

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-181-195>

# Перспективы применения высокопроизводительного секвенирования у пациентов с фолликулярной лимфомой

Е.О. Куневич<sup>1</sup>, И.С. Мартынкевич<sup>1</sup>, М.А. Михалева<sup>1</sup>, А.Н. Богданов<sup>2</sup>, Е.В. Мотыко<sup>1</sup>, А.Ю. Кувшинов<sup>1</sup>, С.В. Сидоркевич<sup>1</sup>, С.В. Волошин<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; Россия, 191024 Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7–9;

<sup>3</sup>ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России; Россия, 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

**Контакты:** Евгений Олегович Куневич [kunevich17@gmail.com](mailto:kunevich17@gmail.com)

**Цель исследования** – изучить прогностическую значимость мутаций генов и вовлекаемых в лимфомагенез внутриклеточных сигнальных путей у пациентов с фолликулярной лимфомой с применением анализа секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS).

**Материалы и методы.** В проспективное исследование включены 26 пациентов с медианой возраста 51,5 года. Всем пациентам проведен мутационный скрининг с использованием NGS-панели зондов к 118 генам. Анализ обогащения набора генов (gene set enrichment analysis, GSEA) проводили с использованием Metascape. Данные анализировали в SPSS Statistics 26 и R 4.2.2.

**Результаты.** Наибольшая частота мутаций отмечалась в генах: *KMT2C* – 50 %, *KMT2D* – 50 %, *CREBBP* – 31 %, *NOTCH2* – 31 %, *GNAS* – 23 %. Миссенс-мутации встречались с частотой 84,3 %. Мутация гена *ARID1A* является неблагоприятным фактором прогноза по данным анализа беспрогрессивной ( $p = 0,014$ ) и бессобытийной ( $p = 0,029$ ) выживаемости.

Опухолевая мутационная нагрузка (tumor mutational burden, TMB) определялась как количество мутаций на 1 мегабазу (Mb) кодирующей последовательности, медиана TMB составила 5,0 (3,3–8,3) мутации/Mb. Пороговое значение TMB, равное 6 мутаций/Mb, распределяло пациентов на группы с высокой (44 %) и низкой (56 %) TMB. В группе высокой TMB 2-летняя бессобытийная выживаемость составила 27,3 % (95 % доверительный интервал 6,0–61,0), что достоверно ниже, чем в группе низкой TMB – 72,7 % (95 % доверительный интервал 41,9–91,6;  $p = 0,037$ ).

По результатам GSEA наиболее обогащенными клеточными процессами являлись пути регуляции клеточной активации ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 6,357$ ), ремоделирования хроматина ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 5,707$ ) и модификации гистонов ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 4,569$ ). Нами также продемонстрированы другие возможности применения GSEA на примере фолликулярной лимфомы.

**Заключение.** TMB – значимый прогностический фактор у пациентов с фолликулярной лимфомой. Установлено, что мутации в генах *MYC*, *CREBBP*, *EZH2*, *KMT2D* приводят к дисрегуляции в нескольких внутриклеточных процессах, опосредуя сложные молекулярные изменения. Наиболее обогащенными внутриклеточными путями при фолликулярной лимфоме являются пути ремоделирования хроматина, регуляции клеточной активации и модификации гистонов.

**Ключевые слова:** фолликулярная лимфома, секвенирование следующего поколения, опухолевая мутационная нагрузка, анализ обогащения набора генов, мутация, эпигенетика, сигнальный путь, прогноз

**Для цитирования:** Куневич Е.О., Мартынкевич И.С., Михалева М.А. и др. Перспективы применения высокопроизводительного секвенирования у пациентов с фолликулярной лимфомой. Онкогематология 2023;18(4):181–95. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-181-195>

## Perspectives for next generation sequencing in patients with follicular lymphoma

E.O. Kunevich<sup>1</sup>, I.S. Martynkevich<sup>1</sup>, M.A. Mikhaleva<sup>1</sup>, A.N. Bogdanov<sup>2</sup>, E.V. Motyko<sup>1</sup>, A.Yu. Kuvshinov<sup>1</sup>, S.V. Sidorkevich<sup>1</sup>, S.V. Voloshin<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency; 16<sup>th</sup> Sovetskaya St., Saint Petersburg 191024, Russia;

<sup>2</sup>Saint Petersburg State University; 7–9 Universitetskaya Naberezhnaya, Saint Petersburg 199034, Russia;

<sup>3</sup>Military Medical Academy named after S. M. Kirov, Ministry of Defense of Russia; 6 Akademika Lebedeva St., Saint Petersburg 194044, Russia

**Contacts:** Evgenii Olegovich Kunevich [kunevich17@gmail.com](mailto:kunevich17@gmail.com)

**Aim.** To study the prognostic significance of gene mutations and intracellular signaling pathways involved in lymphomagenesis in patients with follicular lymphoma using next generation sequencing (NGS).

**Materials and methods.** The prospective study included 26 patients with a median age of 51.5 years. Mutational screening was performed for cohort using custom NGS Panel of 118 genes. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed using Metascape. The data was analyzed in SPSS Statistics 26 and R 4.2.2.

**Results.** The highest mutation frequency was noted in the genes: *KMT2C* – 50 %, *KMT2D* – 50 %, *CREBBP* – 31 %, *NOTCH2* – 31 %, *GNAS* – 23 %. Missense mutations occurred with a frequency of 84.3 %. *ARID1A* gene mutation is an unfavorable prognostic factor according to progressive-free ( $p = 0.014$ ) and event-free ( $p = 0.029$ ) survival analysis.

Tumor mutation burden (TMB) was defined as the number of mutations per megabase (Mb) of the coding sequence, the median TMB was 5.0 (3.3–8.3) mutations/Mb. The TMB threshold of 6 mutations/Mb divided patients into groups with high (44 %) and low (56 %) TMB. In the high TMB group, 2-year event-free survival was 27.3 % (95 % confidence interval 6.0–61.0), which was significantly lower than in low TMB group – 72.7 % (95 % confidence interval 41.9–91.6;  $p = 0.037$ ).

The most enriched cellular pathways according to GSEA results were regulation of cell activation ( $-\log_{10}(\text{q-value}) = 6.357$ ), chromatin remodeling ( $-\log_{10}(\text{q-value}) = 5.707$ ), histone modification ( $-\log_{10}(\text{q-value}) = 4.569$ ). We have also demonstrated other possibilities of GSEA using follicular lymphoma as an example.

**Conclusion.** TMB is a significant prognostic factor in patients with follicular lymphoma. We have shown that mutations in the *MYC*, *CREBBP*, *EZH2*, *KMT2D* genes lead to dysregulation in several intracellular processes, mediating complex molecular changes. The most enriched intracellular pathways in follicular lymphoma are those of chromatin remodeling, regulation of cell activation and histone modification.

**Keywords:** follicular lymphoma, next generation sequencing, tumor mutation burden, gene set enrichment analysis, mutation, epigenetics, signaling pathway, prognosis

**For citation:** Kunevich E.O., Martynkevich I.S., Mikhaleva M.A. et al. Perspectives for next generation sequencing in patients with follicular lymphoma. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2023;18(4):181–95. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-181-195>

## Введение

Идентификация генетических aberrаций в контексте изучения измененных сигнальных путей в опухолевых клетках обеспечила более целостное понимание патогенетических механизмов, лежащих в основе генеза, прогрессирования и химиорезистентности лимфом. Как следствие, нарушение функции гена или группы генов необходимо анализировать как часть сложной сети, состоящей из нескольких компонентов, тесно связанных друг с другом. Изучение функционирования подобных сетей, в частности отдельно всех ее компонентов, стало возможным благодаря развитию методов высокопроизводительного секвенирования с применением технологий машинного обучения.

К настоящему времени с помощью методов секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS) расширены наши познания в патогенезе онкологических новообразований, охарактеризованы вовлекаемые в онкогенез сигнальные клеточные пути, получены новые данные о прогностической роли мутаций генов и определены вероятные мишени для таргетной терапии.

Фолликулярная лимфома (ФЛ) — гетерогенное заболевание, характеризующееся большим разнообразием генетических изменений, лежащих в основе его патобиологии. Реципрокная транслокация  $t(14;18)(q32.3;q21.3)$ , приводящая к гиперэкспрессии гена *BCL2*,

является отличительной чертой ФЛ [1, 2]. Кроме этого, проведенные молекулярно-генетические исследования позволили идентифицировать большое количество повторяющихся соматических мутаций, изменяющих функционирование множества сигнальных путей, потенциально вовлеченных в патогенез ФЛ, включая гены эпигенетической регуляции транскрипции (*KMT2D*, *CREBBP*, *EZH2*, *EP300*), гены гистонов (*HIST1H1B*, *HIST1H1C*, *HIST1H1D*), компоненты сигнального пути В-клеточного рецептора, гены вакуолярной АТФазы, иммунного окружения и др. [2, 3].

Эффективным подходом к определению перспективных диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней при лимфопротеративных новообразованиях является использование методов биоинформатики, которые представляют собой мощный инструмент изучения молекулярных каскадов, лежащих в основе возникновения и прогрессирования заболеваний, на основании накопленных больших данных. Появление биоинформационных технологий предлагает новые подходы к исследованию молекулярной основы заболеваний и идентификации биомаркеров, что способствует развитию молекулярной диагностики опухолей, таргетного и персонализированного лечения.

**Цель исследования** — изучение прогностической значимости мутаций генов и вовлекаемых в лимфомагенез

внутриклеточных сигнальных путей у пациентов с ФЛ с применением NGS.

### Материалы и методы

В проспективное исследование были включены 26 пациентов (14 (54 %) женщин и 12 (46 %) мужчин; соотношение 1,2:1) с впервые диагностированной ФЛ, получавших лечение в гематологической клинике Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии ФМБА (Санкт-Петербург) в период с 2016 г. по настоящее время. Медиана возраста пациентов составила 51,5 (37,5–70,0) года. Медиана периода наблюдения – 16,3 (8,2–34,0) мес.

Перестройки генов *BCL2*, *BCL6*, а также *del17p/TP53* оценивали с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*. Интерпретацию патологии кариотипа и полученных результатов проводили в соответствии с Международной номенклатурой ISCN 2020 (International System for Human Cytogenomic Nomenclature) [4].

Анализ NGS проводили на платформе NextSeq (Illumina, США) методом парного концевоего чтения. Образцы ДНК выделяли из периферических мононуклеаров крови с применением Ficoll-Paque градиентного метода. Для пробоподготовки использован метод гибридизационного селективного обогащения фрагментами ДНК, относящимися к кодирующим областям 118 исследуемых генов с применением кастомной панели зондов производства Roche (лимфоидная таргетная NGS-панель, табл. 1) согласно протоколу производителя. Обработку данных секвенирования проводили с использованием автоматизированного алгоритма,

включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (hg37), пост-процессинг выравнивания, выявление вариантов нуклеотидной последовательности (здесь и далее «варианты») и фильтрацию вариантов по качеству. Целевая глубина прочтения составила 1000х. При анализе полученных данных применяли 2 % порог частоты встречаемости аллеля. Клиническую значимость выявленных мутаций оценивали с помощью баз данных COSMIC, ClinVar, gnomAD с применением *in silico* анализа (Cscape, Cancer Genome Interpreter, SNPs&Go). Интерпретацию клинической значимости предположительно соматических вариантов проводили на основании рекомендаций AMP (Association for Molecular Pathology) [5], герминальных вариантов – на основании рекомендаций ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) [6]. Выявленные варианты нуклеотидной последовательности распределяли на 5 групп: патогенный, вероятно патогенный, неопределенного значения, вероятно доброкачественный, доброкачественный [7]. Попарное сравнение с герминальной ДНК не проводили.

Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 26.0.0.0, R версии 4.2.2, Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>). Анализ обогащения набора генов (gene set enrichment analysis, GSEA) проводили с помощью Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) [8].

Количественные данные анализировали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Независимые категориальные данные сравнивали с использованием

Таблица 1. Лимфоидная таргетная панель секвенирования следующего поколения (NGS)

Table 1. Lymphoid targeted next generation sequencing (NGS) panel

<i>ABL1</i>	<i>AKT3</i>	<i>ALK</i>	<i>APC</i>	<i>ARID1A</i>	<i>ASXL1</i>	<i>ATM</i>	<i>ATRX</i>	<i>B2M</i>
<i>BCL2</i>	<i>BCOR</i>	<i>BCORL1</i>	<i>BCR</i>	<i>BIRC3</i>	<i>BRAF</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BTK</i>
<i>CALR</i>	<i>CARD11</i>	<i>CBL</i>	<i>CCND1</i>	<i>CD58</i>	<i>CD79B</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CDX2</i>	<i>CEBPA</i>
<i>CIITA</i>	<i>CREBBP</i>	<i>CSF3R</i>	<i>CUX1</i>	<i>DDX3X</i>	<i>DEK</i>	<i>DIS3</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>EP300</i>
<i>ETV6</i>	<i>EZH2</i>	<i>FAT1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>FLT3</i>	<i>GATA1</i>	<i>GATA2</i>	<i>GJB2</i>	<i>GNA13</i>
<i>GNAS</i>	<i>H1-1</i>	<i>HRAS</i>	<i>ID3</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>IKZF1</i>	<i>IKZF3</i>	<i>IRF4</i>
<i>ITPKB</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>KDM6A</i>	<i>KDR</i>	<i>KIT</i>	<i>KLF2</i>	<i>KMT2A</i>	<i>KMT2C</i>
<i>KMT2D</i>	<i>KRAS</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>MEF2B</i>	<i>MGA</i>	<i>MPL</i>	<i>MSN</i>	<i>MYC</i>	<i>MYD88</i>
<i>NF1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>NPM1</i>	<i>NRAS</i>	<i>NSD2</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>PHF6</i>	<i>PIK3CB</i>
<i>PIM1</i>	<i>PKHD1</i>	<i>PLCG2</i>	<i>POT1</i>	<i>PRDM1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>PTEN</i>	<i>PTPN11</i>	<i>PTPRD</i>
<i>RAD21</i>	<i>RB1</i>	<i>RHOA</i>	<i>RPS15</i>	<i>RUNX1</i>	<i>RYR1</i>	<i>SAMHD1</i>	<i>SETBP1</i>	<i>SF3B1</i>
<i>SH2B3</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>SMC1A</i>	<i>SMC3</i>	<i>SOC3</i>	<i>SRSF2</i>	<i>STAG2</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT6</i>
<i>SUZ12</i>	<i>SYK</i>	<i>TENT5C</i>	<i>TET2</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>TP53</i>	<i>U2AF1</i>	<i>WT1</i>	<i>XPO1</i>
<i>ZRSR2</i>								

$\chi^2$ -критерия Пирсона, в случае малых выборок — точного двустороннего теста Фишера. Пороговые значения количественных переменных определяли с помощью ROC-анализа. Парный корреляционный анализ проводили методом Спирмена. В качестве метода классификации применяли иерархический кластерный анализ. Анализ выживаемости проводили с использованием метода Каплана—Майера с применением *log-rank*-теста для оценки достоверности различий. Зависимость времени дожития от независимых переменных оценивали с помощью регрессионного анализа Кокса.

Количественные данные представлены в виде медианы и 1-го и 3-го квартилей ( $Me (Q_3 - Q_1)$ ), частоты — в виде собственных значений с указанием 95 % доверительного интервала (ДИ). Уровень значимости считали равным  $p \leq 0,05$ . В GSEA применяли поправку Бенджамини—Хохберга для множественных сравнений. Общую выживаемость (ОВ) определяли со дня верификации диагноза до даты смерти от любой причины. Точкой отсчета для выживаемости без прогрессирования (ВБП) и бессобытийной выживаемости (БСВ) считали дату 1-го дня 1-го цикла терапии, для безрецидивной выживаемости — дату достижения полной ремиссии. В анализе БСВ событием считали прогрессирование, рецидив, трансформацию или смерть от любой причины.

## Результаты

### Краткая характеристика исследуемой группы

Диагноз был морфологически подтвержден у всех 26 пациентов. Поражение костного мозга наблюдалось у 73 % (19/26) больных, экстра nodальные поражения выявлены у 27 % (7/26) пациентов. Медиана концентрации лактатдегидрогеназы (ЛДГ) равнялась 210 (154–310) Ед/л,  $\beta_2$ -микроглобулина — 6,2 (3,1–8,5) мг/л. Распределение пациентов по группам риска в зависимости от Международного прогностического индекса фолликулярной лимфомы (Follicular Lymphoma International Prognostic Index, FLIPI): низкий риск — 8 %, промежуточный риск — 38 %, высокий риск — 54 %; в зависимости от FLIPI-2: низкий риск — 12 %, промежуточный риск — 50 %, высокий риск — 38 %. По результатам первичного обследования II стадия по классификации Ann Arbor верифицирована у 8 % (2/26) пациентов, III стадия — у 11 % (3/26), IV стадия — у 81 % (21/26). Перестройки гена *BCL2* отмечались у 50 % (13/26) пациентов, каждое из изменений — перестройка гена *BCL6* и делеция *del17p/TP53* — были выявлены у 12 % (3/26) больных.

Медиана времени наблюдения (с момента постановки диагноза до начала терапии 1-й линии) составила 2,6 (1,4–4,7) мес. В качестве 1-й линии химиотерапия по протоколу R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон) была проведена 27 % (7/26) пациентов, RB (ритуксимаб, бендамустин) — 35 % (9/26), GB (обину-

тузумаб, бендамустин) — 23 % (6/26), ритуксимаб в монорежиме — 15 % (4/26). Поддерживающая терапия применялась у 35 % (9/26) пациентов: у 6 — ритуксимабом, у 3 — обинутузумабом. Полный ответ был достигнут у 46 % (12/26) пациентов, частичный — у 35 % (9/26), частота общих ответов составила 69 % (18/26). Частота прогрессирований составила 23 % (6/26), рецидивов — 4 % (1/26), трансформаций — также 4 % (1/26). Терапия 2-й линии была проведена 27 % (7/26) пациентов: использовались режимы GB (2/7), R-DHAP (ритуксимаб, цисплатин, цитарабин, дексаметазон) с последующей аутологичной трансплантацией стволовых клеток (2/7), RB (1/7), R-CHOP (1/7) и R-GDP (ритуксимаб, цисплатин, гемцитабин, дексаметазон) (1/7).

### Мутационный профиль пациентов с фолликулярной лимфомой

Генетические аберрации отмечались у всех обследуемых пациентов. В 88 из 118 генов было выявлено 638 аллельных вариантов. Мутации в 1 гене встречались в количестве от 1 до 47, медиана количества мутаций в 1 гене равнялась 2 (2–9). Всего выявлено 134 мутации, имеющие 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 % (рис. 1).

Миссенс-мутации встречались с частотой 84,3 %, нонсенс-мутации — 5,2 %, синонимичные — 4,5 %, мутации со сдвигом рамки считывания — 3,8 %, другие — 2,2 %. Медиана частоты встречаемости аллеля составила 8,96 (3,94–35,64) %.

Среди мутаций гена *ARID1A* были выявлены 2 вероятно патогенных варианта нуклеотидной последовательности, в обоих случаях приводящих к преждевременной термации синтеза белка и потере его функции. Это мутация с.5548dupG (p.D1850fsX4) со сдвигом рамки считывания и вариант с.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 *TP53* и репарацией повреждений ДНК [9, 10]. По нашим данным, мутации гена *ARID1A* с потерей функции ассоциированы с достоверно меньшей 5-летней ВБП, а также с 2- и 5-летней БСВ. Пятилетняя ВБП у пациентов с мутацией гена *ARID1A* составила 0 % (медиана 2,4 мес), у пациентов с вариантом гена «дикого» типа — 29,1 % (95 % ДИ 13,2–52,9; медиана 23,5 мес;  $p = 0,014$ ). У больных ФЛ с мутацией гена *ARID1A* 2-летняя БСВ составила 0 % (медиана 3,7 мес), что значимо ниже, чем в группе «дикого» типа — 51,8 % (95 % ДИ 30,6–73,2; медиана 20,4 мес;  $p = 0,029$ ). Аналогичные результаты были получены в отношении 5-летней БСВ ( $p = 0,029$ ) (рис. 2). По результатам однофакторного регрессионного анализа относительный

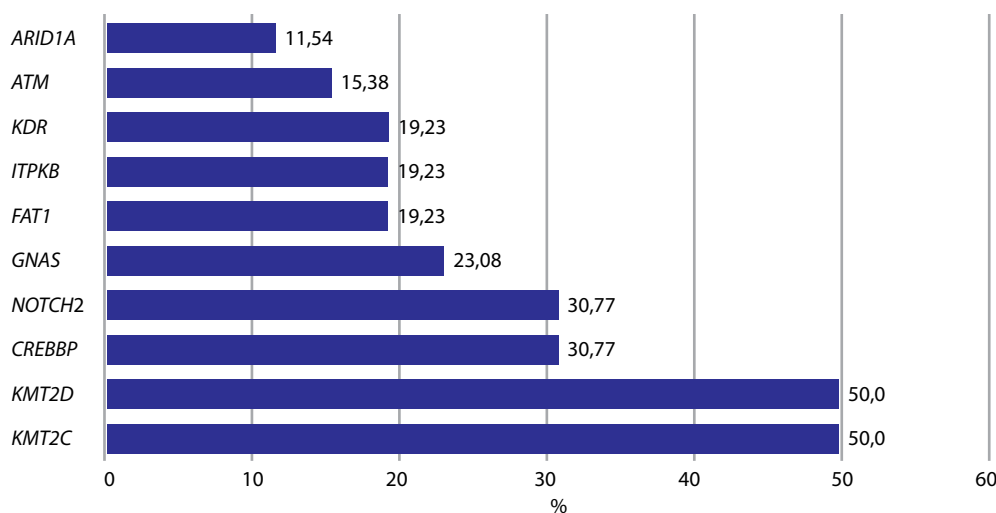


Рис. 1. Гистограмма относительных частот мутаций генов у пациентов с фолликулярной лимфомой

Fig. 1. Histogram of gene mutations relative frequencies in patients with follicular lymphoma

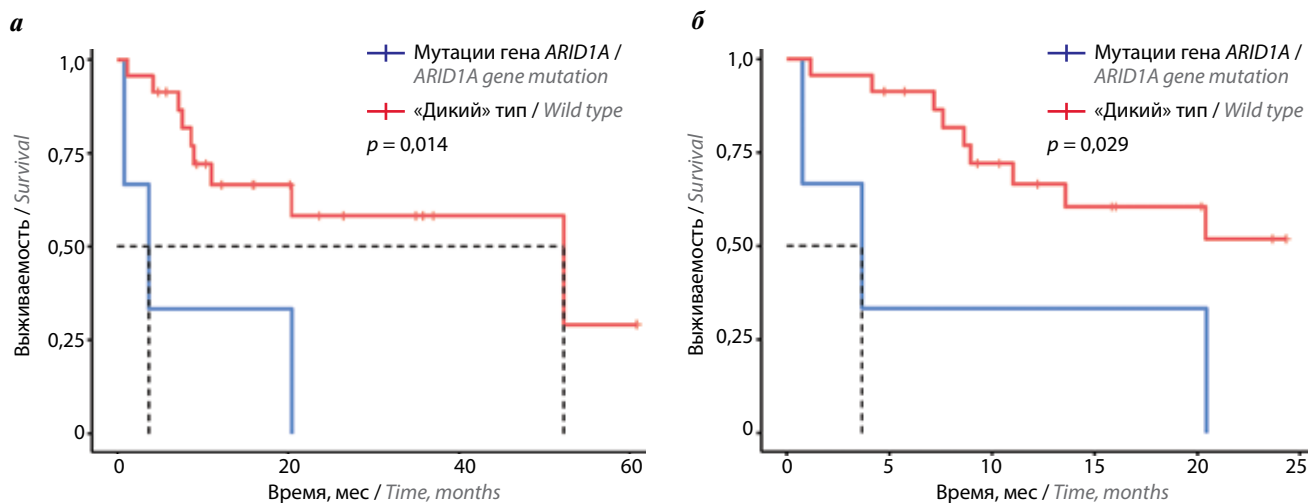


Рис. 2. Пятилетняя выживаемость без прогрессирования (а) и 2-летняя бессобытийная выживаемость (б) у пациентов с фолликулярной лимфомой в зависимости от мутационного статуса гена ARID1A

Fig. 2. Five-year progression-free survival (a) and 2-year event-free survival (b) in patients with follicular lymphoma depending on ARID1A gene mutation status

риск (ОР) для мутации гена *ARID1A* в анализе 5-летней 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.

Частота мутаций гена *CREBBP* составила 30,8 %, среди них чаще всего встречались миссенс-мутации, приводящие к замене функциональной группы аминокислотного остатка в НАТ-домене белка, ответственном за связывание с гистонами, что может указывать на изменение функциональных свойств продукта гена. У пациента FL158 с крайне неблагоприятным прогнозом (IV стадия, высокие уровни  $\beta 2$ -микроглобулина (6,28 мг/л) и ЛДГ (428 Ед/л), лейкоэмический состав крови —  $103,5 \times 10^9$ /л, t(14;18), мутация генов *ARID1A*, *BCL2*, высокий риск FLIPI, резистентность к полихимиотерапии) была выявлена делеция c.5039\_5041del (p.S1680del) в НАТ-домене. Примеча-

тельно, что объективный ответ был достигнут только в 4-й 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 НАТ-домена, однако есть сведения, что точечные замены ключевых аминокислот могут иметь схожий негативный эффект [11]. 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,



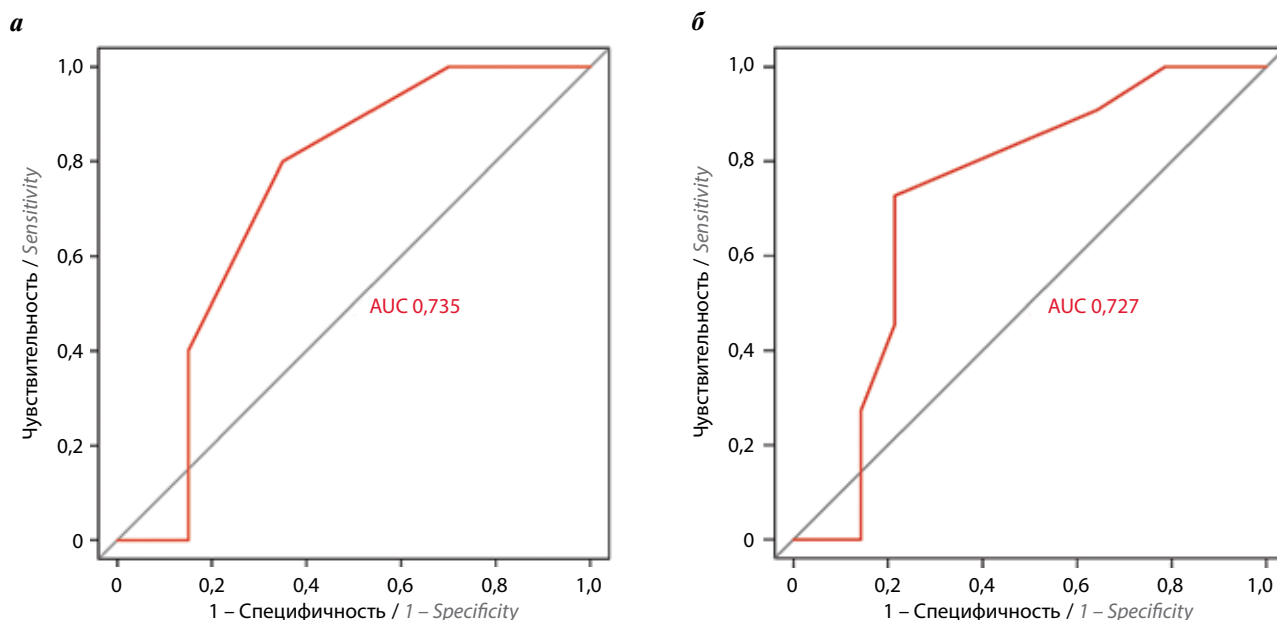


Рис. 3. ROC-кривые, полученные в отношении 2-летней общей выживаемости (а) и 2-летней бессобытийной выживаемости (б). AUC — площадь под кривой

Fig. 3. ROC curves obtained for 2-year overall survival (a) and 2-year event-free survival (б). AUC — area under the curve

обрыву синтеза белка MLL2 (KMT2D) и потере его функции. У пациента FL141, помимо ранее описанных мутаций генов *ARID1A*, *CREBBP*, были обнаружены 2 патогенные мутации в гене *KMT2D*, одна из которых представляет собой вариант нуклеотидной последовательности с.8366+1G>A, приводящий к исчезновению сайта сплайсинга, появлению aberrантного транскрипта и потере функции белка. Пациенту FL141 с IV стадией и высоким риском FLIPI и FLIPI-2 была инициирована монотерапия ритуксимабом, достигнут частичный ответ, после чего пациент умер в связи с прогрессией лимфомы. 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 герминальных центров лимфатических фолликулов [12, 13]. Анализ выживаемости не обнаружил достоверных различий у пациентов в зависимости от мутационного статуса гена *KMT2D* ( $p > 0,1$ ).

Все выявленные мутации гена *EZH2* были сконцентрированы в экзоне 16 и представляют собой миссенс-мутации замены тирозина на другую аминокислоту. Данные вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности приводят к усилению ферментативной функции белка *EZH2* и изменению экспрессии генов в В-клетках [14]. 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 1 пациент (FL012) с мутацией гена *EZH2* умер из-за возникших осложнений инфекции COVID-19,

в то время как у других больных с данной мутацией отмечалось благоприятное течение лимфомы.

Наиболее значимые выявленные варианты патогенных и вероятно патогенных мутаций в генах, ассоциированных с патогенезом и прогнозом ФЛ, представлены в табл. 2.

#### Метод определения и прогностическая роль опухолевой мутационной нагрузки у пациентов с фолликулярной лимфомой

Для определения прогностической значимости всех выявленных мутаций у каждого пациента была рассчитана опухолевая мутационная нагрузка (tumor mutational burden, TMB), которая определялась как количество мутаций на 1 мегабазу (Mb) кодирующей последовательности. Длина экзонов всех 118 исследуемых генов составила 602 917 пар оснований, или 0,603 Mb. Медиана TMB равнялась 5,0 (3,3–8,3) мутации/Mb. В целях определения порогового значения опухолевой нагрузки в отношении предсказания исходов 2-летней ОВ и БСВ (в отношении безрецидивной выживаемости расчеты не проводились по причине малой выборки и низкой частоты событий) выполнен ROC-анализ (рис. 3). Площадь под кривой (AUC) в анализе прогнозирования ОВ равнялась 0,735 (95 % ДИ 0,516–0,947;  $p = 0,035$ ). Чувствительность модели при значении TMB, равном 5,8 мутации/Mb, составила 75,0 %, специфичность — 70,6 %. По данным однофакторного регрессионного анализа (параметры модели:  $\chi^2 = 2,744$ ,  $p = 0,098$ ) ОР для фактора высокой TMB составил 5,2 (95 % ДИ 0,6–46,9;  $p = 0,138$ ). В отношении 2-летней БСВ были получены аналогичные результаты: AUC 0,727 (95 % ДИ 0,518–0,936;  $p = 0,033$ ),

**Таблица 2.** Наиболее значимые выявленные варианты патогенных и вероятно патогенных мутаций в генах, достоверно ассоциированных с патогенезом и прогнозом фолликулярной лимфомы

**Table 2.** The most significant identified variants of pathogenic and likely pathogenic mutations in genes reliably associated with the pathogenesis and prognosis of follicular lymphoma

Ген Gene	Позиция hg19 Position hg19	Комплементарная ДНК Complementary DNA	Белок Protein	Частота встречаемости аллеля, % Variant allele frequency, %	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
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.** rsID — идентификатор эталонного кластера SNP (однонуклеотидного полиморфизма); dbSNP — база данных однонуклеотидных полиморфизмов.

**Note.** rsID — reference SNP (single nucleotide polymorphism) cluster ID; dbSNP — the single nucleotide polymorphism database.

чувствительность при значении ТМВ 5,8 мутации/Мб — 72,7 %, специфичность — 78,6 % (в отношении 5-летней БСВ получены аналогичные результаты). В однофакторном регрессионном анализе (параметры модели:  $\chi^2 = 4,336$ ,  $p = 0,037$ ) 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 2 группы: низкой ТМВ (до 5 мутаций включительно на 1 Мб) (14 (56 %) боль-

ных) и высокой ТМВ (6 и более мутаций на 1 Мб) (12 (44 %) больных).

Обе группы достоверно не отличались во возрасту ( $p = 0,236$ ) и по лимфома-ассоциированным параметрам: количеству лимфоцитов ( $p = 0,607$ ), ЛДГ ( $p = 0,589$ ),  $\beta_2$ -микроглобулину ( $p = 0,607$ ). Длительность наблюдения и вариант проводимой терапии также были одинаковыми в обеих выборках ( $p = 0,217$  и  $p = 0,120$  соответственно). Объем опухолевой массы, оцененный по сумме произведений перпендикулярных диаметров 6 таргетных очагов, в дебюте заболевания не отличался в исследуемых группах ( $p = 0,150$ ) и не коррелировал с ТМВ, коэффициент корреляции  $r$  составил  $-0,222$

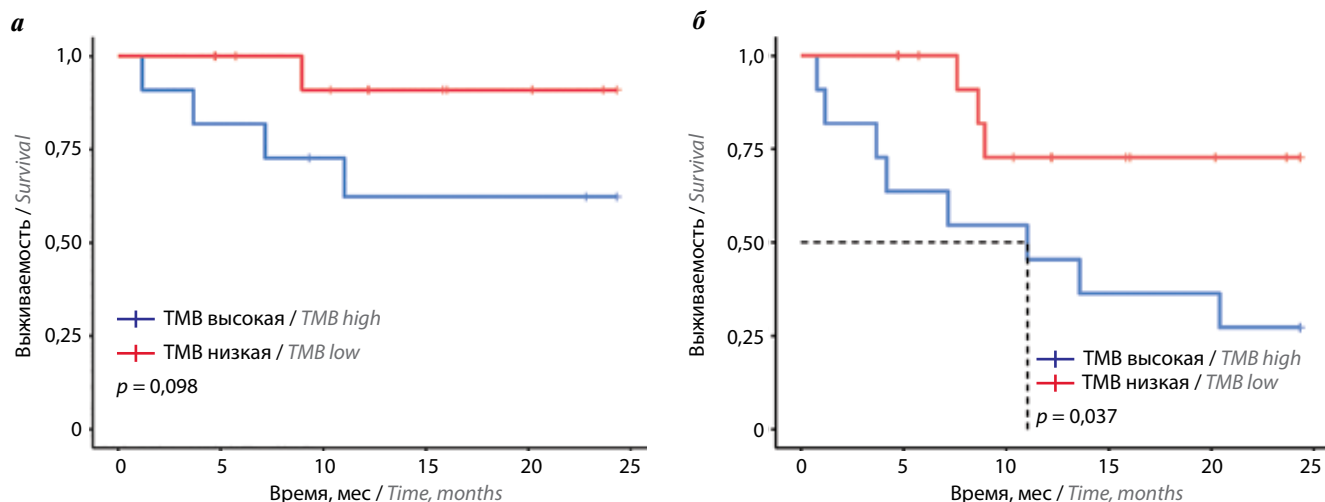


Рис. 4. Двухлетняя общая (а) и бессобытийная (б) выживаемость у пациентов с фолликулярной лимфомой в зависимости от размера опухолевой мутационной нагрузки (TMB)

Fig. 4. Two-year overall (a) and event-free (b) survival in patients with follicular lymphoma depending on the tumor mutational burden (TMB)

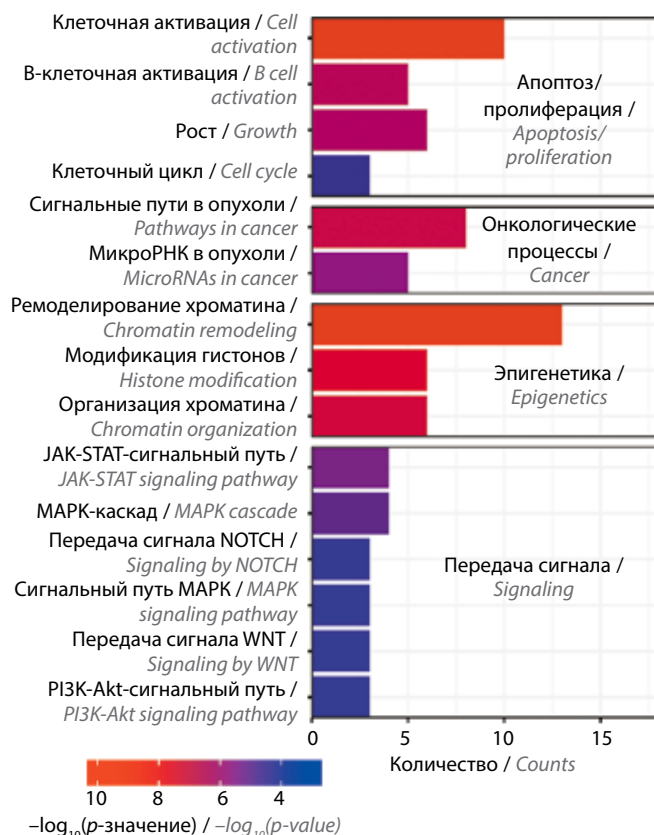


Рис. 5. Анализ функционального обогащения набора генов. По оси абсцисс — количество мутировавших генов, принадлежащих конкретному клеточному процессу; по оси ординат — название клеточных путей, сгруппированных по функциональной принадлежности: апоптоз/пролиферация, общие онкологические процессы, эпигенетика/транскрипция, передача сигнала. Здесь и на рис. 6:  $-\log_{10}(p\text{-значение})$  — отрицательный логарифм от значения  $p$  с основанием 10

Fig. 5. Gene set enrichment analysis. On the abscissa axis — the number of mutated genes belonging to a specific cellular process; on the ordinate axis — the name of cellular pathways grouped by functionality: apoptosis/proliferation, general oncological processes, epigenetics/transcription, signal transduction. Here and in fig. 6:  $-\log_{10}(p\text{-value})$  — negative logarithm of the  $p$ -value to base 10

( $p = 0,275$ ). Таким образом, можно констатировать, что обе группы являются однородными.

Двухлетняя ОВ была ниже в группе высокой ТМВ и составила 62,3 % (95 % ДИ 30,8–89,1) по сравнению с 90,9 % (95 % ДИ 66,1–99,8) у пациентов с низкой ТМВ ( $p = 0,098$ ). Также группа высокой ТМВ характеризовалась более низкой 2-летней ВБП – 36,4 % (95 % ДИ 10,9–69,2; медиана 11,0 мес) и 2-летней БСВ – 27,3 % (95 % ДИ 6,0–61,0; медиана 11,0 мес) по сравнению с пациентами с низкой ТМВ – 72,7 % (95 % ДИ 41,9–91,6;  $p = 0,071$ ) и 72,7 % (95 % ДИ 41,9–91,6;  $p = 0,037$ ) соответственно (рис. 4).

Частота прогрессирования ФЛ была выше у пациентов с высокой ТМВ и составила 33 % (95 % ДИ 10–65) по сравнению с больными из группы низкой ТМВ – 14 % (95 % ДИ 2–43), однако различия не достоверны ( $p = 0,250$ ). С учетом низкой частоты рецидивов (1/26) и трансформаций (1/26), которые наблюдались исключительно у пациентов с высокой ТМВ, межгрупповой анализ по данным параметрам не проводился. Таким образом, обе группы статистически значимо различались по частоте неблагоприятных событий (прогрессирование, рецидив, трансформация), которая в группе высокой ТМВ составила 50 % (95 % ДИ 21–79), а в группе низкой ТМВ – 2 % (95 % ДИ 2–43;  $p = 0,049$ ).

### Возможности изучения функционального профиля генетических мутаций на примере анализа обогащения набора генов

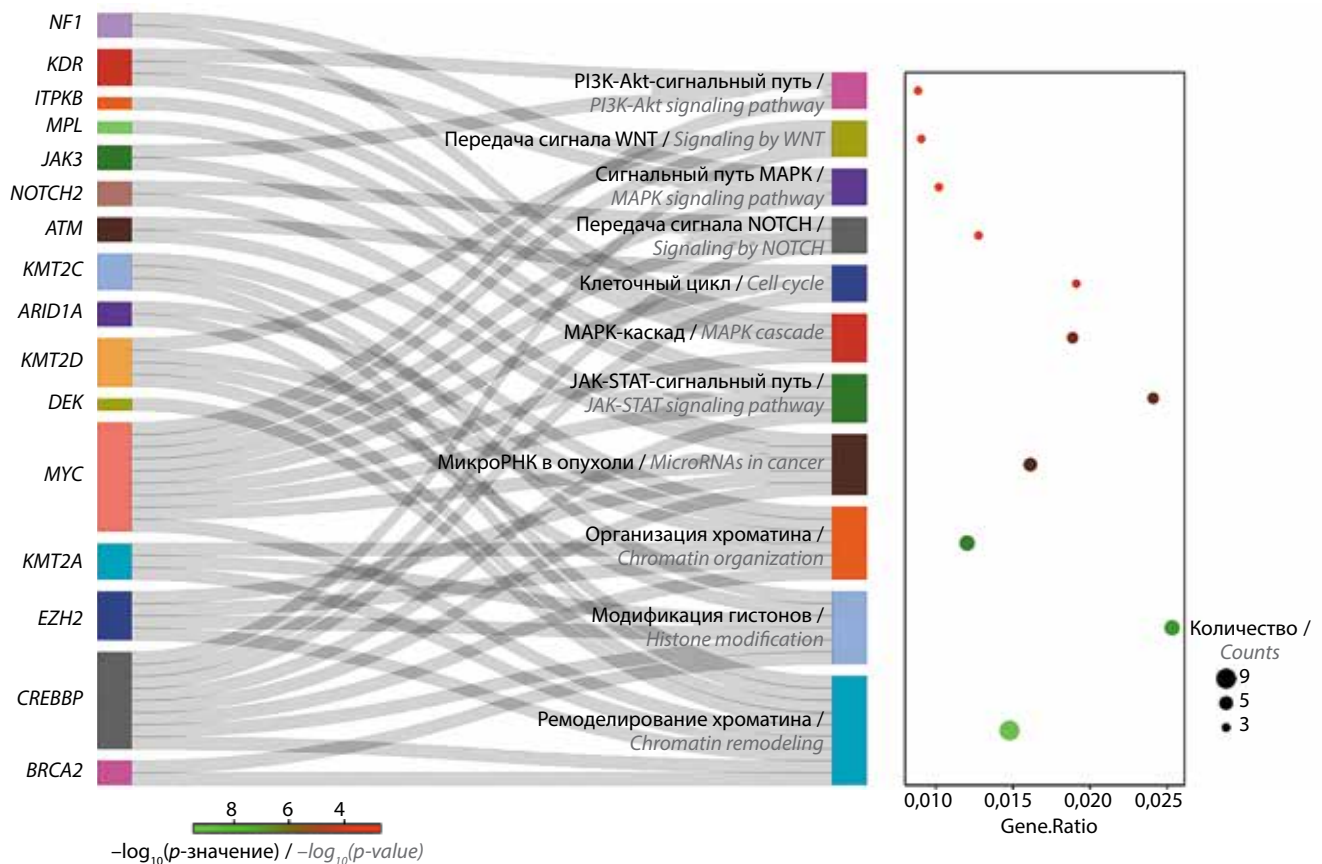
Для идентификации биологических клеточных процессов, вовлеченных в лимфомагенез, у исследуемой выборки пациентов ( $n = 26$ ) в отношении генов ( $n = 23$ ), мутации которых наблюдались у 2 и более пациентов (из анализа исключались мутации, выявленные только у 1 пациента, в связи с большой вероятностью случайности события), проводили 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 со значением  $p < 0,01$  и коэффициентом обогащения  $> 1,5$  (коэффициент обогащения представляет собой отношение между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами распределения) собирают и группируют в кластеры на основе сходства их функциональной принадлежности. В частности, значения  $p$  вычисляют на основе кумулятивного гипергеометрического распределения [15], а значения  $q$  определяют с использованием поправки Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения [16]. Суммарно GSEA выявил 271 возможный аннотируемый биологический процесс с вовлечением 3 и более генов при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Наиболее обогащенными путями, связанными с онкогенезом, по результатам GSEA явились: регуляция клеточной активации ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 6,357$ ), ремоделирование хроматина ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 5,707$ ), модификация гистонов ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 4,569$ ),

общие пути в опухоли ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 4,099$ ), регуляция микроРНК в опухоли ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 2,960$ ), JAK-STAT-сигнальный путь ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 2,674$ ), MAPK-каскад ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 2,335$ ), регуляция клеточного цикла ( $-\log_{10}(q\text{-значение}) = 1,542$ ) и др. (рис. 5).

Для визуализации ассоциаций между мутировавшими генами и клеточными путями мы построили диаграмму Sankey (рис. 6), на которой размер каждого узла и ширина каждой дуги представляют определенное количество объектов. Например, узел (расположен 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. Наибольший размер узлов левой половины графика имеют гены *MYC*, *CREBBP*, *EZH2*, *KMT2D*. Ген *MYC* представляет собой транскрипционный фактор, являющийся



**Рис. 6.** 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 диапазон значений  $-\log_{10}(p\text{-значение})$ , рассчитанный в анализе обогащения набора генов (GSEA). Gene.Ratio – доля мутировавших генов из списка ( $n = 23$ ) от общего числа генов, вовлеченных в онкогенный путь, согласно базе данных аннотаций

Fig. 6. Sankey diagram showing the involvement of mutated genes in major oncogenic pathways. In the right plot, the size of the point is determined by the number of genes in a particular cellular pathway, the color of the point represents the range of  $-\log_{10}(p\text{-value})$  values calculated in the gene set enrichment analysis (GSEA). Gene.Ratio is the proportion of mutated genes from the list ( $n = 23$ ) of the total number of genes involved in the oncogenic pathway, according to the annotation database

протоонкогеном и регулирующий процессы прогрессирования клеточного цикла, апоптоза и клеточной трансформации. Изменения гена *MYC* характерны для большинства онкологических новообразований (около 70 % всех известных форм рака) [17, 18], 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 (см. рис. 5).

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) [19]. Итоговая сеть представлена на рис. 7. 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 более выраженный по своей интенсивности эффект.

В целях определения взаимосвязи между генетическими событиями нами была построена матрица парных корреляций 23 наиболее часто мутировавших генов, которые ранее исследовались в 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 (рис. 8).

Первый кластер ( $n = 2$ ) составили гены *ARID1A* и *CREBBP*, относящиеся к группе генов, участвующих в организации хроматина. Ассоциации мутаций в генах 2-го и 3-го кластеров 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 ( $n = 6$ ;  $-\log_{10}(p\text{-значение}) = 7,01$ ), общих онкологических процессах ( $n = 4$ ;  $-\log_{10}(p\text{-значение}) = 4,38$ ) и ремоделировании хроматина ( $n = 3$ ;  $-\log_{10}(p\text{-зна-}$

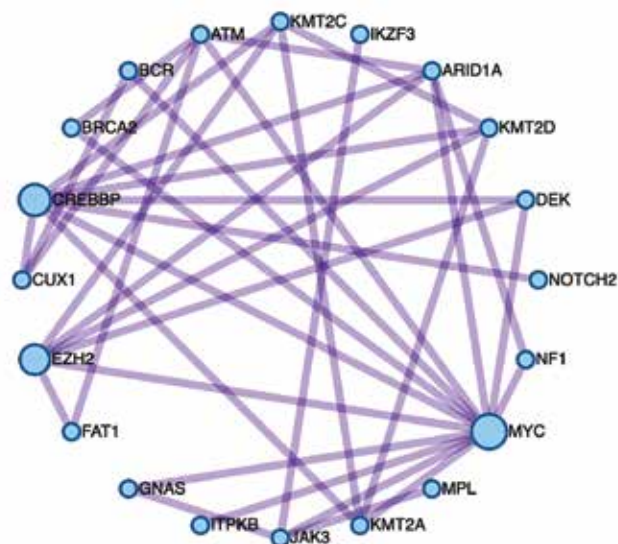


Рис. 7. Радиальная сеть белок-белковых взаимодействий  
Fig. 7. Radial network of protein-protein interactions

чение) = 2,81). Примечательно, что 75 % 5-го кластера ( $n = 4$ ) также составляют гены, участвующие в модификации гистонов: *EZH2*, *KMT2A*, *KMT2D* — метилирование гистонов ( $-\log_{10}(p\text{-значение}) = 7,77$ ); и только ген *KDR*, кодирующий сосудистый эндотелиальный фактор роста, участвует в процессах трансдукции сигналов ростовых факторов (совместно с генами *BCR*, *CUX1*, *MYC*), MAPK-каскаде и регуляции клеточной пролиферации. Закономерно, что гены 4-го и 5-го кластеров имеют общую функциональную принадлежность, что говорит об относительно высокой степени корреляции между ними.

И наконец, обладая данным о генетических мутациях конкретного больного, с помощью GSEA можно проводить дифференциальную диагностику, сопоставляя мутационный профиль пациента с известным генетическим ландшафтом заболеваний. Обогащение списка генов проводилось с использованием базы данных DisGeNET [20], содержащей более 1 млн ассоциаций генов и заболеваний (GDA) (табл. 3).

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 диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) ( $n = 9$ ;  $-\log_{10}(p\text{-значение}) = 14,00$ ), в то время как для ФЛ такой мутационный профиль менее характерен, но, тем не менее, высоковероятен ( $n = 7$ ;  $-\log_{10}(p\text{-значение}) = 9,80$ ). Таким образом, NGS (предпочтительнее полногеномное, а не таргетное) с последующим GSEA может помочь в вопросе дифференциальной диагностики и принятия решения о лечении.

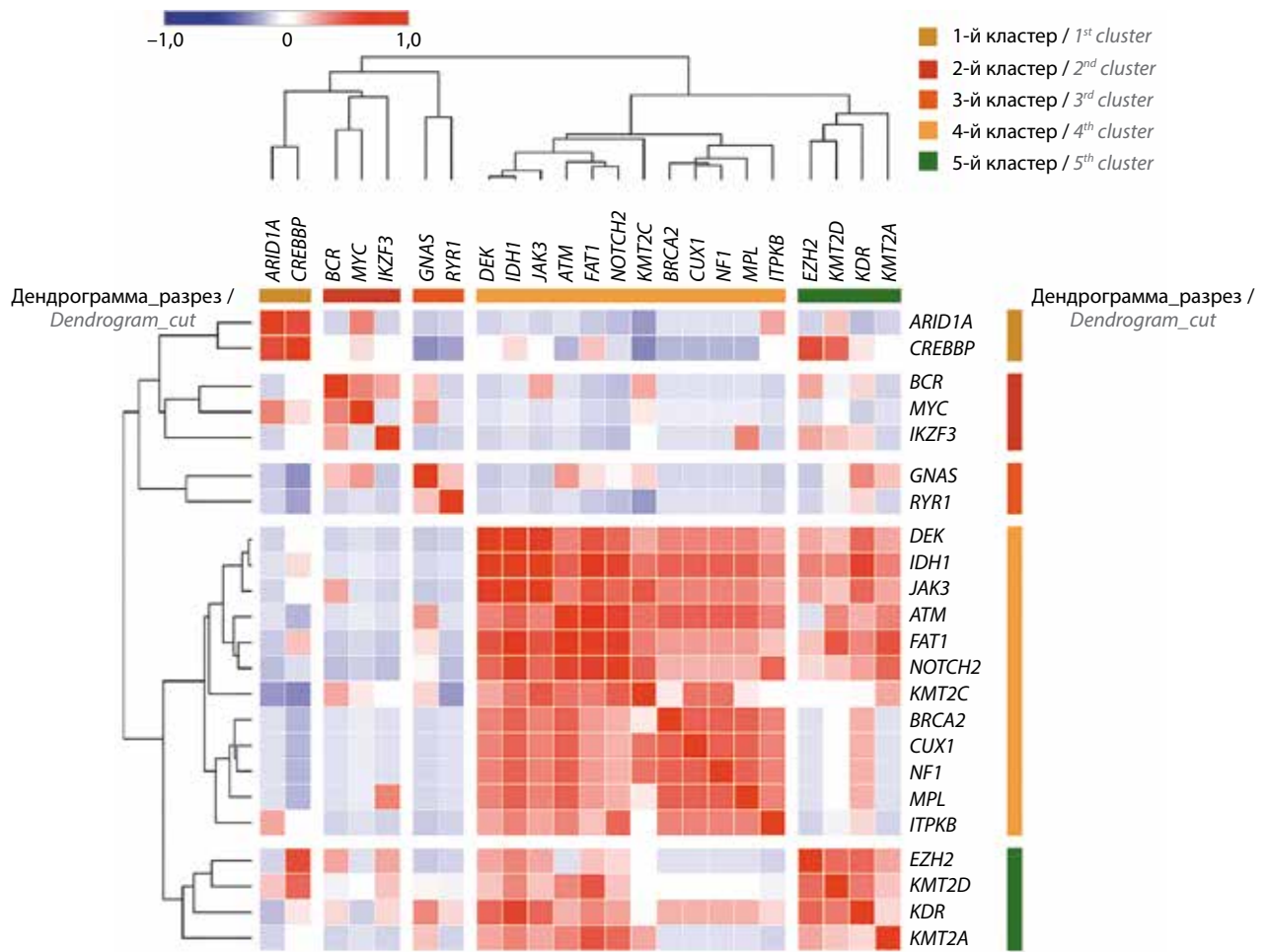


Рис. 8. Матрица парных корреляций генетических мутаций с иерархическим кластерным анализом. Красный цвет обозначает наличие ассоциированных мутаций, синий — взаимоисключающие мутации; нумерация кластеров по порядку (слева направо)

Fig. 8. Matrix of pairwise correlations of genetic mutations with hierarchical cluster analysis. Red indicates the presence of associated mutations, blue indicates mutually exclusive mutations; numbering of clusters in order (from left to right)

## Обсуждение

Наше исследование не выявило каких-либо аномалий в мутационном профиле и частоте мутаций у пациентов с ФЛ согласно ранее представленным данным. Недавно был опубликован отчет HMRN (the Haematological Malignancy Research Network, Сеть исследований гематологических злокачественных новообразований Соединенного Королевства) с включением 852 пациентов с ФЛ в период с 2004 по 2012 г., 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 [21]. Мы показали, что мутации в гене *ARID1A* сопряжены с худшим прогнозом в отношении ВБП и БСВ по сравнению с группой «дикого» типа, а 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 с ФЛ, которым было выполнено NGS с панелью, содержащей 74 гена, ОР мутации гена *ARID1A* составил 0,40 (95 % ДИ 0,16–0,996;  $p = 0,049$ ) [22]. Подобное расхождение в результатах, вероятно, 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 [23]. 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 2-летней ВБП (ОР 2,68;  $p = 0,0344$ ) [1]. В нашем исследовании не 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*



Таблица 3. Результаты анализа обогащения согласно данным базы DisGeNET

Table 3. Results of enrichment analysis according to DisGeNET

Код Code	Заболевание Disease	<i>n</i>	%	$\log_{10}(p\text{-значение})$ $\log_{10}(p\text{-value})$	$\log_{10}(q\text{-значение})$ $\log_{10}(q\text{-value})$
C0278876	Медуллобластома Medulloblastoma	14	61	−17,00	−15,00
C0278510	Медуллобластома у детей Pediatric medulloblastoma	14	61	−17,00	−12,00
C0023470	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	11	48	−15,00	−11,00
C1961099	Т-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma	12	52	−14,00	−10,00
C0024301	Фолликулярная лимфома Follicular lymphoma	11	48	−14,00	−10,00
C0079772	Т-клеточная лимфома T-cell lymphoma	11	48	−14,00	−10,00
C1332201	Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома у взрослых Adults diffuse large B-cell lymphoma	11	48	−14,00	−9,90

**Примечание.** 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.

**Note.** Code — disease coding according to the Unified Language of Medical Systems (UMLS); *n* — number of genes from the studied list associated with the disease; % — the proportion of genes associated with the disease from the total number of genes from the studied list.

и др.) при ФЛ является существенным доказательством того, что эпигенетическая дисрегуляция в В-клетках герминальных центров 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 у больных с высокой мутационной нагрузкой наблюдается лучший ответ на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек по сравнению с пациентами с низкой ТМВ [24]. Позже было установлено, что экспрессия неоантигенов положительно коррелирует с ТМВ, объясняя лучшую эффективность ингибиторов иммунных контрольных точек у пациентов с высокой ТМВ [25]. В настоящий момент 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 1 исследование с включением 300 пациентов с различными неходжкинскими лимфомами, в том числе 29 пациентов с ФЛ [26], у которых была оценена ТМВ с использованием панели из 405 генов,

высокоспецифичных для различных типов неходжкинских лимфом. 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 цитологических типов 3А–3В характеризуется более высокой ТМВ ( $p = 0,013$ ) по сравнению с ФЛ цитологических типов 1–2 и по данному показателю соответствует таковой при ДВККЛ ( $p = 0,973$ ).

В нашем исследовании оценка ТМВ проводилась в расчете на длину кодирующей последовательности исследуемых генов. Мы использовали панель из 118 генов, мутации которых высокоспецифичны для лимфопролиферативных новообразований. Длина всех экзонов исследуемых генов равнялась 602917 пар оснований, или 0,603 Mb. Медиана ТМВ составила 5,0 мутации/Mb. С помощью ROC-анализа мы определяли классификационный порог для ТМВ, распределяющий пациентов на 2 группы: с низкой ( $n = 14$ ) и высокой ( $n = 12$ ) ТМВ. Нами было показано, что пациенты с высокой ТМВ характеризуются статистически значимо более худшим прогнозом в соответствии с результатами анализа 2-летней БСВ ( $p = 0,037$ ). Также отмечалась аналогичная тенденция в анализе 2-летней ОВ и ВБП, однако различия статистически незначимы ( $p = 0,098$  и  $p = 0,071$  соответственно). Таким образом, нами был определен алгоритм расчета ТМВ у пациентов с ФЛ и доказана ее прогностическая значимость. В отличие от ранее опубликованных исследований [27, 28],

в которых порог количества мутаций определялся в соответствии со средним значением, медианой или 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 ТМВ). И в то же время наше исследование имеет несколько ограничений. Во-первых, это малый размер выборки ( $n = 26$ ), во-вторых — использование таргетной панели, содержащей всего 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 ТМВ при таргетном секвенировании: различные наборы генов и методы определения порога мутаций. Однако, несмотря на указанные ограничения, нами, а также другими исследователями однозначно показано, что высокая ТМВ является значимым прогностическим фактором, в том числе при ФЛ.

Первое исследование, в котором был описан метод GSEA на основании данных полноэкзомного секвенирования, было опубликовано в 2005 г. [29]. 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 при лимфомах. Несмотря на небольшой объем выборки ( $n = 26$ ), на основании данных о мутациях 23 генов нами было определено более 200 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 (поправка Бенджамини–Хохберга). Мы

показали, что у пациентов с ФЛ наиболее часто наблюдаются aberrации в пути регуляции клеточной активации и экспрессии генов, а также в общих сигнальных путях в опухоли. Мутации в генах *MYC*, *CREBBP*, *EZH2* и *KMT2D* при ФЛ имеют наибольшую патогенетическую значимость, так как указанные aberrации могут приводить к нарушению передачи сигнала в большинстве внутриклеточных сигнальных путей. Таким образом, изучение данных аспектов 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.

### Заключение

Исследования последнего десятилетия пролили свет на сложный патогенез ФЛ, в частности на концептуальную взаимосвязь между генетикой, эпигенетикой и микроокружением как критическую движущую силу этого заболевания. Понимание (эпи)генетического ландшафта открывает возможности для поиска новых способов таргетного и персонализированного лечения. Кроме этого, ФЛ не является биологически статичным заболеванием, и наши будущие подходы к определению прогноза и лечения должны быть адаптированы в соответствии с биологической эволюцией опухоли.

Результаты, представленные в настоящей работе, демонстрируют, что ТМВ как интегральный показатель, отражающий мутационный профиль опухоли, является статистически значимым прогностическим фактором у пациентов с ФЛ. Более того, мы показали, что мутации в генах *MYC*, *CREBBP*, *EZH2*, *KMT2D* вносят значительный вклад в патофизиологию ФЛ, приводя к дисрегуляции в нескольких внутриклеточных процессах и опосредуя более сложные молекулярные изменения. Наиболее обогащенными внутриклеточными путями при ФЛ являются пути ремоделирования хроматина, регуляции клеточной активации и модификации гистонов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Krysiak K., Gomez F., White B.S. et al. Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma. *Blood* 2017;129(4):473–83. DOI: 10.1182/blood-2016-07-729954
2. Taylor J., Xiao W., Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood* 2017;130(4):410–23. DOI: 10.1182/blood-2017-02-734541
3. Balasubramanian S., Hodgkinson B., Schuster S.J. et al. Identification of a genetic signature enriching for response to ibrutinib in relapsed/refractory follicular lymphoma in the DAWN phase 2 trial. *Cancer Med* 2022;11(1):61–73. DOI: 10.1002/cam4.4422
4. McGowan-Jordan J., Hastings R.J., Moore S. ISCN 2020 – An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020). Basel: Karger, 2020. Pp. 170. DOI: 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2
5. Li M.M., Datto M., Duncavage E.J. et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer. *J Mol Diagn* 2017;19(1):4–23. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002
6. Richards S., Aziz N., Bale S. et al. 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. *Genet Med* 2015;17(5):405–24. DOI: 10.1038/gim.2015.30
7. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика 2019;18(2):3–23. DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23 Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prokhorchuk E.B. et al. Guide to the interpretation of human DNA sequence data obtained



- by massively parallel sequencing (MPS) methods (edition 2018, version 2). Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2019;18(2): 3–23. (In Russ.). DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23
8. Zhou Y., Zhou B., Pache L. et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 2019;10(1):1523. DOI: 10.1038/s41467-019-09234-6
  9. Pasqualucci L., Khiabani H., Fangazio M. et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep* 2014;6(1):130–40. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.12.027
  10. Xu S., Tang C. The Role of ARID1A in tumors: tumor initiation or tumor suppression? *Front Oncol* 2021;11:745187. DOI: 10.3389/fonc.2021.745187
  11. Pasqualucci L., Dominguez-Sola D., Chiarenza A. et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011;471(7337):189–95. DOI: 10.1038/nature09730
  12. Ortega-Molina A., Boss I., Canela A. et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat Med* 2015;21(10):1199–208. DOI: 10.1038/nm.3943
  13. Zhang J., Dominguez-Sola D., Hussein S. et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med* 2015;21(10):1190–8. DOI: 10.1038/nm.3940
  14. Bodor C., Grossmann V., Popov N. et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* 2013;122(18):3165–8. DOI: 10.1182/blood-2013-04-496893
  15. Zar J.H. Biostatistical analysis. 4<sup>th</sup> edn. NJ Prentice Hall, 1999. Pp. 523.
  16. Hochberg Y., Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 1990;9(7):811–8. DOI: 10.1002/sim.4780090710
  17. Cotterman R., Jin V.X., Krig S.R. et al. N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor. *Cancer Res* 2008;68(23):9654–62. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1961
  18. Posternak V., Colea M.D. Strategically targeting MYC in cancer. *F1000Res* 2016;5:408. DOI: 10.12688/f1000research.7879.1
  19. Bader G.D., Hogue C.W.V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* 2003;4:2. DOI: 10.1186/1471-2105-4-2
  20. Pinero J., Bravo A., Queralt-Rosinach N. et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):D833–9. DOI: 10.1093/nar/gkw943
  21. Crouch S., Painter D., Barrans S.L. et al. Molecular subclusters of follicular lymphoma: a report from the United Kingdom's Haematological Malignancy Research Network. *Blood Adv* 2022;6(21):5716–31. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021005284
  22. 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
  23. Zhang X., Zhang Y., Zhao J. et al. ARID1A mutations in cancer development: mechanism and therapy. *Carcinogenesis* 2023;44(3):197–208. DOI: 10.1093/carcin/bgad011
  24. Rizvi N.A., Hellmann M.D., Snyder A. et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015;348(6230):124–8. DOI: 10.1126/science.aaa1348
  25. Goodman A.M., Kato S., Bazhenova L. et al. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Mol Cancer Ther* 2017;16(11):2598–608. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0386
  26. Cho J., Yoon S.E., Kim S.J. et al. Comparison of tumor mutation burden of 300 various non-Hodgkin lymphomas using panel based massively parallel sequencing. *BMC Cancer* 2021;21:972. DOI: 10.1186/s12885-021-08695-7
  27. De Pádua Covas Lage L.A., Culler H.F., Barreto G.C. et al. Tumor mutation burden involving epigenetic regulatory genes and the RhoA GTPase predicts overall survival in nodal mature T-cell lymphomas. *Clin Epigenetics* 2022;14:180. DOI: 10.1186/s13148-022-01395-4
  28. Devarakonda S., Rotolo F., Tsao M.S. et al. Tumor mutation burden as a biomarker in resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2018;36(30):2995–3006. DOI: 10.1200/JCO.2018.78.1963
  29. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(43):15545–50. DOI: 10.1073/pnas.0506580102

#### Вклад авторов

Е.О. Куневич: разработка концепции и дизайна, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка статьи;  
 И.С. Мартынкевич: разработка концепции и дизайна, подготовка статьи, окончательное одобрение статьи;  
 М.А. Михалева: предоставление материалов исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка статьи;  
 А.Н. Богданов: подготовка статьи, окончательное одобрение статьи;  
 Е.В. Мотыко: предоставление материалов исследования, подготовка статьи;  
 А.Ю. Кувшинов, С.В. Сидоркевич: подготовка статьи, окончательное одобрение статьи, административная поддержка;  
 С.В. Волошин: разработка концепции и дизайна, подготовка статьи, окончательное одобрение статьи, административная поддержка.

#### Authors' contributions

E.O. Kunevich: concept and design development, data collection, analysis and interpretation, article writing;  
 I.S. Martynkevich: concept and design development, article writing, final article approval;  
 M.A. Mikhaleva: provision of research materials, data collection, analysis and interpretation, article writing;  
 A.N. Bogdanov: article writing, final article approval;  
 E.V. Motyko: provision of research materials, article writing;  
 A.Yu. Kuvshinov, S.V. Sidorkevich: article writing, final article approval, administrative support;  
 S.V. Voloshin: concept and design development, article writing, final article approval, administrative support.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

Е.О. Куневич / E.O. Kunevich: <https://orcid.org/0000-0002-1706-6642>  
 И.С. Мартынкевич / I.S. Martynkevich: <https://orcid.org/0000-0001-5958-0490>  
 М.А. Михалева / M.A. Mikhaleva: <https://orcid.org/0000-0002-2135-2051>  
 А.Н. Богданов / A.N. Bogdanov: <https://orcid.org/0000-0003-1964-3690>  
 Е.В. Мотыко / E.V. Motyko: <https://orcid.org/0000-0002-6052-6472>  
 А.Ю. Кувшинов / A.Yu. Kuvshinov: <https://orcid.org/0000-0002-0381-9041>  
 С.В. Сидоркевич / S.V. Sidorkevich: <https://orcid.org/0000-0001-9931-9406>  
 С.В. Волошин / S.V. Voloshin: <https://orcid.org/0000-0003-1784-0375>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
**Funding.** The study was performed without external funding.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства».

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 Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency.

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