

DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-60-74



Анализ вариантов нестабильности микросателлитных повторов и потери гетерозиготности у пациентов с фолликулярной лимфомой, диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности

К.А. Сычевская, А.Е. Мисюрина, Е.Е. Никулина, Н.В. Рисинская, Р.Р. Абдурашидова, З.Т. Саракаева, А.У. Магомедова, А.Б. Судариков, С.К. Кравченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Ксения Андреевна Сычевская sychevskaya-ka@yandex.ru

Введение. Изучение генетических предикторов течения неходжкинских лимфом является одним из актуальных направлений онкогематологии. Крайне интересным представляется поиск значимых маркеров, отражающих важнейшие этапы патогенеза опухоли. Одну из ключевых ролей в развитии нестабильности генома играют дефекты систем репарации. Нарушения микросателлитных повторов по типу микросателлитной нестабильности (microsatellite instability, MSI), в частности aberrаций микросателлитных тетра-нуклеотидных повторов (elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats, EMAS), характерны для дефицита системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов. Анализ микросателлитного профиля также позволяет детектировать потерю гетерозиготности (loss of heterozygosity, LOH). Феномен LOH является интегральным отражением нестабильности генома.

Цель исследования – анализ значения MSI, в частности EMAS, и LOH при фолликулярной лимфоме (ФЛ), диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ) и В-клеточной лимфоме высокой степени злокачественности (ВКЛВСЗ).

Материалы и методы. Исследование было выполнено методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и последующего фрагментного анализа с использованием диагностических панелей COrDIS Plus и COrDIS MSI у 85 пациентов с ФЛ, у 32 пациентов с ДВККЛ и у 37 пациентов с ВКЛВСЗ.

Результаты. В общей группе ФЛ частота LOH составила 40/81 (49,4 %), MSI – 10/82 (12,2 %), EMAS – 15/81 (18,5 %). В группе ВКЛВСЗ частота LOH составила 21/31 (67,8 %), MSI – 11/37 (29,7 %), EMAS – 13/31 (41,9 %). В группе ДВККЛ частота LOH составила 18/29 (62,0 %), MSI – 5/32 (15,6 %), EMAS – 14/32 (43,8 %). При рассмотрении морфологических типов ФЛ было отмечено, что более высокая частота генетических aberrаций была характерна для лимфом с морфологией, соответствующей более агрессивным формам ($p < 0,05$).

Исследование LOH позволяет выделить группу пациентов с неблагоприятным прогнозом ФЛ и ВКЛВСЗ. Анализ EMAS позволяет дополнительно выявить в когорте LOH+ больных с низкой бессобытийной выживаемостью.

Заключение. LOH и EMAS обладают прогностическим значением при ФЛ и ВКЛВСЗ. При ДВККЛ ассоциации LOH и EMAS с выживаемостью не отмечено. Изменения мононуклеотидных повторов при ФЛ, ДВККЛ и ВКЛВСЗ не соответствовали феномену MSI-H (высокий уровень MSI), характерному для синдрома Линча и подобных ему опухолей. По этой причине нельзя ожидать воспроизведения клинических следствий MSI-H в случае солидных новообразований, в частности эффективности ингибиторов иммунных контрольных точек, при лимфомах исключительно на основании выявления aberrаций микросателлитов.

Ключевые слова: фолликулярная лимфома, диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, нестабильность генома, короткие tandemные повторы, микросателлитная нестабильность, aberrации микросателлитных тетра-нуклеотидных повторов, потеря гетерозиготности

Для цитирования: Сычевская К.А., Мисюрина А.Е., Никулина Е.Е. и др. Анализ вариантов нестабильности микросателлитных повторов и потери гетерозиготности у пациентов с фолликулярной лимфомой, диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности. Онкогематология 2022; 17(2):60–74. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-60-74.

Analysis of microsatellite aberrations and loss of heterozygosity in follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, and high-grade B-cell lymphoma patients

K.A. Sychevskaya, A.E. Misyurina, E.E. Nikulina, N.V. Risinskaya, R.R. Abdurashidova, Z.T. Sarakaeva, A.U. Magomedova, A.B. Sudarikov, S.K. Kravchenko

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Contacts: Kseniia Andreevna Sychevskaya sychevskaya-ka@yandex.ru

Background. The study of genetic predictors of non-Hodgkin's lymphomas prognosis is one of the most relevant areas of oncohematology. It is extremely interesting to search for integral markers that reflect the most important stages of tumor pathogenesis. DNA repair system plays one of the key roles in genomic instability. Aberrations of microsatellite repeats such as microsatellite instability (MSI), in particular elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats (EMAST) is characteristic for mismatch repair system and loss of heterozygosity (LOH) is an integral feature of genomic instability.

Objective. Analysis of MSI, EMAST, LOH significance in follicular lymphoma (FL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), and high-grade B-cell lymphoma (HGBL) patients.

Materials and methods. The study was performed by multiplex PCR and fragment analysis with diagnostic panels COrDIS Plus and COrDIS MSI in 85 FL patients, 32 DLBCL patients, and 37 HGBL patients.

Results. The frequency of LOH in the general FL group was 40/81 (49.4 %), MSI – 10/82 (12.2 %), EMAST – 15/81 (18.5 %). The frequency of LOH in the HGBL group was 21/31 (67.8 %), MSI – 11/37 (29.7 %), EMAST – 13/31 (41.9 %). The frequency of LOH in the DLBCL group was 18/29 (62.0 %), MSI – 5/32 (15.6 %), EMAST – 14/32 (43.8 %). When considering the morphological types of FL, it was noted that a higher frequency of genetic aberrations was characteristic of lymphomas with a more aggressive morphology ($p < 0.05$).

LOH identifies FL and HGBL patients with an unfavorable prognosis. The EMAST analysis allows identifying additional patients in the LOH+ cohort with early events and low EFS.

Conclusion. LOH and EMAST have a prognostic value for FL and HGBL. No associations of LOH and EMAST with the survival were observed in DLBCL. Changes in mononucleotide repeats in FL, DLBCL and HGBL did not correspond to the MSI-H characteristic of solid tumors. For this reason, the clinical consequences of MSI-H in solid neoplasms, in particular the efficacy of immune checkpoint inhibitors, in lymphomas cannot be expected to be replicated solely on the basis of microsatellite aberrations detection.

Key words: follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, high-grade B-cell lymphoma, genetic instability, short tandem repeats, microsatellite instability, elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats, loss of heterozygosity

For citation: Sychevskaya K.A., Misyurina A.E., Nikulina E.E. et al. Analysis of microsatellite aberrations and loss of heterozygosity in follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, and high-grade B-cell lymphoma patients. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2022;17(2):60–74. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-60-74.

Введение

Изучение генетических и эпигенетических предикторов течения неходжкинских лимфом (НХЛ) представляет собой одно из актуальных направлений фундаментальной и практической онкогематологии. В настоящее время известен целый ряд генов, мутации в которых обладают онкогенным потенциалом. В контексте возрастающей доступности секвенирования полного генома, методики секвенирования нового поколения, возможностей определения профиля экспрессии их перечень непрерывно пополняется. Несомненно, успехи молекулярной лабораторной диагностики позволили существенно расширить понимание патогенеза лимфом. Однако реальность такова, что максимальной предсказательной или дифференциально-диагностической ценностью, по данным последних исследований, обладают не отдельные «ключевые» гены, а совокупности взаимодействия десятков или сотен вариантов мутированных или эпигенетически модифицированных генов, что делает затруднительным применение основанных на них моделей и алгоритмов

терапии в клинической практике. Таким образом, на настоящий момент все еще не существует инструмента точного прогнозирования течения заболевания на первичном этапе и иницирующая терапия НХЛ во многом остается эмпирической.

Поэтому крайне актуальным представляется поиск интегральных маркеров, отражающих важнейшие результирующие этапы патогенеза опухоли. Известно, что нестабильность генома связана с возникновением и развитием заболевания, а также с эволюцией опухолевых клонов. Проявления геномной нестабильности крайне вариативны и могут включать нарушения от уровня хромосом до изменения единичных нуклеотидов. Тем не менее закономерности появления и сохранения мутаций универсальны и определяются несколькими основными механизмами. Одну из ключевых ролей в феномене нестабильности генома играют системы репарации.

Микросателлитная нестабильность (microsatellite instability, MSI) отражает дисфункцию системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch

gerair, MMR) и проявляется в увеличении процента точечных мутаций генома и, в частности, мутаций коротких tandemных повторов, или микросателлитов [1]. Патогенетические следствия MSI хорошо известны на примере наследственного рака толстой кишки или синдрома Линча, который является классической моделью MSI-положительных опухолей [2]. Увеличение процента точечных мутаций нуклеотидов в экзонах и мутаций изменения рамки считывания вследствие aberrаций микросателлитных повторов приводит к появлению опухолевых неоантигенов, обладающих иммуногенной активностью [3]. По этой причине в случаях MSI-положительных опухолей развита реактивная Т-клеточная инфильтрация опухолевой ткани, выражен противоопухолевый ответ и осуществляется контроль местной инвазии и отдаленных метастазов. В то же время нарушение системы репарации приводит к блокаде апоптоза, инициированного повреждением ДНК, что обуславливает неэффективность стандартных цитотоксических агентов в терапии подобных типов рака [4]. В настоящее время терапией выбора MSI-положительных опухолей считается применение ингибиторов иммунных контрольных точек, которые, с одной стороны, позволяют обойти неактивный апоптотический каскад, с другой – выгодно используют характерные особенности противоопухолевого иммунитета [5].

Описанные особенности характерны для классического варианта MSI, а именно MSI-H (высокого уровня MSI), согласно определению Bethesda [6]. Стоит отметить, что для MSI-H в большей степени специфичны aberrации мононуклеотидных повторов, что нашло отражение в более поздней модификации диагностической панели локусов Bethesda. Частный вариант MSI, известный как E-MSI (elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats, aberrации микросателлитных тетрануклеотидных повторов), отражает другую сторону патогенеза опухоли [7]. Для E-MSI-положительного рака характерна ассоциация с хроническим воспалением, агрессивное течение опухоли и неблагоприятный прогноз для больного [8]. Впервые феномен E-MSI был описан для случаев колоректального рака, однако впоследствии показано, что подобные генетические нарушения имеют более широкое распространение среди онкологических и неопухолевых заболеваний. Близким по патогенезу и прогностическому значению к E-MSI является феномен MSI-L (низкий уровень MSI), согласно определению Bethesda, что отражает общность механизмов повреждения микросателлитов с длиной мономера от 2 нуклеотидов [6, 9].

Идентифицируемые в лабораторной практике aberrации микросателлитных повторов не только возникают при их нестабильности, но и позволяют исследовать феномен потери гетерозиготности (loss of heterozygosity, LOH). Патогенез LOH в большей степени гетерогенен и обусловлен как нарушениями карิโอ-

па, следовательно, митоза, митотического кроссинговера, явлением однородительской дисомии, а также нарушениями систем репарации, в частности системы негомологичного соединения концов (NHEJ) [10, 11]. Тем не менее наличие LOH является интегральным показателем нестабильности генома, а также заслуживает внимания по причине строгой ассоциации с хромосомными регионами, что может указывать на более частные пути патогенеза и вовлечение потенциальных генов-супрессоров опухоли.

Изложенное указывает на то, что анализ MSI, в частности E-MSI, и LOH как перспективных универсальных маркеров опухоли актуален и может предоставить новые сведения относительно патогенеза онкогематологических заболеваний. В настоящее время лимфомы, в частности группа В-клеточных НХЛ, остаются малоизученными с позиций возможного значения aberrаций микросателлитов. Проведенные ранее исследования не предоставили достаточного количества данных о характере нестабильности микросателлитных повторов при лимфомах и, следовательно, о возможности сопоставления с относительно полно разработанной феноменологией MSI- и E-MSI-положительных солидных опухолей [12–16]. Кроме этого, остается неясной взаимосвязь лабораторных и клинических показателей, а также ассоциация MSI, в частности E-MSI, и LOH с выживаемостью пациентов.

Цель исследования – детальный анализ особенностей и прогностического значения MSI, в частности E-MSI, и LOH при НХЛ на примере фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), и В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности (ВКЛВСЗ).

Материалы и методы

В исследование были включены 85 пациентов с ФЛ (27 случаев – 1–2-го морфологического типов, 25 случаев – типа 3А, 33 случая – типа 3В и трансформации в ДВККЛ), 32 пациента с ДВККЛ, 37 пациентов с ВКЛВСЗ. Все больные наблюдались в отделении интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов НМИЦ гематологии с 2010 по 2020 г. Всеми пациентами было дано добровольное согласие на участие в исследовании.

Анализ профиля микросателлитных маркеров проводили в материале биоптатов опухолевого лимфатического узла (в замороженном материале или в материале срезов с парафиновых блоков) или аспирата костного мозга при поражении лимфомой, доказанном гистологически и определением В-клеточной клональности по перестройкам генов иммуноглобулинов. В качестве контрольного образца здоровой ткани были использованы лейкоциты периферической крови или аспират костного мозга в дебюте без вовлечения или после санации, что было доказано путем исключения В-клеточной клональности.

Выделение ДНК из замороженного материала и парафиновых блоков проводили описанным ранее способом [17, 18]. Определение концентрации раствора ДНК выполняли на флуориметре Qubit 4,0 (Thermo Fisher Scientific, США).

В-клеточную клональность определяли по перестройкам генов тяжелых цепей *IGH* (VH–JH–FR1/FR2/FR3/DH–JH), легкой цепи к *IGK* (Vk–Jk/Vk–KDE/IntronRSS–KDE) с последующим фрагментным анализом продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в соответствии с протоколом BIOMED-2 [19]. Условия ПЦР соответствовали изложенным ранее [20].

Исследование MSI выполняли с использованием диагностических панелей COgDIS Plus и COgDIS MSI (Гордиз, Россия), в которые включены 19 тетрауклеотидных маркеров, локусы амелогенина X и Y и 5 мононуклеотидных маркеров. Состав реакционной смеси соответствовал рекомендациям производителя. В каждую реакцию было внесено не менее 10 нг ДНК. Условия ПЦР COgDIS Plus были следующими: 94 °C (3 мин); 4 цикла: 98 °C (30 с), 59 °C (120 с), 72 °C (90 с); 6 циклов: 94 °C (30 с), 59 °C (120 с), 72 °C (90 с); 18 циклов: 90 °C (30 с), 59 °C (120 с), 72 °C (75 с); 68 °C (10 мин). Условия ПЦР COgDIS MSI были следующими: 95 °C (2 мин); 28 циклов: 95 °C (10 с), 58 °C (30 с), 72 °C (30 с); 68 °C (10 мин). Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере DNAEngine (Bio-Rad, США). Последующий фрагментный анализ был выполнен на генетическом анализаторе Нанофор-05 (Синтол, Россия).

Выявленные изменения микросателлитного профиля в сравнении с контрольным образцом были классифицированы следующим образом: EMAST – появление нового аллеля тетрауклеотидного локуса; LOH – аллельный дисбаланс, т.е. изменение интенсивности флуоресценции продукта одного из аллелей при их гетерозиготном наследовании более чем на 50 % по сравнению со вторым аллелем; monoMSI – аберрации мононуклеотидных локусов, которые в силу квазимономорфного характера маркеров было невозможно дифференцировать между истинной нестабильностью и LOH. Предложенный вариант интерпретации результатов и сокращения, в частности monoMSI, использованы авторами в рамках настоящего исследования в целях выделения особенностей выявленных вариантов аберраций микросателлитных локусов, в дальнейшем подробно рассмотренных в разделе «Обсуждение».

Для статистического анализа использовали программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и Statistica 13.0 (StatSoft, Россия). Сравнение выборок проводили с помощью χ^2 -критерия Пирсона при анализе таблиц сопряженности. Анализ выживаемости был выполнен методом Каплана–Майера и с использованием регрессионной модели Кокса. Различия признавали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ частот изменений микросателлитных локусов при ФЛ, ДВККЛ, ВКЛВСЗ. В общей группе ФЛ частота LOH составила 40/81 (49,4 %), monoMSI – 10/82 (12,2 %), EMAST – 15/81 (18,5 %). Феномен LOH у 20 пациентов был отмечен по 1 маркеру, у 8 – по 2, у 6 – по 3, у 3 – по 4, у 3 – по 5. Феномен MSI у 7 пациентов был отмечен по 1 маркеру, у 3 – по 2. Феномен EMAST у 9 пациентов был отмечен по 1 маркеру, у 5 – по 2, у 1 – по 3. Наблюдалась значимая ассоциация количества измененных микросателлитных маркеров по типу LOH и морфологического типа ФЛ ($\chi^2 = 20,9$; $df = 10$; $p = 0,02$), а именно большее количество аберраций оказалось характерно для более агрессивных форм ФЛ. Подобная же тенденция была выявлена и при анализе EMAST, однако она не достигла статистической значимости ($\chi^2 = 8,4$; $df = 6$; $p = 0,2$).

Изменения микросателлитов различной хромосомной локализации встречались со средней частотой 6,4 (0–14,3) % для LOH, 3 (0–8,9) % для monoMSI, 1,2 (0–5,1) % для EMAST, однако только в случае monoMSI частота изменений локуса BAT-25 значимо превышала частоту мутаций других маркеров (табл. 1). Таким образом, можно сделать вывод о том, что для ФЛ не характерно преимущественное вовлечение определенных хромосомных регионов при нестабильности микросателлитных локусов.

Ассоциации частоты LOH, monoMSI, EMAST с возрастом, стадией по классификации Ann Arbor, Международным прогностическим индексом фолликулярной лимфомы FLIPI, повышением уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ), лейкомизацией, моноклональной секрецией, В-симптомами, поражением костного мозга не отмечено.

Изменение микросателлитов по типу LOH оказалось в большей степени характерно для ФЛ морфологического типа 3В и для вариантов ФЛ с трансформацией в ДВККЛ, а также было ассоциировано с наличием крупных конгломератов лимфатического узла (>6 см, или bulky), в первую очередь паховой и внутригрудной локализации. Частота LOH была ниже в группе с экстранодальным поражением, под которым мы подразумевали вовлечение органов и тканей нелимфатической системы (табл. 2).

Феномен EMAST несколько чаще встречался в группах ФЛ морфологического типа 3В и трансформации, а также в группе double-hit ФЛ, однако различия не достигли статистической значимости (см. табл. 2).

Для случаев с аберрациями мононуклеотидных маркеров не отмечено связи ни с одним из рассматриваемых морфологических и клинических параметров.

В группе ВКЛВСЗ частота LOH составила 21/31 (67,8 %), monoMSI – 11/37 (29,7 %), EMAST – 13/31 (41,9 %). Феномен LOH у 7 пациентов был отмечен по 1 маркеру, у 5 – по 2, у 4 – по 3, у 1 – по 4, у 2 – по 5, у 1 – по 6, у 1 – по 7. Феномен monoMSI у 10 пациентов был отмечен по 1 маркеру, у 1 – по 2. Феномен

Таблица 1. Показатели LOH, топоMSI, EMAST по отдельным локусам при ФЛ, ВКЛВСЗ и ДВККЛ, %

Table 1. LOH, monoMSI, EMAST frequencies for individual loci in FL, DLBCL and HGBL, %

Локус Locus	ФЛ FL		ВКЛВСЗ HGBL		ДВККЛ DLBCL	
	LOH+	EMAST+	LOH+	EMAST+	LOH+	EMAST+
D1S1656*	8,1	1,3	15,4	0	11,1	10,3
D2S441	5,3	0	3,8	0	12,5	0
D3S1358	5,8	0	16,7	0	13,0	0
D5S818	6,7	1,4	0	4,8	4,5	7,7
D7S820	4,9	1,3	4,0	0	7,4	3,2
D8S1179**	0	3,9	13,6	3,3	0	3,2
D10S1248**	5,3	2,9	23,8	11,5	17,6	0
D12S391	5,8	1,3	16,7	6,5	6,9	0
D13S317	1,8	0	7,7	6,5	10,7	3,1
D16S539	6,6	1,3	9,5	3,3	16,7	0
D18S51**	11,9	1,3	20,8	0	35,7	6,3
D21S11	4,8	2,6	7,4	6,5	0	3,1
D22S1045	1,8	0	7,1	0	10,5	0
CSF1PO*	5,6	0	0	8,7	0	7,1
FGA*	7,6	0	15,4	3,2	4,2	9,7
SE33	14,3	5,1	12,0	13,8	21,4	10,3
TH01	5	0	8,0	0	3,8	3,1
TPOX	11,1	0	5,9	0	16,0	0
VWA	13,5	1,8	17,6	4,2	5,9	7,4
Амелогенин X Amelogenin X	0	0	0	0	0	0
Амелогенин Y** Amelogenin Y**	8,8	0	47,1	0	30,0	0
<i>p</i>	Незначимо Not significant	Незначимо Not significant	<0,05	Незначимо Not significant	<0,05	Незначимо Not significant
Локус Locus	моноMSI+		моноMSI+		моноMSI+	
BAT-25	8,9		11,4		17,1	
BAT-26	1,3		3,2		0	
NR-21	3,8		8,1		0	
NR-24***	0		5,6		0	
NR-27	1,3		5,4		2,9	
<i>p</i>	<0,05		Незначимо Not significant		<0,05	

*Значимые различия в частоте EMAST между нозологическими группами ($p < 0,05$). **Значимые различия в частоте LOH между нозологическими группами ($p < 0,05$). ***Значимые различия в частоте топоMSI между нозологическими группами ($p < 0,05$).

Примечание. Здесь, в табл. 2, 3 и на рис. 1–6: LOH – потеря гетерозиготности; MSI – микросателлитная нестабильность; топоMSI – микросателлитная нестабильность мононуклеотидных локусов; EMAST – абберации микросателлитных тетра-нуклеотидных повторов; ФЛ – фолликулярная лимфома; ВКЛВСЗ – В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности; ДВККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома.

*Significant differences in the EMAST frequency between nosological groups ($p < 0.05$). **Significant differences in the LOH frequency between nosological groups ($p < 0.05$). ***Significant differences in the monoMSI frequency between nosological groups ($p < 0.05$).

Note. Here in tables 2, 3 and Fig. 1–6: LOH – loss of heterozygosity; MSI – microsatellite instability; monoMSI – microsatellite instability of mono-nucleotide loci; EMAST – elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats; FL – follicular lymphoma; HGBL – high-grade B-cell lymphoma; DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma.

Таблица 2. Клинико-лабораторные ассоциации между LOH, моноMSI, EMAST при ФЛ, ВКЛВСЗ и ДВККЛ

Table 2. Clinical and laboratory associations between LOH, monoMSI, EMAST in FL, HGBL and DLBCL

Параметр Parameter	LOH-, n (%)	LOH+, n (%)	p	monoMSI-, n (%)	monoMSI+, n (%)	p	EMAST-, n (%)	EMAST+, n (%)	p
ФЛ FL									
Морфологический тип: Morphological type:									
1–2	16 (59,3)	11 (40,7)	0,01	24 (92,3)	2 (7,7)	0,45	23 (85,2)	4 (14,8)	0,10
3A	16 (66,7)	8 (33,3)		21 (84,0)	4 (16,0)		22 (91,7)	2 (8,3)	
3B и трансформация 3B and transformation	9 (30,0)	21 (70,0)		25 (80,7)	6 (19,3)		21 (70,0)	9 (30,0)	
Генетика double-hit: Double-hit genetics:									
нет no	18 (46,2)	21 (53,8)	0,83	32 (84,2)	6 (15,8)	0,38	33 (84,6)	6 (15,4)	0,29
есть yes	5 (50,0)	5 (50,0)		8 (72,7)	3 (27,3)		7 (70,0)	3 (30,0)	
Наличие конгломератов лимфатических узлов: Lymph nodes conglomerates:									
нет no	16 (66,7)	8 (33,3)	0,04	23 (85,2)	4 (14,8)	0,97	21 (87,5)	3 (12,5)	0,42
есть yes	23 (41,8)	32 (58,2)		45 (84,9)	8 (15,1)		44 (80,0)	11 (20,0)	
Наличие конгломератов лимфатических узлов вну- тригрудной локализации: Intrathoracic localization lymph nodes conglomerates:									
нет no	38 (52,1)	35 (47,9)	0,04	63 (85,1)	11 (14,9)	0,4	59 (80,8)	14 (19,2)	0,33
есть yes	0	4 (100)		4 (100)	0		4 (100)	0	
Наличие конгломератов лимфатических узлов паховой локализации: Inguinal localization lymph nodes conglomerates:									
нет no	38 (51,4)	36 (48,6)	0,1	64 (85,3)	11 (14,7)	0,75	60 (81,1)	14 (18,9)	0,28
есть yes	1 (20,0)	4 (80,0)		4 (80,0)	1 (20,0)		5 (100)	0	
Экстранодальное поражение: Extranodal lesion:									
нет no	19 (43,2)	25 (56,8)	0,11	37 (82,2)	8 (17,8)	0,4	34 (77,3)	10 (22,7)	0,3
есть yes	22 (61,1)	14 (38,9)		32 (88,9)	4 (11,1)		31 (86,1)	5 (13,9)	
ВКЛВСЗ HGBL									
Поражение костного мозга: Bone marrow involvement:									
нет no	5 (33,3)	10 (66,7)	0,9	10 (55,6)	8 (44,4)	0,05	8 (53,3)	7 (46,7)	0,6
есть yes	5 (31,3)	11 (68,7)		16 (84,2)	3 (15,8)		10 (62,5)	6 (37,5)	
Моноклональная секреция: Monoclonal secretion:									
нет no	4 (19,0)	17 (81,0)	0,12	20 (80,0)	5 (20,0)	0,05	12 (57,1)	9 (42,9)	0,24
есть yes	3 (50,0)	3 (50,0)		3 (42,9)	4 (57,1)		5 (83,3)	1 (16,7)	

Параметр Parameter	LOH-, n (%)	LOH+, n (%)	p	monoMSI-, n (%)	monoMSI+, n (%)	p	EMAST-, n (%)	EMAST+, n (%)	p
Поражение центральной нервной системы в дебюте: Initial central nervous system involvement:									
нет no	5 (20,0)	20 (80,0)	0,001	24 (77,4)	7 (22,6)	0,08	16 (64)	9 (36,0)	0,36
есть yes	4 (80,0)	1 (20,0)		2 (40,0)	3 (60,0)		2 (40,0)	3 (60,0)	
ДВККЛ DLBCL									
Тип ДВККЛ: DLBCL type:									
non-GCB	7 (29,2)	17 (70,8)	0,03	23 (85,2)	4 (14,8)	0,7	16 (59,3)	11 (40,7)	0,43
GCB	4 (80,0)	1 (20,0)		4 (80,0)	1 (20,0)		2 (40,0)	3 (60,0)	

Примечание. GCB – с фенотипом В-клеток герминального центра.
Note. GCB – germinal center B-cell-like.

EMAST у 8 пациентов был отмечен по 1 маркеру, у 3 – по 2, у 1 – по 3, у 1 – по 4.

Примеры генетических нарушений по типу EMAST и LOH у одного из больных ФЛ представлены на рис. 1.

Изменения микросателлитов различной хромосомной локализации встречались со средней частотой 12 (0–47,1) % для LOH, 6,7 (3,2–11,4) % для monoMSI, 3,4 (0–13,8) % для EMAST (см. табл. 1). Только в случае LOH частота делеций локуса амелогенина Y значительно превышала частоту мутаций других маркеров. Среди других маркеров с высокой частотой LOH можно отметить локусы хромосомы 10 и 18 (>20 %), однако различия этих частот не были статистически значимы. В отношении

monoMSI и EMAST преимущественное вовлечение определенных хромосомных регионов при ВКЛВСЗ не выявлено.

Ассоциации частоты LOH, monoMSI, EMAST с возрастом, стадией по классификации Ann Arbor, Международным прогностическим индексом IPI, повышением уровня ЛДГ, В-симптомами, генотипом double-hit, морфологией ВКЛВСЗ/ДВККЛ не отмечено.

Изменение микросателлитов по типу LOH оказалось не характерно для больных с вовлечением центральной нервной системы в дебюте заболевания, однако в этой группе пациентов чаще встречались aberrации мононуклеотидных маркеров, несмотря на отсутствие статистической значимости. Также частота monoMSI была значимо выше при наличии поражения костного мозга и моноклональной секреции (см. табл. 2).

Для случаев EMAST не отмечено связи ни с одним из рассматриваемых морфологических и клинических параметров.

В группе ДВККЛ частота LOH составила 18/29 (62,0 %), monoMSI – 5/32 (15,6 %), EMAST – 14/32 (43,8 %). Феномен LOH у 5 пациентов был отмечен по 1 маркеру, у 3 – по 2, у 4 – по 3, у 4 – по 4, у 1 – по 5, у 1 – по 6. Феномен MSI у 3 пациентов был отмечен по 1 маркеру, у 2 – по 2. Феномен EMAST у 12 пациентов был отмечен по 1 маркеру, у 1 – по 2, у 1 – по 3.

Изменения микросателлитов различной хромосомной локализации встречались со средней частотой 10,9 (0–35,7) % для LOH, 4,0 (0–17,1) % для monoMSI, 3,6 (0–10,3) % для EMAST (см. табл. 1). В случае LOH частоты aberrаций локуса D18S51 и локуса BAT-25 в случае monoMSI были выше, чем частоты мутаций других маркеров. В отношении EMAST преимущественное вовлечение определенных хромосомных регионов при ДВККЛ не выявлено.

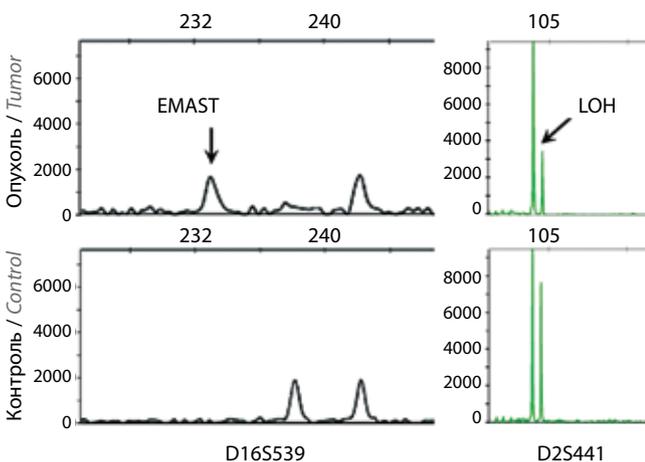


Рис. 1. Примеры генетических нарушений по типу EMAST и LOH. По оси абсцисс указана длина ПЦР-продукта, пар нуклеотидов; по оси ординат – интенсивность флуоресценции ПЦР-продукта. ПЦР – полимеразная цепная реакция

Fig. 1. Examples of EMAST and LOH patterns. The X axis indicates the length of the PCR product, bp; the Y axis indicates the fluorescence intensity of the PCR product. PCR – polymerase chain reaction

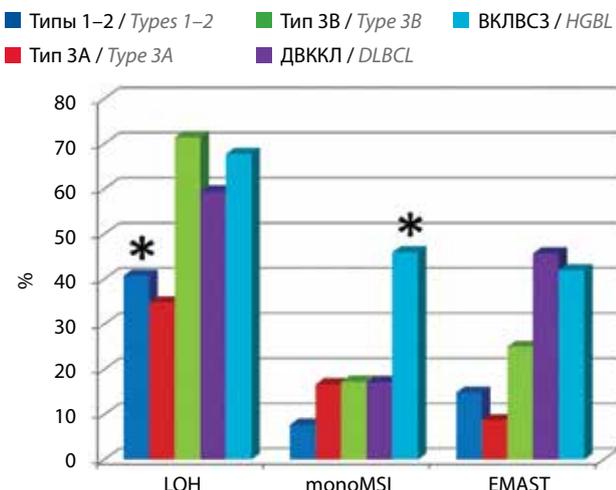


Рис. 2. Частоты LOH, monoMSI, EMAS при ФЛ различных морфологических типов, ДВККЛ и ВКЛВСЗ. Звездочкой отмечены статистически значимые при $p < 0,05$ различия внутри групп
Fig. 2. Frequencies of LOH, monoMSI, EMAS in FL of various morphological types, DLBCL, and HGBL. An asterisk marks statistically significant differences within the groups with $p < 0.05$

Ассоциации частоты LOH, monoMSI, EMAS с возрастом, стадией по классификации Ann Arbor, Международным прогностическим индексом IPI, повышением уровня ЛДГ не отмечено.

Изменение микросателлитов по типу LOH оказалось в большей степени характерно для варианта ДВККЛ non-GCB (germinal center B-cell-like), значимых различий между non-GCB и GCB ДВККЛ для случаев EMAS и monoMSI не отмечено (см. табл. 2).

Частота LOH была сравнима между 3 нозологическими формами, однако при изолированном рассмотрении морфологических типов ФЛ выявлено, что частоте LOH при ДВККЛ и ВКЛВСЗ соответствовала только частота aberrаций при ФЛ типа 3В и трансформации, в то время как в случае цитологических типов 1–2 и 3А частота LOH была значимо ниже ($p < 0,05$) (рис. 2). Максимальная частота monoMSI отмечена при ВКЛВСЗ, при прочих нозологических формах она была существенно меньше. Максимальная частота EMAS выявлена при ДВККЛ и ВКЛВСЗ, минимальная – при ФЛ цитологических типов 1–2 и 3А (см. рис. 2). Частота EMAS при ФЛ типа 3В и трансформации занимала промежуточное значение между ними, однако без статистически значимых различий (см. рис. 2).

В целом частоты LOH, monoMSI, EMAS отдельных микросателлитных локусов при 3 нозологических формах были сопоставимы друг с другом, за исключением нескольких статистически значимых различий при $p < 0,05$, что отражено в табл. 1. Так, частота LOH по локусу D18S51 была существенно выше в случае ДВККЛ, а частота делеций локуса амелогенина Y – в случае ВКЛВСЗ. При ФЛ и ДВККЛ не отмечено aberrаций локуса NR-24 в отличие от ВКЛВСЗ. Феномен EMAS по локусам D1S1656, CSF1PO, FGA практически не встречался при ФЛ, но присутствовал при ДВККЛ и отчасти при ВКЛВСЗ.

Анализ эффективности терапии в зависимости от статуса LOH, monoMSI, EMAS. Наличие или отсутствие различных вариантов aberrаций микросателлитов не было ассоциировано с результатом терапии 1-й линии. Однако частота наступления событий (рецидивов/прогрессирования заболевания) оказалась значимо выше в группе LOH+ (60 % против 40 %; $\chi^2 = 3,6$; $df = 1$; $p = 0,05$) в общей группе ФЛ.

При изолированном анализе морфологических типов ФЛ было показано, что указанные зависимости не воспроизводятся в группе морфологических типов 1–2 и типа 3В ФЛ. Однако для типа 3А была подтверждена связь LOH+ с вероятностью наступления событий (58 % против 8 %; $\chi^2 = 6,75$; $df = 1$; $p = 0,009$).

Достоверных различий в показателях общей выживаемости (ОВ) в зависимости от статуса LOH в общей группе не получено, однако наблюдалась тенденция к увеличению ОВ без наличия LOH (5-летняя ОВ в группе LOH– составила 78 % против 60 % в группе LOH+). Более высокая ОВ также оказалась ассоциирована с отсутствием aberrаций по типу monoMSI (*log-rank-тест*, $p = 0,02$; 5-летняя ОВ 71 % против 38 %) и EMAS (*log-rank-тест*, $p = 0,09$; 5-летняя ОВ 73 % против 62 %).

Бессобытийная выживаемость (БСВ) оказалась значимо ниже при наличии LOH (*log-rank-тест*, $p = 0,01$; 5-летняя БСВ 65 % против 30 %) (рис. 3). Подобная же зависимость была выявлена в случае наличия EMAS (*log-rank-тест*, $p = 0,02$; 5-летняя БСВ 51 % против 26 %) (см. рис. 3), в то время как наличие aberrаций monoMSI не влияло на выживаемость пациентов.

При изолированном анализе морфологических типов ФЛ было показано, что указанные зависимости не воспроизводятся в группе морфологических типов 1–2. Таким образом, для индолентной ФЛ ассоциации различных типов aberrаций микросателлитов с прогнозом заболевания не обнаружено.

В группе ФЛ типа 3А наличие LOH было значимо ассоциировано со снижением ОВ (*log-rank-тест*, $p = 0,04$; 5-летняя ОВ 85 % против 45 %) и БСВ (*log-rank-тест*, $p = 0,01$; 5-летняя БСВ 70 % против 16 %). Также наличие EMAS оказалось неблагоприятным фактором прогноза пациентов по ОВ (*log-rank-тест*, $p = 0,03$; 5-летняя ОВ 78 % против 0 %) и БСВ (*log-rank-тест*, $p = 0,05$; 5-летняя БСВ 52 % против 0 %). Данные не иллюстрированы. Показательно, что ни один пациент с ФЛ типа 3А с наличием EMAS не пережил 2,5 года с момента начала заболевания.

В группе ФЛ типа 3В и трансформации в ДВККЛ ассоциация наличия LOH с более низкой ОВ была выражена менее ярко и не достигла статистической значимости (*log-rank-тест*, $p = 0,2$; 5-летняя ОВ 56 % против 44 %), в то время как влияние EMAS на ОВ не отмечено вовсе. БСВ в группе ФЛ типа 3В оказалась сопоставима в группах с наличием и отсутствием различных вариантов aberrаций микросателлитных повторов.

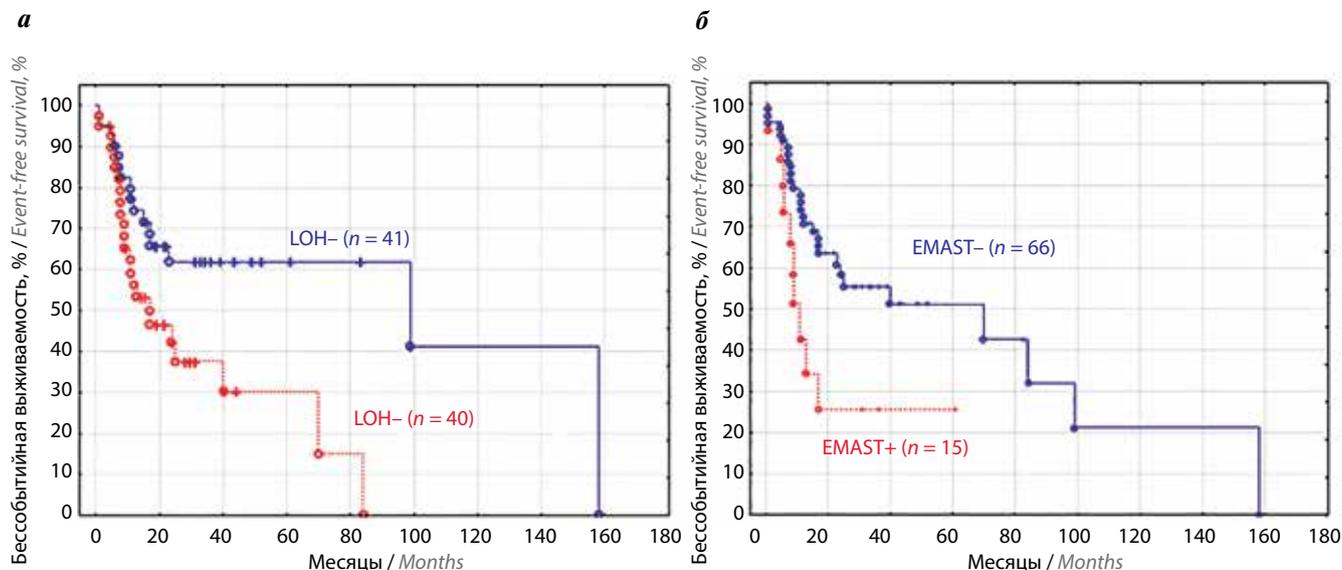


Рис. 3. Бессобытийная выживаемость пациентов с ФЛ в зависимости от статуса LOH (а) и EMAST (б)
Fig. 3. Event-free survival of FL patients depending on LOH (а) and EMAST (б) status

Группы LOH+ и LOH– были не полностью сбалансированы по вариантам проводимой терапии 1-й линии, а именно частота проведения высокодозной блоковой терапии оказалась значимо выше ($\chi^2 = 12,5$; $df = 5$; $p = 0,03$) в группе наличия LOH, преимущественно за счет случаев ЗВ и трансформации в ДВККЛ.

Таким образом, выделено несколько факторов, потенциально оказывающих влияние на прогноз выживаемости, что потребовало проведения многофакторного анализа, а именно анализа регрессионной модели Кокса. В общей выборке ФЛ оценивалась ассоциация с БСВ следующих факторов: морфологического типа (1–2 типы против ФЛ более высоких градаций), варианта терапии (высокодозная блоковая терапия против курсов R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон) и CHOP-like), LOH (наличие против отсутствия аберраций), EMAST (наличие против отсутствия аберраций).

При анализе регрессионной модели Кокса было показано, что морфологические типы 1–2 ФЛ ассоциированы с более высокой БСВ, в то время как наличие LOH и EMAST является независимым фактором неблагоприятного прогноза (табл. 3). При анализе выживаемости методом Каплана–Майера ранее было показано, что наиболее ярко значение LOH и EMAST выражено для ФЛ типа 3А.

Большая часть пациентов с ВКЛВСЗ (60 %) получали лечение по протоколам блоковой терапии (m-NHL-BFM-90, ЛБ-М-04), 35 % – R-DA-EPOCH, 5 % – R-CHOP. Наличие LOH оказалось ассоциировано с прогрессированием заболевания на фоне индукционной терапии ВКЛВСЗ ($\chi^2 = 3,6$; $df = 1$; $p = 0,05$) в общей выборке пациентов. Кроме этого, частота событий (рецидивов/прогрессирования) в группе LOH+ была несколько выше, чем в группе LOH–

Таблица 3. Результаты многофакторного анализа влияния LOH и EMAST на бессобытийную выживаемость при ФЛ

Table 3. Results of Cox analysis of LOH and EMAST effect on event-free survival in FL patients

Параметр Parameter	HR	CI	p
Морфологический тип Morphological type			
Типы 1–2 Types 1–2	0,37	0,16–0,86	0,02
Типы 3А и 3В с трансформацией в ДВККЛ Types 3A and 3B with transformation to DLBCL	Контрольная группа Control group		
Терапия Therapy			
Высокодозная блоковая терапия High-dose blocks therapy	0,73	0,24–2,2	0,57
Курсы R-CHOP и CHOP-like R-CHOP и CHOP-like courses	Контрольная группа Control group		
LOH			
LOH+	2,3	1,15–4,6	0,02
LOH–	Контрольная группа Control group		
EMAST			
EMAST+	2,17	1,01–4,7	0,05
EMAST–	Контрольная группа Control group		

(84 % против 56 %), однако данные различия не достигли статистической значимости ($\chi^2 = 2,9$; $df = 1$; $p = 0,08$).

Феномены MSI и EMAST не были связаны с изменением ОВ и БСВ, в то время как наличие LOH оказалось ассоциировано со снижением ОВ (*log-rank-тест*, $p = 0,2$; 5-летняя ОВ 89 % против 63 %) и БСВ (*log-rank-тест*; $p = 0,017$; 5-летняя БСВ 58 % против 38 %) (рис. 4).

При проведении многофакторного анализа вариант терапии и наличие EMAST оказались не связаны с прогнозом выживаемости, в то время как наличие LOH было единственным независимым фактором, ассоциированным со снижением БСВ (отношение рисков 3,7; 95 % доверительный интервал 0,01–16,7; $p = 0,05$).

Среди пациентов с ДВККЛ лечение по протоколу блоковой терапии m-NHL-BFM-90 получали 44 %, R-DA-EPOCH – 37 %, R-CHOP – 19 %. Группы с наличием или отсутствием LOH, monoMSI, EMAST были сбалансированы по вариантам проведенной терапии.

Различные варианты aberrаций микросателлитов не были ассоциированы с результатом терапии 1-й линии или вероятностью наступления событий. ОВ и БСВ пациентов в группах LOH+/-, monoMSI+/-, EMAST+/- была сопоставима. Единственным фактором неблагоприятного прогноза для ДВККЛ оказался факт проведения иницилирующей терапии по программе R-CHOP.

Анализ сочетанного влияния LOH и EMAST на выживаемость пациентов. Поскольку при анализе ОВ и БСВ пациентов с ФЛ было показано, что наличие LOH и EMAST является независимым фактором снижения выживаемости, был проведен анализ, направленный на выявление значения ассоциации сочетания вариантов LOH, MSI и EMAST с прогнозом заболевания. Корреляции между случаями LOH+/-, MSI+/- и EMAST+/- не отмечено. Предварительно был выполнен кластерный анализ, который показал, что

наибольший вклад в разделение случаев по кластерам вносят переменные LOH и EMAST. По этой причине в дальнейшем мы оценивали выживаемость пациентов в общей когорте ФЛ в следующих группах: 1-я – LOH-/EMAST-, 2-я – LOH+/EMAST-, 3-я – LOH-/EMAST+, 4-я – LOH+/EMAST+.

Как продемонстрировано на рис. 4, ОВ не отличается в 4 рассмотренных группах, хотя тенденция к снижению ОВ прослеживается в подгруппах LOH+. В случае БСВ были выявлены яркие различия у пациентов с различным статусом LOH/EMAST (рис. 5).

Показатели 5-летней БСВ в 1-й группе составили 61 %, во 2-й – 38 %, в 3-й – 67 %. В 4-й группе ни один из пациентов не пережил порог 18 мес без событий. Практически сопоставимы друг с другом оказались 1-я и 3-я группы, что позволяет предполагать, что факт наличия EMAST не обладает самостоятельным прогностическим и патогенетическим значением. Для 1-й и 3-й групп показатели БСВ были максимальными. В случае сочетания с LOH aberrации по типу EMAST ухудшали прогноз пациентов, и эта группа (4-я) отличалась наиболее неблагоприятным течением с 100 % развитием ранних событий. Промежуточное положение занимала 3-я группа.

Подобные же зависимости были прослежены в группе ВКЛВСЗ, однако в силу меньшего числа пациентов в когорте выявленные различия не достигли статистической значимости (рис. 6).

В группе ДВККЛ ассоциации статуса LOH/EMAST с показателями выживаемости пациентов не отмечено, что согласуется с представленными ранее данными однофакторного анализа.

Обсуждение

Значение MSI, в частности EMAST, подробно изучено на примере солидных новообразований, в том числе синдрома Линча. Известны патогенетические

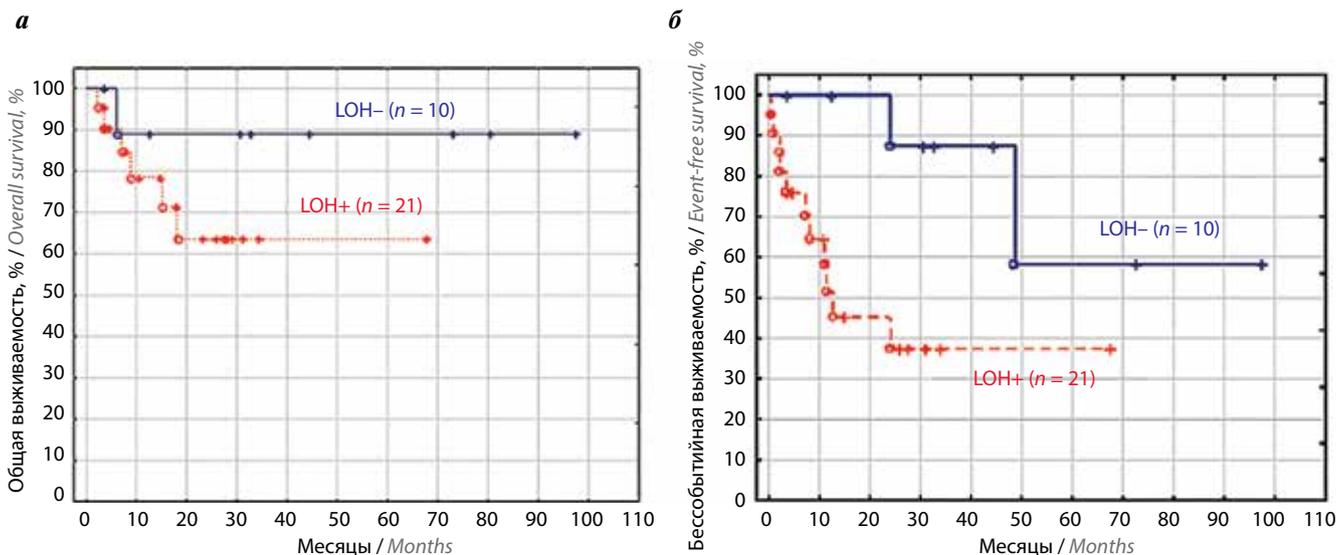


Рис. 4. Общая (а) и бессобытийная (б) выживаемость пациентов с ВКЛВСЗ в зависимости от статуса LOH

Fig. 4. Overall (a) and event-free (b) survival of HGBL patients depending on LOH status

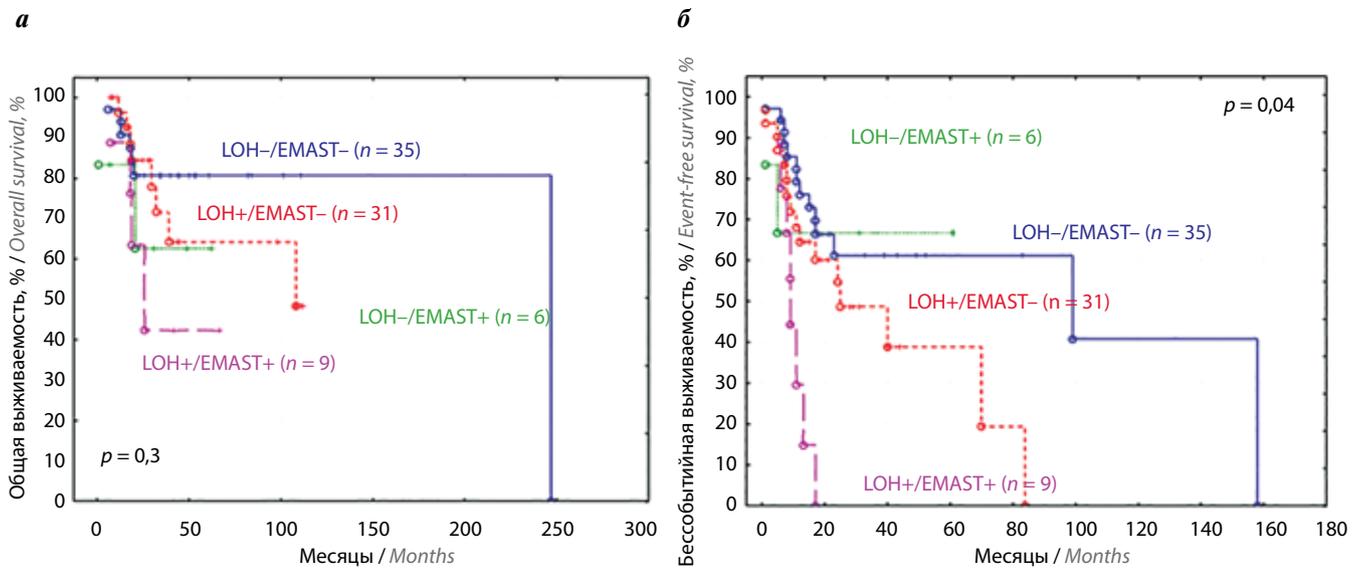


Рис. 5. Ассоциация совокупности статуса LOH и EMAST с общей (а) и бессобытийной (б) выживаемостью пациентов с ФЛ
 Fig. 5. The association of LOH and EMAST combination with overall (a) and event-free (б) survival in FL patients

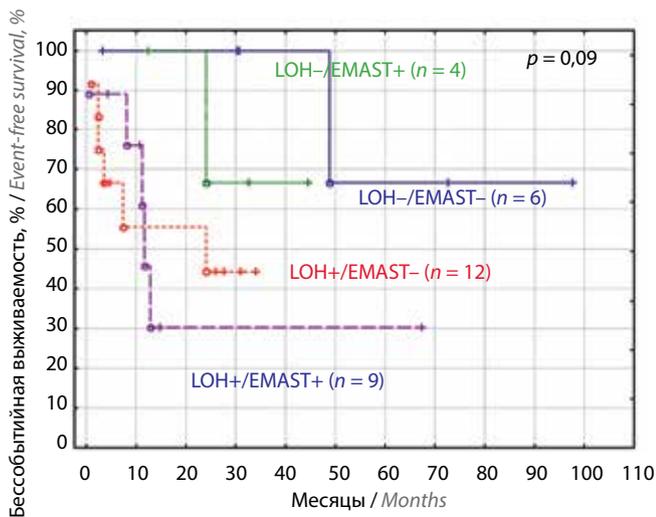


Рис. 6. Ассоциация совокупности статуса LOH и EMAST с бессобытийной выживаемостью пациентов с ВКЛВСЗ
 Fig. 6. The association of LOH and EMAST combination with event-free survival in HGBL patients

механизмы возникновения и следствия этих генетических aberrаций, которые непосредственно определяют биологию опухоли.

Выполненное исследование нестабильности коротких tandemных повторов при НХЛ имело цель определить характер нарушений микросателлитов и сопоставить его с известными данными в отношении MSI- и EMAST-положительных опухолей. На основании их сходства и/или различия было бы правомочным рассматривать возможность переноса закономерностей из области солидной онкологии в область онкогематологии.

Известно, что тип изменения микросателлитных повторов зависит от варианта функционального дефицита белков комплекса репарации. В частности, появление множества новых аллелей локусов моноукле-

отидных повторов специфично для дефицита белков MLH1, MSH2, MSH5 и характеризует классический вариант MSI-H-положительных опухолей [21–23]. Суть EMAST заключается в изменении длины тетра-уклеотидных маркеров, что связано с дефектом MSH3 – белкового компонента системы MMR [24]. Показано, что патогенетически феномен MSI-L идентичен EMAST [9].

Наблюдаемые в проведенном исследовании изменения микросателлитов в большей степени соответствовали EMAST и MSI-L на основании следующих заключений. Несмотря на то что у ряда пациентов при анализе пятиплексной панели мононуклеотидных локусов, составляющих модифицированную панель Bethesda, рекомендованную для клинической диагностики, были отмечены aberrации 2 из 5 маркеров, что составляет 40 % и является, таким образом, формальным признаком MSI-H – сам характер aberrаций не соответствует MSI-H [6, 25].

Как уже было отмечено, MSI-H характеризуется появлением множественных опухолевых аллелей, значительно отличающихся по длине от нормального распределения ПЦП-продуктов в контрольном образце [26]. Во всех случаях aberrаций мононуклеотидных маркеров в исследованной нами выборке пациентов изменения локусов в опухолевой ткани носили характер незначительного изменения длины преобладающего ПЦП-продукта, что не позволяет строго дифференцировать феномен нестабильности от LOH и, во всяком случае, ярко демонстрирует отличие от MSI-H.

Очевидно, что профиль распределения aberrантных аллелей, идентифицируемый на электрофореграммах, отражает патогенетические особенности их возникновения, в частности тип дефекта системы MMR. В связи с этим нестабильность мононуклеотидных локусов при НХЛ не равнозначна MSI солидных

новообразований и в большей степени соответствует MSI-L и EMAST. Данное сопоставление основано не на принятом определении MSI-H, MSI-L, EMAST согласно критериям Bethesda, а именно на сравнении патогенеза возникновения аберраций микросателлитов. Различие патогенеза, в свою очередь, является обоснованием различий клинических следствий MSI при раке и в онкогематологии, в частности в отношении целесообразности назначения ингибиторов иммунных контрольных точек при выявлении нарушений мононуклеотидных микросателлитных локусов. Безусловно, что ингибиторы иммунных контрольных точек имеют рекомендованную область применения при опухолях системы крови, что было доказано во многих исследованиях, однако на основании других предикторов эффективности, в частности экспрессии PD-1 или PD-L1.

Феномен EMAST, как и MSI-L, ассоциируется с провоспалительным фоном в ткани опухоли, что впервые было продемонстрировано на примере колоректального рака. Кроме этого, нестабильность микросателлитов с длиной мономера от 2 нуклеотидов может быть обнаружена при неопухолевых заболеваниях, связанных с хроническим воспалением [27–29]. Известно, что НХЛ иногда сочетаются с инфильтрацией реактивными лимфоцитами и/или гранулоцитами. В этом контексте появление EMAST и MSI-L в части случаев представляется вполне закономерным. К сожалению, у нас не было возможности оценить выраженность реактивной инфильтрации у пациентов EMAST+ и monoMSI+ в сравнении со случаями без аберраций микросателлитов. Подобный анализ позволил бы провести параллель с колоректальным раком и подтвердить облигатность ассоциации EMAST с воспалением.

Значение вовлечения отдельных локусов в процесс развития monoMSI и EMAST, несмотря на выявленные различия между нозологическими формами, остается не ясным. С одной стороны, преимущественное нарушение того или иного маркера свидетельствует о неслучайном характере изменений. С другой стороны, подавляющее количество микросателлитов принадлежит некодирующей ДНК и следствия их мутаций неочевидны [30]. Возможно, более высокая частота аберраций того или иного локуса отражает общие изменения степени конденсации хроматина соответствующего хромосомного региона, что непосредственно влияет на активность репарации и, следовательно, ее ошибок.

Согласно полученным результатам, феномен нестабильности, как EMAST, так и monoMSI, ассоциирован с агрессивностью опухоли. Так, максимальная частота EMAST оказалась характерна для ВКЛВСЗ и ДВККЛ, а monoMSI — для ВКЛВСЗ. ФЛ представляет собой гетерогенную группу по частоте аберраций микросателлитов. Случаи более высокой градации, такие как ФЛ типа 3В и трансформации в крупноклеточную

лимфому, сопоставимы по частоте EMAST и monoMSI с ВКЛВСЗ и ДВККЛ. Подобная закономерность указывает на то, что феномен изменения микросателлитов не обладает строгой нозологической специфичностью и в большей степени отражает универсальные характеристики опухоли, вероятно, связанные с ее пролиферативной активностью и общей мутационной нагрузкой.

Высокий процент LOH, выявленный в исследовании, в целом согласуется с известными данными о распространенности хромосомных нарушений при НХЛ [31, 32]. Подобно EMAST и monoMSI, значение преобладания LOH отдельных локусов при сравниваемых нозологических формах до конца не ясно. Факт высокой частоты LOH локуса D18S51 при НХЛ, в частности при ДВККЛ, может быть связан с тем, что хромосома 18, на которой расположены гены тяжелых цепей иммуноглобулинов, является частым участником геномных перестроек при опухолях лимфоидной природы. В то же время локусы других хромосом, для которых в настоящем исследовании отмечена высокая частота LOH, не соответствуют известным ранее активным сайтам хромосомных перестроек при НХЛ [33]. Вероятно, данный факт требует дополнительного исследования.

Наибольший интерес среди результатов проведенной работы имеет выявление ассоциации EMAST и LOH с течением заболевания и выживаемостью пациентов. В настоящее время ни одна из существующих прогностических моделей для НХЛ, включающих как рутинные клинические параметры, так и новые генетические маркеры, не обладает чувствительностью и специфичностью, достаточными для формирования точного прогноза заболевания и выбора терапии в случае каждого конкретного больного [34–37].

LOH выделяет группу пациентов с неблагоприятным прогнозом ФЛ и ВКЛВСЗ, высокой вероятностью событий, преимущественно ранних, и сниженной, по сравнению с контрольной группой, ОВ и БСВ. Анализ EMAST позволяет дополнительно выявить в когорте LOH+ выборку больных с наиболее агрессивным течением заболевания. В случае ДВККЛ ассоциации LOH, EMAST с выживаемостью не отмечено, что, вероятно, связано с особенностями терапии данной группы больных. Практика лечения ДВККЛ в НМИЦ гематологии предполагает обязательное назначение высокодозной химиотерапии по программе m-NHL-BFM-90 или R-DA-EPOCH, что позволяет достичь максимальной эффективности лечения [38, 39]. Возможно, блоковая терапия нивелирует патогенетические различия между генотипами опухоли LOH+/- и EMAST+/-, что, несомненно, интересно и заслуживает дополнительного исследования. Однако стоит отметить, что и в группе ФЛ были пациенты, которым проводилась терапия по блоковой программе, а в группе ВКЛВСЗ они составляли большинство, и, тем не менее, в этих когортах сохранялась ассоциация EMAST и LOH с неблагоприятным

прогнозом. Таким образом, терапия не является ключевым фактором, определяющим прогностическое значение aberrаций микросателлитов.

Заключение

Феномены MSI, в частности EМАST, и LОН имеют место при ФЛ, ДВККЛ и ВКЛВСЗ. Более высокая частота генетических aberrаций характерна для лимфом с более агрессивной морфологией. Строгой зависимости между нозологическими формами и преимущественным вовлечением отдельных микросателлитных локусов не выявлено. MSI, которая имеет место при НХЛ, не соответствует определению MSI-H – типу нестабильности, характерному для синдрома Линча и подобных ему солидных новообразований, и в большей степени отражает патогенетические пути возник-

новения MSI-L и EМАST. По этой причине при НХЛ нельзя ожидать воспроизведения клинических следствий MSI-H, в частности целесообразности назначения ингибиторов иммунных контрольных точек, исключительно на основании выявления aberrаций мононуклеотидных локусов, несмотря на то что этот класс препаратов имеет доказанную область применения, но при наличии других молекулярных предикторов эффективности. Наличие LОН и EМАST, а особенно их сочетание, позволяет выделить группу пациентов с ФЛ и ВКЛВСЗ с неблагоприятным течением заболевания и высокой вероятностью ранних событий, что может быть полезным в дифференцированном лечебно-диагностическом подходе к данным пациентам. При ДВККЛ ассоциация LОН и EМАST с выживаемостью пациентов не отмечена.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S. et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363(6429):558–61. DOI: 10.1038/363558a0.
- Boland C.R., Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138(6):2073–87.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.064.
- Ballhausen A., Przybilla M.J., Jendrusch M. et al. The shared frameshift mutation landscape of microsatellite-unstable cancers suggests immunoediting during tumor evolution. *Nat Commun* 2020;11(1):4740. DOI: 10.1038/s41467-020-18514-5.
- Gryfe R., Kim H., Hsieh E.T. et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342(2):69–77. DOI: 10.1056/NEJM20001133420201.
- Oliveira A.F., Bretes L., Furtado I. Review of PD-1/PD-L1 inhibitors in metastatic dMMR/MSI-H colorectal cancer. *Front Oncol* 2019;9:396. DOI: 10.3389/fonc.2019.00396.
- Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58(22):5248–57.
- Carethers J.M. Microsatellite instability pathway and EМАST in colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2017;13(1):73–80. DOI: 10.1007/s11888-017-0352-y.
- Carethers J.M., Koi M., Tseng-Rogenski S.S. EМАST is a form of microsatellite instability that is initiated by inflammation and modulates colorectal cancer progression. *Genes (Basel)* 2015;6(2):185–205. DOI: 10.3390/genes6020185.
- Torshizi Esfahani A., Seyedna S.Y., Nazemalhosseini Mojarad E. et al. MSI-L/EМАST is a predictive biomarker for metastasis in colorectal cancer patients. *J Cell Physiol* 2019;234(8):13128–36. DOI: 10.1002/jcp.27983.
- Murthy S.K., DiFrancesco L.M., Ogilvie R.T., Demetrick D.J. Loss of heterozygosity associated with uniparental disomy in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002;15(12):1241–50. DOI: 10.1097/01.MP.0000032535.62750.D1.
- Heidenreich E., Novotny R., Kneidinger B. et al. Non-homologous end joining as an important mutagenic process in cell cycle-arrested cells. *EMBO J* 2003;22(9):2274–83. DOI: 10.1093/emboj/cdg203.
- Randerson J., Cawkwell L., Jack A. et al. Microsatellite instability in follicle centre cell lymphoma. *Br J Haematol* 1996;93(1):160–2. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1996.456994.x.
- Gamberi B., Gaidano G., Parsa N. et al. Microsatellite instability is rare in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997;89(3):975–9.
- Nagy M., Balázs M., Adám Z. et al. Genetic instability is associated with histological transformation of follicle center lymphoma. *Leukemia* 2000;14(12):2142–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2401978.
- Miyashita K., Fujii K., Yamada Y. et al. Frequent microsatellite instability in non-Hodgkin lymphomas irresponsive to chemotherapy. *Leuk Res* 2008;32(8):1183–95. DOI: 10.1016/j.leukres.2007.11.024.
- Tian T., Li J., Xue T. et al. Microsatellite instability and its associations with the clinicopathologic characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med* 2020;9(7):2330–42. DOI: 10.1002/cam4.2870.
- Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В. и др. Определение минимальной остаточной болезни у больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом методом пациентспецифичной ПЦР. Клиническая лабораторная диагностика 2011;12:22–4. [Sidorova Yu.V., Sorokina T.V., Biderman B.V. et al. Determination of minimal residual disease in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia by patient-specific PCR. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2011;12:22–4. (In Russ.)].
- Sidorova J.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin – embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Exp Dermatol* 2012;21(1):57–60. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01375.x.
- Van Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98–3936. *Leukemia* 2003;17(12):2257–317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.
- Смирнова С.Ю., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В. и др. Эволюция опухолевых клонов при остром лимфобластном лейкозе взрослых. *Acta Naturae* 2016;8:108–17. [Smirnova S.Yu., Sidorova Yu.V., Ryzhikova N.V. et al. Evolution of tumor clones in adult acute lymphoblastic leukemia. *Acta Naturae* 2016;8:108–17. (In Russ.)].
- Fishel R., Kolodner R.D. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr*

- Opin Genet Dev 1995;5(3):382–95. DOI: 10.1016/0959-437x(95)80055-7.
22. Miyaki M., Konishi M., Tanaka K. et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17(3):271–2. DOI: 10.1038/ng1197-271.
 23. Kane M.F., Loda M., Gaida G.M. et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57(5):808–11.
 24. Haugen A.C., Goel A., Yamada K. et al. Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68(20):8465–72. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0002.
 25. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(4):261–8. DOI: 10.1093/jnci/djh034.
 26. Duval A., Rolland S., Compoint A. et al. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Hum Mol Genet* 2001;10(5):513–8. DOI: 10.1093/hmg/10.5.513.
 27. Paraskakis E., Sourvinos G., Passam F. et al. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in bronchial asthma. *Eur Respir J* 2003;22(6):951–5. DOI: 10.1183/09031936.03.00010503.
 28. Spandidos D.A., Ergazaki M., Arvanitis D., Kiaris H. Microsatellite instability in human atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220(1):137–40. DOI: 10.1006/bbrc.1996.0370.
 29. Chizhikov V., Chikina S., Gasparian A. et al. Cancer-associated molecular alterations in bronchial epithelium of former Chernobyl cleanup workers in comparison with smokers and non-smokers without ionizing radiation exposure. *Eur J Cancer* 2001;37(6):153. DOI: 10.1016/s0959-8049(01)81050-9.
 30. Vieira M.L., Santini L., Diniz A.L., Munhoz Cde F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol* 2016;39(3):312–28. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.
 31. Wafa A., Moassass F., Liehr T. et al. A high complex karyotype involving eleven chromosomes including three novel chromosomal aberrations and monoallelic loss of TP53 in case of follicular lymphoma transformed into B-cell lymphoblastic leukemia. *Mol Cytogenet* 2016;9:91. DOI: 10.1186/s13039-016-0300-6.
 32. Cohen J.B., Ruppert A.S., Heerema N.A. et al. Complex karyotype is associated with aggressive disease and shortened progression-free survival in patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15(5):278–85.e1. DOI: 10.1016/j.clml.2014.12.012.
 33. Tilly H., Rossi A., Stamatoullas A. et al. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 1994;84(4):1043–9.
 34. Casulo C., Byrtek M., Dawson K.L. et al. 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. *J Clin Oncol* 2015;33(23):2516–22. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.7534.
 35. Solal-Céligny P., Roy P., Colombat P. et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104(5):1258–65. DOI: 10.1182/blood-2003-12-4434.
 36. Federico M., Bellei M., Marcheselli L. et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol* 2009;27(27):4555–62. DOI: 10.1200/JCO.2008.21.3991.
 37. Pastore A., Jurinovic V., Kridel R. et al. 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. *Lancet Oncol* 2015;16(9):1111–22. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00169-2.
 38. Багова М.О., Магомедова А.У., Кравченко С.К. и др. Фармакоэкономический анализ комбинированной иммунохимиотерапии R-DA-EPOCH и R-MNHL-BFM-90 у пациентов с прогностически неблагоприятной диффузной В-крупноклеточной лимфомой в рамках многоцентрового клинического исследования ДВККЛ-2015. *Клиническая онкогематология* 2021;14(3):321–32. [Bagova M.O., Magomedova A.U., Kravchenko S.K. et al. Pharmacoeconomic analysis of combined immunochemotherapy R-DA-EPOCH and R-MNHL-BFM-90 in patients with prognostically unfavorable diffuse large B-cell lymphoma in the multicenter clinical trial DLBCL-2015. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2021;14(3):321–32. (In Russ.)]. DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-3-321-332.
 39. Магомедова А.У., Сычевская К.Н., Моисеева Т.Н. и др. Промежуточные результаты многоцентрового, рандомизированного, контролируемого (сравнительного) открытого, проспективного исследования по оценке эффективности программ R-DA-EPOCH-21, R-mNHL-BFM-90 и трансплантации аутологичных стволовых кровяных клеток у нелеченных больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой с признаками неблагоприятного прогноза – протокол ДВККЛ-2015. *Гематология и трансфузиология* 2020;65(S1):35. [Magomedova A.U., Sychevskaya K.N., Moiseeva T.N. et al. Interim results of a multicenter, randomized, controlled (comparative), open-label, prospective study evaluating the effectiveness of the R-DA-EPOCH-21, R-mNHL-BFM-90 programs and autologous hematopoietic stem cell transplantation in untreated patients with diffuse large B-cell lymphoma with unfavorable prognosis – DLBCL-2015 protocol. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology* 2020;65(S1):35. (In Russ.)].

Вклад авторов

К.А. Сычевская: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка данных, подготовка рукописи, анализ и интерпретация данных;

А.Е. Мисюринина, Е.Е. Никулина, Н.В. Рисинская, Р.Р. Абдурашидова, З.Т. Саракеева, А.У. Магомедова: сбор и обработка данных;

А.Б. Судариков: анализ и интерпретация данных;

С.К. Кравченко: разработка концепции и дизайна исследования, подготовка рукописи, анализ и интерпретация данных.

Authors' contributions

K.A. Sychevskaya: concept and design development, data collection, article writing, data analysis and interpretation;

A.E. Misyurina, E.E. Nikulina, N.V. Risinskaya, R.R. Abdurashidova, Z.T. Sarakaeva, A.U. Magomedova: data collection;

A.B. Sudarikov: data analysis and interpretation;

S.K. Kravchenko: concept and design development, article writing, data analysis and interpretation.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.А. Сычевская / K.A. Sychevskaya: <https://orcid.org/0000-0001-8053-9724>

А.Е. Мисюрина / A.E. Misyurina: <https://orcid.org/0000-0002-9535-6688>

Е.Е. Никулина / E.E. Nikulina: <https://orcid.org/0000-0003-3914-8611>

Н.В. Рисинская / N.V. Risinskaya: <https://orcid.org/0000-0003-2957-1619>

А.У. Магомедова / A.U. Magomedova: <https://orcid.org/0000-0003-4263-8275>

А.Б. Судариков / A.B. Sudarikov: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

С.К. Кравченко / S.K. Kravchenko: <https://orcid.org/0000-0001-9086-8521>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia.

All patients gave written informed consent to participate in the study.