the CREBBP and EP300 acetyltransferases in germinal center B cells reveal targetable dependencies in lymphoma / S.N. Meyer, C. Scuoppo, S. Vlasevska et al. // Immunity. – 2019. – Vol. 51, № 3. – P. 535–547.

152. Michot, J.-M. Long-term results from a phase 1b study of avadomide in combination with obinutuzumab in patients with relapsed and/or refractory b-cell non-Hodgkin lymphoma / J.-M. Michot, R. Bouabdallah, J.K. Doorduijn et al. // Blood. – 2020. – Vol. 136. – P. 41–42.

153. Mihaljevic, B. FCG (FLIPI, Charlson comorbidity index, and histological grade) score is superior to FLIPI in advanced follicular lymphoma / B. Mihaljevic, J. Jelicic, B. Andjelic et al. // International Journal of Hematology. – 2016. – Vol. 104, № 6. – P. 692–699.

154. Miletic, A.V. Coordinate suppression of B cell lymphoma by PTEN and SHIP phosphatases / A.V. Miletic, A.N. Anzelon-Mills, D.M. Mills et al. // Journal of Experimental Medicine. – 2010. – Vol. 207, № 11. – P. 2407–2420.

155. Mir, F. Baseline SUVmax did not predict histological transformation in follicular lymphoma in the phase 3 GALLIUM study / F. Mir, S.F. Barrington, H. Brown et al. // Blood. – 2020. – Vol. 135, № 15. – P. 1214–1218.

156. Mir, F. Follicular Lymphoma Evaluation Index (FLEX): a new clinical prognostic model that is superior to existing risk scores for predicting progression-free survival and early treatment failure after frontline immunochemotherapy / F. Mir, F. Mattiello, A. Grigg et al. // American Journal of Hematology. – 2020. – Vol. 95. – P. 1503–1510.

157. Mlynarczyk, C. Germinal center-derived lymphomas: the darkest side of humoral immunity / C. Mlynarczyk, L. Fontan, A. Melnick // Immunological Reviews. – 2019. – Vol. 288. – P. 214–239.

158. Mohsen, A. Prognostic significance of absolute lymphocyte count, absolute monocyte count, and absolute lymphocyte count to absolute monocyte count ratio in follicular non-Hodgkin lymphoma / A. Mohsen, M. Taalab, N. Abousamra, M. Mabed. // Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. – 2020. – Vol. 20, № 9. – P. e606–e615.

159. Mondello, P. Lack of intrafollicular memory CD4 + T cells is predictive of early clinical failure in newly diagnosed follicular lymphoma / P. Mondello, A. Fama, M.C. Larson et al. // Blood Cancer Journal. – 2021. – Vol. 11, № 7. – P. 130.

160. Mondello, P. R-CHOP versus R-bendamustine with or without rituximab maintenance in newly diagnosed follicular lymphoma patients with high SUV at baseline PET / P. Mondello, P. Strati, R.W. Merryman et al. // Blood. – 2020. – Vol. 136, № 1. – P. 39–40.

161. Morin, R.D. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma / R.D. Morin, M. Mendez-Lago, A.J. Mungall et al. // Nature. – 2011. – Vol. 476, № 7360. – P. 298–303.

162. Morin, R.D. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin / R.D. Morin, N.A. Johnson, T.M. Severson et al. // Nature Genetics. – 2010. – Vol. 42. – P. 181–185.

163. Morschhauser, F. Obinutuzumab combined with lenalidomide for relapsed or refractory follicular B-cell lymphoma (GALEN): a multicentre, single-arm, phase 2 study / F. Morschhauser, S. Le Gouill, P. Feugier et al. // Lancet Haematology. – 2019. – Vol. 6, № 8. – P. e429–e437.

164. Morschhauser, F. Polatuzumab vedotin or pinatuzumab vedotin plus rituximab in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma: Final results from a phase 2 randomised study (ROMULUS) / F. Morschhauser, I.W. Flinn, R. Advani et al. // Lancet Haematology. – 2019. – Vol. 6. – P. e254–e265.

165. Morschhauser, F. Rituximab plus lenalidomide in advanced untreated follicular lymphoma / F. Morschhauser, N.H. Fowler, P. Feugier et al. // The New England Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 379. – P. 934–947.

166. Morschhauser, F. Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial / F. Morschhauser, H. Tilly, A. Chaidos et al. // Lancet Oncology. – 2020. – Vol. 21, № 11. – P. 1433–1442.

167. Mottok, A. Inactivating SOCS1 mutations are caused by aberrant somatic hypermutation and restricted to a subset of B-cell lymphoma entities / A. Mottok, C. Renne, M. Seifert et al. // Blood. – 2009. – Vol. 114, № 20. – P. 4503–4506.

168. Moustafa, M.A. Long-term outcome of patients with low-grade follicular lymphoma treated with yttrium-90 ibritumomab tiuxetan: The Mayo Clinic experience / M.A. Moustafa, R. Parrondo, G. Wiseman et al. // Blood. – 2019. – Vol. 134. – P. 2809.

169. Mraz, M. miR-150 influences B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1 / M. Mraz, L. Chen, L.Z. Rassenti et al. // Blood. – 2014. – Vol. 124, № 1. – P. 84–95.

170. Musilova, K. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex / K. Musilova, M. Mraz // Leukemia. – 2015. – Vol. 29, № 5. – P. 1004–1017.

171. Nadler, L.M. Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen / L.M. Nadler, P. Stashenko, R. Hardy et al. // Cancer Research. – 1980. – Vol. 40. – P. 3147–3154.

172. Nagy, A. Quantitative analysis and monitoring of EZH2 mutations using liquid biopsy in follicular lymphoma / A. Nagy, B. Batai, A. Balogh et al. // Genes (Basel). – 2020. – Vol. 11, № 7. – P. 785.

173. Nakajima, R. Baseline FDG-PET/CT detects bone marrow involvement in follicular lymphoma and provides relevant prognostic information / R. Nakajima, A.J. Moskowitz, L. Michaud et al. // Blood Advances. – 2020. – Vol. 4. – P. 1812–1823.

174. Nooka, A.K. Examination of the follicular lymphoma international prognostic index (FLIPI) in the National LymphoCare study (NLCS): a prospective US patient cohort treated predominantly in community practices / A.K. Nooka, C. Nabhan, X. Zhou et al. // Annals of Oncology. – 2013. – Vol. 24, № 2. – P. 441–448.

175. Ogura, M. A multicentre phase II study of vorinostat in patients with relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma / M. Ogura, K. Ando, T. Suzuki et al. // British Journal of Haematology. – 2014. – Vol. 165. – P. 768–776.

176. Ohno, H. Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms / H. Ohno, S. Fukuhara // Leukemia and Lymphoma. – 1997. – Vol. 27, № 1–2. – P. 53–63.

177. Okosun, J. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma / J. Okosun, C. Bodor, J. Wang et al. // Nature Genetics. – 2014. – Vol. 46, № 2. – P. 176–181.

178. Okosun, J. Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma / J. Okosun, R.L. Wolfson, J. Wang et al. // Nature Genetics. – 2016. – Vol. 48, № 2. – P. 183–188.

179. Ortega-Molina, A. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development / A. Ortega-Molina, I.W. Boss, A. Canela et al. // Nature Medicine. – 2015. – Vol. 21, № 10. – P. 1199–1208.

180. Pádua Covas Lage, L.A. Tumor mutation burden involving epigenetic regulatory genes and the RhoA GTPase predicts overall survival in nodal mature T-cell lymphomas / L.A. de Pádua Covas Lage, H.F. Culler, G.C. Barreto et al. // Clinical Epigenetics. – 2022. – Vol. 14. – P. 180.

181. Pasqualucci, L. Genetics of follicular lymphoma transformation / L. Pasqualucci, H. Khiabanian, M. Fangazio et al. // Cell Reports. – 2014. – Vol. 6, № 1. – P. 130–140.

182. Pasqualucci, L. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma / L. Pasqualucci, D. Dominguez-Sola, A. Chiarenza et al. // Nature. – 2011. – Vol. 471, № 7337. – P. 189–195.

183. Pastore, A. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry / A. Pastore, V. Jurinovic, R. Kridel et al. // Lancet Oncology. – 2015. – Vol. 16, № 9. – P. 1111–1122.

184. Pinero, J. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants / J. Pinero, A. Bravo, N. Queralt-Rosinach et al. // Nucleic Acids Research. – 2017. – Vol. 45, D1. – P. D833–D839.

185. Pongas, G. PI3K signaling pathway in normal B cells and indolent B-cell malignancies / G. Pongas, B.D. Cheson // Seminars in Oncology. – 2016. – Vol. 43, № 6. – P. 647–654.

186. Posternak, V. Strategically targeting MYC in cancer / V. Posternak, M.D. Colea // F1000Res. – 2016. – Vol. 5. – P. 408.

187. Press, O.W. A comparative analysis of prognostic factor models for follicular lymphoma based on a phase III trial of CHOP-rituximab versus CHOP + ^{131}Iodine-tositumomab / O.W. Press, J.M. Unger, L.M. Rimsza et al. // Clinical Cancer Research. – 2013. – Vol. 19. – P. 6624–6632.

188. Qu, X. Genomic alterations important for the prognosis in patients with follicular lymphoma treated in SWOG study S0016 / X. Qu, H. Li, R.M. Braziel et al. // Blood. – 2019. – Vol. 133, № 1. – P. 81–93.

189. Rai, S. Decreased expression of T-cell-associated immune markers predicts poor prognosis in patients with follicular lymphoma / S. Rai, H. Inoue, K. Sakai et al. // Cancer Science. – 2022. – Vol. 113. – P. 660–673.

190. Raudvere, U. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update) / U. Raudvere, L. Kolberg, I. Kuzmin et al. // Nucleic Acids Research. – 2019. – Vol. 47. – P. 191–198.

191. Ribrag, V. Safety and efficacy of abexinostat, a pan-histone deacetylase inhibitor, in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: Results of a phase II study / V. Ribrag, W.S. Kim, R. Bouabdallah et al. // Haematologica. – 2017. – Vol. 102. – P. 903–909.

192. Richards, S. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / S. Richards, N. Aziz, S. Bale et al. // Genetics in Medicine. – 2015. – Vol. 17, № 5. – P. 405–424.

193. Rivas-Delgado, A. Response duration and survival shorten after each relapse in patients with follicular lymphoma treated in the rituximab era / A. Rivas-Delgado, L. Magnano, M. Moreno-Velázquez et al. // British Journal of Haematology. – 2019. – Vol. 184, № 5. – P. 753–759.

194. Rizvi, N.A. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non–small cell lung cancer / N.A. Rizvi, M.D. Hellmann, A. Snyder et al. // Science. – 2015. – Vol. 348, № 6230. – P. 124–128.

195. Rossi, C. Baseline SUVmax is related to tumor cell proliferation and patient outcome in follicular lymphoma / C. Rossi, M. Tosolini, P. Gravelle et al. // Haematologica. – 2022. – Vol. 107, № 1. – P. 221–230.

196. Roulland, S. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis / S. Roulland, M. Faroudi, E. Mamessier et al. // Advances in Immunology. – 2011. – Vol. 111. – P. 1–46.

197. Roulland, S. t(14;18) Translocation: A predictive blood biomarker for follicular lymphoma / S. Roulland, R.S. Kelly, E. Morgado et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2014. – Vol. 32, № 13. – P. 1347–1355.

198. Rozek, L.S. Epigenetics: relevance and implications for public health / L.S. Rozek, D.C. Dolinoy, M.A. Sartor, G.S. Omenn // Annual Review of Public Health. – 2014. – Vol. 35. – P. 105–122.

199. Rugo, H.S. The promise for histone methyltransferase inhibitors for epigenetic therapy in clinical oncology: A narrative review. / H.S. Rugo, I. Jacobs, S. Sharma et al. // Advances in Therapy. – 2020. – Vol. 37, № 7. – P. 3059–3082.

200. Rummel, M.J. Bendamustine plus rituximab (B-R) versus CHOP plus rituximab (CHOP-R) as first-line treatment in patients with indolent lymphomas: Nine-year updated results from the StiL NHL1 study [abstract] / M.J. Rummel, G. Maschmeyer, A. Ganser et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2017. – Vol. 35, 15 suppl. – P. 7501.

201. Sahasrabuddhe, A.A. Oncogenic Y641 mutations in EZH2 prevent Jak2/beta-TrCP-mediated degradation / A.A. Sahasrabuddhe, X. Chen, F. Chung et al. // Oncogene. – 2015. – Vol. 34. – P. 445–454.

202. Salles, G. Efficacy and safety of idelalisib in patients with relapsed, rituximab- and alkylating agent-refractory follicular lymphoma: a subgroup analysis of a phase 2 study / G. Salles, S.J. Schuster, S. de Vos et al. // Haematologica. – 2017. – Vol. 102, № 4. – P. 156–159.

203. Salles, G. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial / G. Salles, J.F. Seymour, F. Offner et al. // Lancet. – 2011. – Vol. 377. – P. 42–51.

204. Sarkozy, C. Risk factors and outcomes for patients with follicular lymphoma who had histologic transformation after response to first-line immunochemotherapy in the PRIMA trial / C. Sarkozy, M. Trneny, L. Xerri et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2016. – Vol. 34, № 22. – P. 2575–2582.

205. Sarkozy, C. The prognostic value of clonal heterogeneity and quantitative assessment of plasma circulating clonal IG-VDJ sequences at diagnosis in patients with follicular lymphoma / C. Sarkozy, S. Huet, V.E. Carlton et al. // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8, № 5. – P. 8765–8774.

206. Scaffidi, P. Cancer epigenetics: from disruption of differentiation programs to the emergence of cancer stem cells / P. Scaffidi, T. Misteli // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. – 2010. – Vol. 75. – P. 251–258.

207. Schans, S.A.M. Validation, revision and extension of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) in a population-based setting / S.A.M. van de Schans, E.W. Steyerberg, M.R. Nijziel et al. // Annals of Oncology. – 2009. – Vol. 20, № 10. – P. 1697–1702.

208. Seda, V. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells / V. Seda, M. Mraz // European Journal of Haematology. – 2015. – Vol. 94, № 3. – P. 193–205.

209. Sehn, L.H. Obinutuzumab plus bendamustine versus bendamustine monotherapy in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN): a randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 3 trial / L.H. Sehn, N. Chua, J. Mayer et al. // Lancet Oncology. – 2016. – Vol. 17. – P. 1081–1093.

210. Siddiqui, M. Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas / M. Siddiqui, K. Ristow, S.N. Markovic et al. // British Journal of Haematology. – 2006. – Vol. 134, № 6. – P. 596–601.

211. Simon, J.A. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics / J.A. Simon, C.A. Lange // Mutation Research. – 2008. – Vol. 647, № 1–2. – P. 21–29.

212. Skander, J. A fully automated measurement of total metabolic tumor burden in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma / J. Skander, J. Fredrickson, A. Coimbra et al. // Blood. – 2019. – Vol. 34, Ssuppl. 1. – P. 4666.

213. Smith, A. Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004-2014: sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network / A. Smith, S. Crouch, S. Lax et al. // British Journal of Cancer. – 2015. – Vol. 112, № 9. – P. 1575–1584.

214. Smith, S.D. Rapid and durable responses with the SYK/JAK inhibitor cerdulatinib in a phase 2 study in relapsed/refractory follicular lymphoma-alone or in combination with rituximab / S.D. Smith, J. Munoz, D. Stevens et al. // Blood. – 2019. – Vol. 134. – P. 3981.

215. Sneeringer, C.J. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas / C.J. Sneeringer, M.P. Scott, K.W. Kuntz et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2010. – Vol. 107. – P. 20980–20985.

216. Sohani, A.R. Biomarkers for risk stratification in patients with previously untreated follicular lymphoma receiving anti-CD20-based biologic therapy / A.R. Sohani, M.J. Maurer, S. Giri et al. // The American Journal of Surgical Pathology. – 2021. – Vol. 45, № 3. – P. 384–393.

217. Solal-Celigny, P. Follicular lymphoma international prognostic index / P. Solal-Celigny, P. Roy, P. Colombat et al. // Blood. – 2004. – Vol. 104. – P. 1258–1265.

218. Souroullas, G.P. An oncogenic Ezh2 mutation induces tumors through global redistribution of histone 3 lysine 27 trimethylation / G.P. Souroullas, W.R. Jeck, J.S. Parker et al. // Nature Medicine. – 2016. – Vol. 22, № 6. – P. 632–640.

219. Stazi, G. EZH2 inhibitors: a patent review (2014–2016) / G. Stazi, C. Zwergel, A. Mai, S. Valente // Expert Opinion on Therapeutic Patents. – 2017. – Vol. 27, № 7. – P. 797–813.

220. Stevens, W.B.C. Prognostic relevance of CD163 and CD8 combined with EZH2 and gain of chromosome 18 in follicular lymphoma: a study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium / W.B.C. Stevens, M. Mendeville, R. Redd et al. // Haematologica. – 2017. – Vol. 102, № 8. – P. 1413–1423.

221. Subramanian, A. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles / A. Subramanian, P. Tamayo, V.K. Mootha et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – Vol. 102, № 43. – P. 15545–15550.

222. Sungalee, S. Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression / S. Sungalee, E. Mamessier, E. Morgado et al. // Journal of Clinical Investigation. – 2014. – Vol. 124, № 12. – P. 5337–5351.

223. Suraweera, A. Combination therapy with histone deacetylase inhibitors (HDACi) for the Treatment of cancer: achieving the full therapeutic potential of HDACi / A. Suraweera, K.J. O'Byrne, D.J. Richard // Frontiers in Oncology. – 2018. Vol. 8. – P. 92.

224. Szumera-CieĆkiewicz, A. EZH2 expression in follicular lymphoma is variable and independent from the progression of disease within 24 months of first treatment / A. Szumera-CieĆkiewicz, J. Poleszczuk, E. Paszkiewicz-Kozik et al. // Anticancer Research. – 2020. – Vol. 40, № 12. – P. 6685–6697.

225. Thorpe, L.M. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting / L.M. Thorpe, H. Yuzugullu, J.J. Zhao // Nature Reviews Cancer. – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 7–24.

226. Tobin, J.W.D. Progression of disease within 24 months in follicular lymphoma is associated with reduced intratumoral immune infiltration / J.W.D. Tobin, C. Keane, J. Gunawardana et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2019. – Vol. 37, № 34. – P. 3300–3309.

227. Topalian, S.L. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy / S.L. Topalian, C.G. Drake, D.M. Pardoll // Cancer Cell. – 2015. – Vol. 27. – P. 450–461.

228. Trotman, J. Prognostic value of PET-CT after first-line therapy in patients with follicular lymphoma: a pooled analysis of central scan review in three multicentre studies / J. Trotman, S. Luminari, S. Boussetta et al. // Lancet Haematology. – 2014. – Vol. 1, № 1. – P. e17–e27.

229. Tsujimoto, Y. Cloning the breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation / Y. Tsujimoto, L.R. Finger, J. Yunis et al. // Science. – 1984. – Vol. 226. – P. 1098–1099.

230. Tsujimoto, Y. Involvement of the BCL2 gene in human follicular lymphoma / Y. Tsujimoto, J. Cossman, E. Jaffe et al. // Science. – 1985. – Vol. 228, № 4706. – P. 1440–1443.

231. Victora, G.D. Germinal centers / G.D. Victora, M.C. Nussenzweig // Annual Reviews. Immunol. – 2012. – Vol. 30. – P. 429–457.

232. Visser, H.P. The polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma / H.P. Visser, M.J. Gunster, H.C. Kluin-Nelemans et al. // British Journal of Haematology. – 2001. – Vol. 112. – P. 950–958.

233. Wagner-Johnston, N.D. Risk factors for early transformation of follicular lymphoma (FL): report from the National LymphoCare Study (NLCS) / N.D. Wagner-Johnston, B.K. Link, M. Taylor, N.L. Bartlett // Blood. – 2009. – Vol. 114, № 22. – P. 2698.

234. Wahlin, B.E. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times / B.E. Wahlin, O.E. Yri, E. Kimby et al. // British Journal of Haematology. – 2012. – Vol. 156, № 2. – P. 225–233.

235. Wang, H. A Critical role of miR-144 in diffuse large b-cell lymphoma proliferation and invasion / H. Wang, A. Wang, Z. Hu et al. // Cancer Immunology Research. – 2016. – Vol. 4. – P. 337–344.

236. Wang, X. Immune modulatory functions of EZH2 in the tumor microenvironment: implications in cancer immunotherapy / X. Wang, L.T. Brea, J. Yu // American Journal of Clinical and Experimental Urology. – 2019. – Vol. 7. – P. 85–91.

237. Witzig, T.E. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma / T.E. Witzig, L.I. Gordon, F. Cabanillas et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2002. – Vol. 20. – P. 2453–2463.

238. Xian, R.R. CREBBP and STAT6 co-mutation and 16p13 and 1p36 loss define the t(14;18)-negative diffuse variant of follicular lymphoma / R.R. Xian, Y. Xie, L.M. Haley et al. // Blood Cancer Journal. – 2020. – Vol. 10, № 6. – P. 69.

239. Xu, S. The role of ARID1A in tumors: Tumor initiation or tumor suppression? / S. Xu, C. Tang // Frontiers in Oncol. – 2021. – Vol. 11. – Article 745187.

240. Yang, G. Enhancement of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) with lymphopenia (FLIPI-L): a predictor for overall survival and histologic transformation / G. Yang, M. Mills, Y. Kim et al. // Blood Cancer Journal. – 2019. – Vol. 9, №12. – P. 104.

241. Yap, D.B. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation / D.B. Yap, J. Chu, T. Berg et al. // Blood. – 2011. – Vol. 117, № 8. – P. 2451–2459.

242. Yin, J. Ezh2 regulates differentiation and function of natural killer cells through histone methyltransferase activity / J. Yin, J.W. Leavenworth, Y. Li et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2015. – Vol. 112. – P. 15988–15993.

243. Yoo, C. Serum beta-2 microglobulin in malignant lymphomas: an old but powerful prognostic factor / C. Yoo, D.H. Yoon, C. Suh // Blood Research. – 2014. – Vol. 49, № 3. – P. 148–153.

244. Zar, J.H. Biostatistical Analysis / J.H. Zar. – NJ Prentice Hall, 1999. 4th edn. – 523 p.

245. Zelenetz, A.D. Results of the PI3Kδ inhibitor ME-401 alone or with rituximab in relapsed/refractory (R/R) follicular lymphoma (FL) / A.D. Zelenetz, D. Jagadeesh, N.M. Reddy et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2019. – Vol. 37, № 15. – P. 7512.

246. Zhang, J. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis / J. Zhang, D. Dominguez-Sola, S. Hussein et al. // Nature Medicine. – 2015. – Vol. 21, № 10. – P. 1190–1198.

247. Zhang, J. The CREBBP acetyltransferase is a haploinsufficient tumor suppressor in B-cell lymphoma / J. Zhang, S. Vlasevska, V.A. Wells et al. // Cancer Discovery. – 2017. – Vol. 7, № 3. – P. 322–337.

248. Zhang, X. ARID1A mutations in cancer development: mechanism and therapy / X. Zhang, Y. Zhang, J. Zhao et al. // Carcinogenesis. – 2023. – Vol. 44, № 3. – P. 197–208.

249. Zhang, Y. The polycomb repressive complex 2 governs life and death of peripheral T-cells / Y. Zhang, S. Kinkel, J. Maksimovic et al. // Blood. – 2014. – Vol. 124. – P. 737–749.

250. Zhou, Y. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets / Y. Zhou, B. Zhou, L. Pache et al. // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 1523.

251. Zinzani, P.L. Phase 2 study of venetoclax plus rituximab or randomized Ven plus bendamustine+rituximab (BR) versus BR in patients with relapsed/refractory follicular lymphoma: Interim data / P.L. Zinzani, M.S. Topp, S.L.S. Yuen et al. // Blood. – 2016. – Vol. 128, № 22. – P. 617.