

## ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

## LYMPHOID TUMORS

### Определение соматических мутаций в гене *EZH2* и оценка их прогностической значимости при фолликулярной лимфоме 1–3А цитологического типа

### Identification of Somatic Mutations in *EZH2* Gene and Assessment of Their Prognostic Value in Follicular Lymphoma Grades 1–3A

Е.С. Нестерова, Н.А. Северина, Б.В. Бидерман, А.Б. Судариков, А.М. Ковригина, Т.Н. Обухова, Я.К. Мангасарова, С.М. Куликов, Е.Е. Звонков, Е.Н. Паровичникова, **В.Г. Савченко**

ES Nesterova, NA Severina, BV Biderman, AB Sudarikov, AM Kovrigina, TN Obukhova, YaK Mangasarova, SM Kulikov, EE Zvonkov, EN Parovichnikova, **VG Savchenko**

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

National Research Center for Hematology, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

#### РЕФЕРАТ

**Цель.** Определить частоту и прогностическую значимость мутаций в экзоне 16 гена *EZH2*, а также полиморфизма с.1582-21A>G (rs2072407) в гене *EZH2* у пациентов с фолликулярной лимфомой (ФЛ) 1–3А цитологического типа во взаимосвязи с морфологическими и цитогенетическими характеристиками опухоли.

**Материалы и методы.** В проспективное когортное исследование, проведенное в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ (Москва) с января 2017 г. по апрель 2021 г., включено 80 больных с впервые диагностированной ФЛ 1–2-го и 3А цитологических типов. Медиана наблюдения составила 53 мес. Молекулярное и цитогенетическое исследования выполнены на материале биоптатов лимфатических узлов, полученных до начала противоопухолевой терапии. Мутационный статус экзона 16 гена *EZH2* и наличие интронного полиморфизма rs2072407 в гене *EZH2* исследовали методом секвенирования по Сэнгеру. Транслокацию t(14;18)(q32;q21) определяли с помощью кариотипирования или FISH-исследования.

**Результаты.** Мутации в экзоне 16 гена *EZH2* (mutEZH2) обнаружены у 10/80 (13 %) пациентов. У всех больных выявлена миссенс-мутация в кодоне 646 гена *EZH2*. Транслокация t(14;18) имела место в 45 (56 %) из 80 случаев. Неблагоприятный исход в группе пациентов с отсутствием t(14;18) отмечался в 3 раза чаще, чем в группе с t(14;18) ( $p = 0,0001$ ). Наличие t(14;18) было связано с благоприятным прогнозом вне зависимости от мутационного статуса экзона 16 гена *EZH2* и цитологического типа ФЛ. При изучении статуса полиморфизма rs2072407 определены следующие генотипы: AA — 24 % ( $n = 19$ ), AG — 42 % ( $n = 34$ ) и GG — 34 % ( $n = 27$ ). Варианты AA и AG ассоциировались с повышенным риском летального исхода (отношение рисков 2,9; 95%-й доверительный интервал 1,2–10,6;  $p = 0,01$ ). В то же время ге-

#### ABSTRACT

**Aim.** To determine the incidence and prognostic value of mutations in exon 16 of *EZH2* as well as those of polymorphism c.1582-21A>G (rs2072407) in *EZH2* in patients with follicular lymphoma (FL) grades 1–3A in relation to morphologic and cytogenetic tumor characteristics.

**Materials & Methods.** The prospective cohort study conducted by the National Research Center for Hematology from January 2017 to April 2021 enrolled 80 patients with newly diagnosed FL grades 1/2 and 3A. The median follow-up was 53 months. Molecular and cytogenetic analyses were based on biopsy samples of lymph nodes obtained before chemotherapy. The mutation status of exon 16 in *EZH2* and the presence of intronic polymorphism rs2072407 in *EZH2* were examined by Sanger sequencing method. Translocation t(14;18)(q32;q21) was detected by karyotyping or FISH.

**Results.** Mutations in exon 16 of *EZH2* (mutEZH2) were identified in 10/80 (13 %) patients. All patients showed missense mutation in codon 646 of *EZH2*. Translocation t(14;18) was detected in 45/80 (56 %) cases. Poor outcome in the cohort with no t(14;18) was observed 3 times more often than in the group of patients with t(14;18) ( $p = 0.0001$ ). The presence of t(14;18) was associated with favorable prognosis irrespective of either the mutation status of exon 16 in *EZH2* or the FL grade. The analysis of the polymorphism rs2072407 status yielded the following genotypes: AA in 24 % ( $n = 19$ ), AG in 42 % ( $n = 34$ ), and GG in 34 % ( $n = 27$ ) of cases. The variants AA and AG were associated with higher risk of death (hazard ratio 2.9; 95% confidence interval 1.2–10.6;  $p = 0.01$ ), whereas the genotype GG was associated with wtEZH2 (10 % vs. 37 %) and favorable prognosis ( $p = 0.065$ ).

**Conclusion.** Significant biological markers for favorable prognosis in FL appeared to be the presence of t(14;18)(q32;q21) and GG genotype of polymorphism rs2072407 in *EZH2*. The previously identified prognostic factors (grade

нотип GG был связан с wtEZH2 (10 vs 37 %) и благоприятным прогнозом ( $p = 0,065$ ).

**Заключение.** Значимыми биологическими маркерами благоприятного прогноза при ФЛ оказались наличие  $t(14;18)(q32;q21)$  и генотип GG полиморфизма rs2072407 в гене *EZH2*. Ранее выявленные нами прогностические факторы, такие как 3А цитологический тип, наличие массивных опухолевых поражений («bulky» > 6 см), Ki-67 > 35 %, короткая продолжительность интервала от времени появления первых симптомов болезни до начала противоопухолевой терапии, объединены в новую единую персонализированную прогностическую модель ФЛ (personalized predictive index, PPI) путем включения в нее дополнительных биологических маркеров: наличия  $t(14;18)(q32;q21)$  и генотипа GG полиморфизма rs2072407. Такой подход, возможно, усилит прогностическую значимость новой персонализированной конструкции, что позволит разрабатывать риск-адаптированные алгоритмы лечения ФЛ.

**Ключевые слова:** фолликулярная лимфома, прогноз, «bulky», цитологические типы, Ki-67,  $t(14;18)(q32;q21)$ , ген *EZH2*.

**Получено:** 9 июля 2022 г.

**Принято в печать:** 30 ноября 2022 г.

*Для переписки:* Екатерина Сергеевна Нестерова, канд. мед. наук, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167; тел.: +7(495)612-23-61, +7(910)429-62-26; e-mail: nest.ek@yandex.ru

*Для цитирования:* Нестерова Е.С., Северина Н.А., Бидерман Б.В. и др. Определение соматических мутаций в гене *EZH2* и оценка их прогностической значимости при фолликулярной лимфоме 1–3А цитологического типа. Клиническая онкогематология. 2023;16(1):80–7.

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-1-80-87

3A, bulky tumor lesions > 6 cm, Ki-67 > 35 %, and a short interval between symptom onset and chemotherapy start) were incorporated into a new unified personalized predictive (index PPI) FL model by supplementing it with two additional biological markers: the presence of  $t(14;18)(q32;q21)$  and GG genotype of polymorphism rs2072407. This approach may increase the prognostic value of the new personalized design which will provide the basis for risk-adapted algorithms for FL treatment.

**Keywords:** follicular lymphoma, prognosis, bulky, grades, Ki-67,  $t(14;18)(q32;q21)$ , *EZH2* gene.

**Received:** July 9, 2022

**Accepted:** November 30, 2022

*For correspondence:* Ekaterina Sergeevna Nesterova, MD, PhD, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; Tel.: +7(495)612-23-61, +7(910)429-62-26; e-mail: nest.ek@yandex.ru

*For citation:* Nesterova ES, Severina NA, Biderman BV, et al. Identification of Somatic Mutations in *EZH2* Gene and Assessment of Their Prognostic Value in Follicular Lymphoma Grades 1–3A. Clinical oncohematology. 2023;16(1):80–7. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-1-80-87

## ВВЕДЕНИЕ

Фолликулярная лимфома (ФЛ) — наиболее распространенная форма неходжкинских лимфом в европейских странах, США [1] и России [2]. ФЛ — злокачественная опухоль, субстратом которой служат В-клетки герминативного центра с морфологией centroцитов и центробластов и наличием как минимум одной фолликулоподобной структуры [1]. Такое определение охватывает довольно широкий спектр различных клинических, морфологических, иммунофенотипических и генетических вариантов ФЛ. Опухоль характеризуется как сложное и гетерогенное заболевание. Стабильность заболевания в течение долгих лет может наблюдаться у 5–10 % пациентов [3]. Однако большинство больных в течение 3–4 лет от времени постановки диагноза ФЛ нуждаются в проведении системной иммунохимиотерапии [4]. У 80 % пациентов отмечается индолентное течение заболевания, в то время как у 20 % — имеет место быстрое прогрессирование опухоли, несмотря на адекватную противоопухолевую терапию. Последние нередко оказываются рефрактерными к моноклональным анти-CD20-антителам и алкилирующим препаратам

(двойная рефрактерность) и морфологически соответствуют 3В цитологическому типу, или у них обнаруживаются признаки трансформации в диффузную В-крупноклеточную лимфому [5]. 5-летняя общая выживаемость (ОВ) у этой категории пациентов составляет 35–40 % [6]. И хотя достижения фармацевтической индустрии позволили значительно улучшить результаты лечения ФЛ [7], при этом заболевании нередко развиваются рецидивы [8]. Изучение роли биологических маркеров, лежащих в основе гетерогенности ФЛ и объясняющих развитие рецидивов заболевания, продолжается многие годы и остается сложной задачей для исследователей. Результаты секвенирования нового поколения (NGS) акцентируют все большее внимание на частых мутациях в генах эпигенетической регуляции лимфоогенеза [9]. Более того, недавние успехи, отразившиеся в характеристике мутационного ландшафта ФЛ, позволили создать модель клиничко-генетической оценки риска, объединяющую мутационный статус 7 генов (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP* и *CARD11*) с FLIPI (m7-FLIPI), тем самым демонстрируя, что включение генных нарушений в прогностическую модель может существенно улучшить стратификацию больных ФЛ на группы риска [10].

Изучение филогенетической эволюции опухолевых клеток, а также множества опухолевых клонов при ФЛ показывает, что прогрессирование болезни происходит либо путем прямой клональной (линейной) эволюции — последовательного накопления соматических мутаций в опухолевой клетке, либо путем дивергентной эволюции от общей клетки-предшественницы — одновременного образования нескольких независимых опухолевых клонов из общей клетки-предшественницы [11, 12]. Нарушения в опухолевых клетках ФЛ, включая реаранжировки гена *BCL-2*/гиперэкспрессию белка *BCL-2* и мутации в гене *EZH2*/гиперэкспрессию белка *EZH2*, свидетельствуют о линейном пути эволюции опухолевой клетки [13, 14], в то время как реаранжировки гена *MYC*/гиперэкспрессия белка *MYC*, мутации в генах *TP53* и *IRF8* свидетельствуют о дивергентном пути эволюции опухолевой клетки [15, 16].

Онкоген *EZH2* (enhancer of zeste homolog 2), входящий в состав прогностической конструкции m7-FLIPI, представляет собой каталитический компонент поликомб-репрессивного комплекса 2. Основной особенностью этой группы белков является способность ремоделировать хроматин. В результате происходит эпигенетическая репрессия транскрипции путем метилирования гистонов и негистоновых белков. Белок *EZH2* является метилтрансферазой, который катализирует моно-, ди- и триметилирование лизина 27 гистона H3 (H3K27me1, H3K27me2 и H3K27me3), что обуславливает подавление транскрипции и дальнейшей дифференцировки клеток [17]. Соматические мутации в гене *EZH2* в основном вовлекают кодон Y646, определяются в 25 % случаев при ФЛ [18] и приводят к усилению триметилирования гистона H3K27 [19]. Мутации в гене *EZH2* регулируют триметилирование на уровне герминативного центра, вызывают гиперактивность активационно-индуцированной цитидиндезаминазы (фермента редактирования ДНК), предотвращают терминальную дифференцировку В-клеток, что приводит к изменениям, связанным с конститутивной активацией гена *EZH2*, и способствует лимфогенезу [20]. В связи с тем, что клинических и морфологических характеристик [21–28] на этапе диагностики ФЛ, как правило, недостаточно для надежного прогнозирования течения заболевания, определение молекулярно-генетических факторов приобретает особую актуальность. Данные литературы по изучению прогностической значимости мутаций в гене *EZH2* при ФЛ представлены в незначительном объеме, а опубликованные сообщения крайне противоречивы [11–16]. Поскольку в настоящее время разработаны селективные ингибиторы *EZH2* [29], являющиеся высокоэффективной терапевтической опцией для лечения ФЛ при наличии мутаций в гене *EZH2*, мы инициировали исследование по изучению мутационного статуса гена *EZH2* в когорте больных с ФЛ 1–3А цитологического типа. В работе было предусмотрено широкое сопоставление полученных результатов: цитогенетических исследований, изучения патогенетических различий опухолевых клеток и определения прогностической роли мутаций в гене *EZH2*.

**Цель настоящего исследования** — определить частоту и прогностическую значимость мутаций в эк-

зоне 16 гена *EZH2*, а также полиморфизма с.1582-21A>G (rs2072407) в гене *EZH2* у пациентов с ФЛ 1–3А цитологического типа во взаимосвязи с морфологическими и цитогенетическими характеристиками опухоли.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное сравнительное исследование, проведенное в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ (Москва) с января 2017 г. по апрель 2021 г., включено 80 больных с впервые диагностированной ФЛ 1–2-го и 3А цитологических типов, у которых были доступны образцы биоптатов, полученных до начала противоопухолевой терапии. Диагноз ФЛ поставлен на основании данных гистологического, иммуногистохимического и цитогенетического исследований биоптата опухоли (согласно критериям ВОЗ). Медиана наблюдения за больными составила 53 мес.

Мутационный статус экзона 16 и интронный полиморфизм с.1582-21A>G (rs2072407) в гене *EZH2* определялись методом секвенирования по Сэнгеру, транслокация t(14;18)(q32;q21) — кариотипированием (стандартным цитогенетическим исследованием — СЦИ) или флюоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH).

Статистический анализ помимо представления стандартных описательных данных включал сравнение показателей выживаемости (с использованием логрангового критерия) и регрессионный анализ Кокса (с оценкой отношения рисков).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

В исследование включено 80 пациентов (34 мужчины и 46 женщин) с медианой возраста 53 года. Короткий анамнез заболевания с временным интервалом от появления первых симптомов заболевания до начала противоопухолевой терапии менее 7 мес., являющийся предиктором неблагоприятного прогноза [24–26], наблюдался у 39/80 (49 %) пациентов. Стадии III–IV по классификации Ann-Arbor определены у 67/80 (84 %) больных. Массивные опухолевые образования размером более 6 см встречались в половине наблюдений — 36/80 (45 %). Сниженная концентрация гемоглобина менее 120 г/л диагностирована у 23/80 (29 %) пациентов. Повышенная активность лактатдегидрогеназы (> 247 ЕД/л) и В-симптомы регистрировались у 62/80 (78 %) и 41/80 (51 %) больных соответственно. Поражение костного мозга выявлено у 33/80 (40 %) пациентов. Иммунохимическое исследование белков сыворотки и мочи выполнено в половине случаев (40/80; 50 %). Повышение сывороточного  $\beta$ 2-микроглобулина диагностировано у 23/40 (58 %) пациентов. Секреция парапротеина не обнаружена ни в одном случае.

При морфологическом исследовании опухоли 1–2-й цитологический тип установлен у 40/80 (50 %) пациентов и 3А тип — у 40/80 (50 %). Нодулярный характер опухолевого роста ФЛ определен у 20/80

**Таблица 1.** Результаты цитогенетического исследования биоптатов ФЛ в общей группе пациентов ( $n = 80$ )

Показатель	СЦИ	FISH
Число пациентов	21 (26 %)	59 (74 %)
Транслокация t(14;18)+, $n$	9 (43 %)	36 (61 %)
Транслокация t(14;18)-, $n$	12 (57 %)	23 (39 %)

FISH — флюоресцентная гибридизация *in situ*; СЦИ — стандартное цитогенетическое исследование; ФЛ — фолликулярная лимфома.

(25 %) больных, нодулярно-диффузный — у 45/80 (56 %), диффузный — у 15/80 (19 %). Индекс пролиферативной активности Ki-67 в среднем составил 33 %. При сопоставлении двух факторов: морфологии опухоли и Ki-67 > 35 % (ранее нами доказано, что пролиферативная активность опухолевых клеток более 35 % является независимым статистически значимым фактором, связанным с неблагоприятным прогнозом [24–26]) — выявлено, что при 1–2-м цитологическом типе Ki-67 > 35 % определяется лишь у 5/40 (13 %) пациентов. В то же время при 3А типе этот показатель имел место в 6 раз чаще — у 35/40 (88 %) пациентов.

Пациенты исследуемой когорты получали следующие варианты индукционной терапии: R-CHOP и R-CHOP-подобные режимы — 59/80 (74 %), R-B — 7/80 (9 %), последовательная высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток — 14/80 (17 %).

Цитогенетическое исследование выполнено всем пациентам: СЦИ — у 21/80 (26 %), FISH — у 59/80 (74 %). Транслокация t(14;18) выявлена у 45/80 (56 %) пациентов (группа t(14;18)+): у 9 — методом СЦИ, у 36 — методом FISH (табл. 1).

Транслокация t(14;18) в исследованной когорте больных одинаково часто встречалась как при 1–2-м цитологическом типе (26/45; 58 %), так и при 3А типе (19/45; 42 %).

Мутации в экзоне 16 гена *EZH2* (mutEZH2) обнаружены у 10/80 (13 %) пациентов. У всех больных

выявлена миссенс-мутация в кодоне 646 гена *EZH2*. У 1 пациента определено одновременно две мутации: p.K639N и p.Y646N. В группе mutEZH2 1–2-й цитологический тип ФЛ диагностирован в 4/10 (40 %) случаях, 3А тип — в 6/10 (60 %).

Дикий тип *EZH2* (wtEZH2), т. е. с отсутствием мутации в экзоне 16, выявлен у 70/80 (87 %) пациентов. В этой группе 1–2-й цитологический тип ФЛ диагностирован в 33/70 (47 %) случаях, 3А тип — в 37/70 (53 %).

2-летняя ОВ больных в группах mutEZH2 и wtEZH2 составила 80 и 85 % соответственно ( $p = 0,183$ ) (рис. 1). В группе mutEZH2 было два летальных исхода вследствие прогрессирования заболевания. У 1 из этих пациентов выявлено крайне неблагоприятное генетическое нарушение — del(17p13).

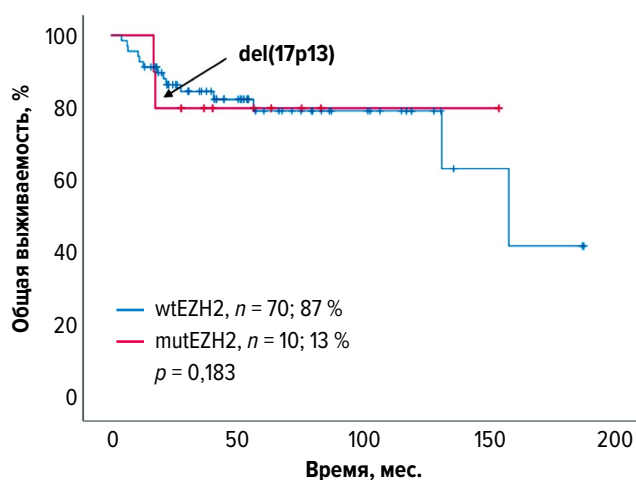
Группы пациентов с mutEZH2/wtEZH2 были сбалансированы по основным демографическим, клиническим и морфологическим параметрам. Все пациенты с mutEZH2 получали терапию антрациклин-содержащими режимами. При оценке 2-летней ОВ в двух группах больных (группа mutEZH2,  $n = 10$ ; группа wtEZH2,  $n = 49$ ), получавших по схеме R-CHOP и R-CHOP-подобным режимам, результаты оказались сопоставимыми — 80 и 90 % соответственно ( $p = 0,845$ ) (рис. 2).

При сопоставлении результатов изучения мутационного статуса гена *EZH2* и цитогенетического исследования — наличия/отсутствия t(14;18) — получены данные, описанные ниже.

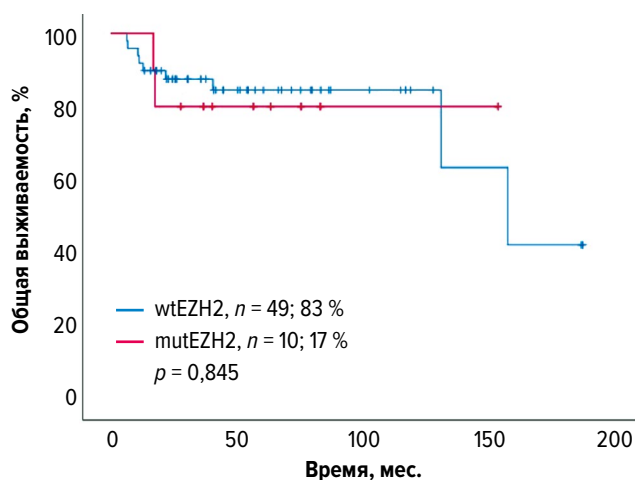
### Отдаленные результаты лечения пациентов в группах с различными молекулярно-цитогенетическим профилем ФЛ

#### 1. Группа t(14;18)+ mutEZH2

Группу больных с t(14;18)+ mutEZH2 составили 6 человек: у половины из них был 1–2-й цитологический тип ФЛ, у другой половины — 3А тип. Неблагоприятные события POD24 (ранний рецидив/прогрессирование/смерть

**Рис. 1.** Общая выживаемость в группах больных с mutEZH2 и wtEZH2 ( $n = 80$ )

**Fig. 1.** Overall survival in the cohorts with mutEZH2 and wtEZH2 ( $n = 80$ )

**Рис. 2.** Общая выживаемость в группах больных с mutEZH2 и wtEZH2, получавших терапию по схеме R-CHOP и R-CHOP-подобным режимам ( $n = 59$ )

**Fig. 2.** Overall survival in the cohorts with mutEZH2 and wtEZH2 treated with R-CHOP and R-CHOP-like regimens ( $n = 59$ )

**Таблица 2.** Отдаленные результаты лечения больных ФЛ в зависимости от молекулярно-цитологического профиля в группах с наличием или отсутствием t(14;18) и мутаций в гене *EZH2* (n = 80)

Статус t(14;18)	Цитологический тип, n	Статус <i>EZH2</i> , n	Неблагоприятные события POD24, n	Летальный исход на фоне прогрессирования ФЛ, n	
t(14;18)+, n = 45 (56 %)	1–2, 26/45 (58 %)	mutEZH2	3/6 (50 %)	1/3 (33 %)	0
		wtEZH2	23/39 (59 %)	5/23 (22 %)	2
	3A, 19/45 (42 %)	mutEZH2	3/6 (50 %)	2/3 (67 %)	1
		wtEZH2	16/39 (41 %)	2/16 (13 %)	0
t(14;18)–, n = 35 (44 %)	1–2, 11/35 (31 %)	mutEZH2	1/4 (25 %)	1/1 (100 %)	0
		wtEZH2	10/31 (32 %)	2/10 (20 %)	2
	3A, 24/35 (69 %)	mutEZH2	3/4 (75 %)	2/3 (67 %)	1
		wtEZH2	21/31 (68 %)	13/21 (62 %)	8

от прогрессирования в течение 24 мес. от начала терапии) в данной группе зарегистрированы у 3/6 (50 %) пациентов.

## 2. Группа t(14;18)+ wtEZH2

В группу больных с t(14;18)+ wtEZH2 включено 39 человек: 23 (59 %) — с 1–2-м цитологическим типом ФЛ, 16 (41 %) — с 3A типом. Неблагоприятные события POD24 наблюдались у 7 (18 %) пациентов.

## 3. Группа t(14;18)– mutEZH2

В группе t(14;18)– mutEZH2 было 4 пациента: у 1 из них определен 1–2-й цитологический тип ФЛ, у 3 — 3A тип. Неблагоприятные события POD24 зарегистрированы у 3 (75 %) больных.

## 4. Группа t(14;18)– wtEZH2

Группу с t(14;18)– wtEZH2 составил 31 больной: у 10 (32 %) из них ФЛ соответствовала 1–2-му цитологическому типу, у 21 (68 %) — 3A типу. Неблагоприятные события POD24 установлены у 15 (48 %) пациентов.

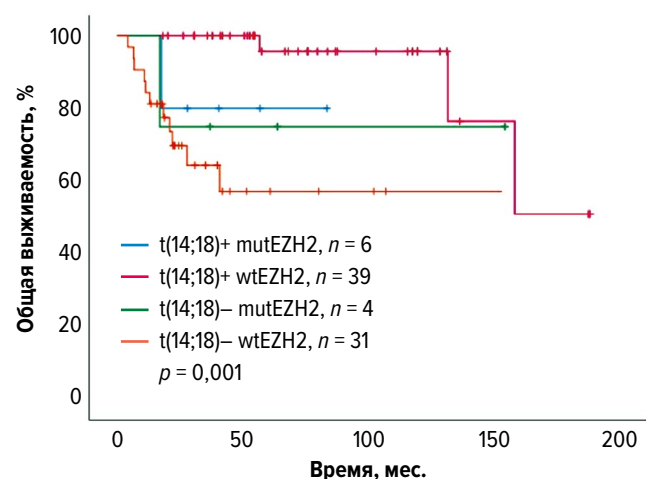
Отдаленные результаты лечения пациентов по группам представлены в табл. 2.

Таким образом, частота неблагоприятных событий в каждой из 4 групп была следующей: в группе t(14;18)+ mutEZH2 — 3/6 (50 %), t(14;18)+ wtEZH2 — 7/39 (18 %), t(14;18)– mutEZH2 — 3/4 (75 %), t(14;18)– wtEZH2 — 15/31 (48 %). Проведенный анализ показал, что частота неблагоприятных событий в группе без транслокации t(14;18) была в 2,5 раза выше, чем в группе с ее наличием: 18/35 (51 %) vs 10/45 (22 %) ( $p = 0,001$ ) вне зависимости от мутационного статуса гена *EZH2*.

Неблагоприятные события в группе t(14;18)– отмечались в 3 раза чаще при 3A цитологическом типе, чем при 1–2-м типе, — 15/24 (63 %) vs 3/11 (27 %) ( $p = 0,0001$ ) соответственно.

Результаты оценки ОВ больных в 4 проанализированных группах также подтверждают, что летальные исходы реже встречаются в группах t(14;18)+ вне зависимости от мутационного статуса гена *EZH2* ( $p = 0,001$ ) (рис. 3).

Полученные результаты демонстрируют, что наличие t(14;18) связано с благоприятным прогнозом вне зависимости от мутационного статуса гена *EZH2* и цитологического типа ФЛ. При отсутствии t(14;18) риск летального исхода при ФЛ значительно возрастает: отношение рисков (ОР) 4,3, 95-й доверительный интервал (95% ДИ) 1,5–13,0 ( $p = 0,0001$ ).



**Рис. 3.** Общая выживаемость в 4 группах больных ФЛ с наличием или отсутствием t(14;18) и различным мутационным статусом гена *EZH2* (mutEZH2/wtEZH2)

**Fig. 3.** Overall survival in 4 groups of FL patients with and without t(14;18) as well as with different mutation status of *EZH2* gene (mutEZH2/wtEZH2)

## Полиморфизм rs2072407 в гене *EZH2*

Прогностическая значимость полиморфизма rs2072407 в гене *EZH2* при гематологических злокачественных опухолях ранее не изучалась. Генотипы в настоящем исследовании распределялись следующим образом: AA — 24 % ( $n = 19$ ), AG — 42 % ( $n = 34$ ) и GG — 34 % ( $n = 27$ ). Частота генотипов GG и AA в исследуемой нами выборке пациентов сопоставима с международными данными. В то же время генотип AG, по нашим данным, встречался значительно чаще. Генотипы AA и AG определялись с одинаковой частотой в группах mutEZH2 (4/10, 40 % и 5/10, 50 % соответственно) и wtEZH2 (15/70, 21 % и 29/70, 41 % соответственно). Частота неблагоприятных событий POD24 и летальных исходов при генотипах AA и AG как в группе mutEZH2, так и в группе wtEZH2 была значительно выше, чем при генотипе GG. Неблагоприятные события в группе mutEZH2 при генотипе AA составили 3/4 (75 %), при генотипе AG — 3/5 (60 %), при генотипе GG — 0/10 (0 %). Неблагоприятные события в группе wtEZH2 при генотипе AA составили 6/15 (40 %), при генотипе AG — 12/29 (41 %), при генотипе GG — 4/26 (15 %).

Распределение генотипов полиморфизма rs2072407 в гене *EZH2* представлено в табл. 3.

**Таблица 3.** Распределение генотипов полиморфизма rs2072407 в гене *EZH2* у больных ФЛ (сопоставление с результатами терапии)

Показатель	mutEZH2 (n = 10)			wtEZH2 (n = 70)		
	AA 4/10	AG 5/10	GG 1/10	AA 15/70	AG 29/70	GG 26/70
Неблагоприятные события POD24	3/4	3/5	0/10	6/15	12/29	4/26
Летальный исход на фоне прогрессирования ФЛ	1/4	1/5	0/10	4/6	7/12	1/4

Таким образом, генотипы AA и AG в сравнении с генотипом GG вне зависимости от наличия/отсутствия мутаций в экзоне 16 гена *EZH2* у больных ФЛ связаны с повышенным риском неблагоприятных событий (ОР 2,9; 95% ДИ 1,2–10,6;  $p = 0,01$ ). Вариант GG чаще встречался при диком типе гена *EZH2* (1/10, 10 % vs 26/70, 37 %) и ассоциировался с благоприятным прогнозом вне зависимости от мутационного статуса гена *EZH2* ( $p = 0,065$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применяемые в настоящее время при ФЛ схемы иммунохимиотерапии приводят к длительным ремиссиям и улучшению ОВ у большинства (80 %) пациентов, нуждающихся в системном лечении. Тем не менее у 20 % пациентов наблюдаются короткие ремиссии и сравнительно худшие результаты терапии с медианой ОВ < 5 лет. Несомненно, разработка алгоритмов лечения с учетом рисков при ФЛ представляется крайне актуальной. Такой подход позволит избежать проведения высокодозных режимов у пациентов из группы низкого риска, а также отдать предпочтение альтернативным более интенсивным схемам по сравнению со стандартными режимами у больных из группы высокого риска. Создание комплексных прогностических моделей для оценки риска, которые объединяют не только клинико-лабораторные, но и молекулярно-генетические маркеры, представляется актуальным для идентификации больных ФЛ на этапе первичной диагностики. Подтверждением этому служит существующая прогностическая модель m7-FLIPI, основанная только на генетических маркерах и остающаяся самой достоверной моделью среди предложенных прогностических индексов.

В настоящей работе на выборке пациентов с ФЛ 1–2-го и 3А цитологических типов не только изучена прогностическая значимость двух важных молекулярно-генетических маркеров: наличия или отсутствия t(14;18) и мутаций в гене *EZH2*, но и проведены сопоставления с морфологическими характеристиками ФЛ. Прогностическая значимость мутаций в гене *EZH2* ранее доказана исследователями [10, 30] на большей группе больных без учета морфологических особенностей опухоли. Мутантный тип гена *EZH2* является компонентом модели m7-FLIPI [10]. На основании результатов серии продолжающихся исследований, направленных на повышение специфичности, чувствительности и стратификационных возможностей созданной модели, выбран и включен в усовершенствованную модель показатель POD24-PI для прогнозирования раннего прогрессирования ФЛ. В настоящей работе не выявлена статистически подтвержденная прогностическая значимость

наличия мутаций в гене *EZH2*. Однако малое число включенных больных не позволяет сформулировать окончательные выводы, что указывает на необходимость дальнейших исследований.

Исследование прогностической значимости мутаций в экзоне 16 гена *EZH2* и t(14;18) было принято также с целью изучить патогенетические аспекты ФЛ [31, 32], провести патогенетическое разделение рассмотренных случаев ФЛ и, таким образом, среди классической ФЛ 1–2-го и 3А цитологических типов дифференцировать случаи с линейным и дивергентным путями эволюции опухолевых клеток. Так, мутации в экзоне 16 гена *EZH2* были выявлены у 10 (13 %) из 80 пациентов, что соответствует недавним отчетам с использованием метода NGS и косвенно свидетельствует о линейном пути эволюции ФЛ [30].

Анализ взаимосвязи между результатами лечения больных и двумя наиболее важными биологическими маркерами линейной эволюции ФЛ продемонстрировал, что ключевая роль отводится наиболее патогенетически раннему событию при этой злокачественной опухоли — t(14;18). В настоящей работе продемонстрировано, что случаи с отсутствием t(14;18) и 3А цитологическим типом ФЛ требуют более тщательного наблюдения.

Кроме того, в исследовании впервые изучена прогностическая значимость аллельных вариантов в гене *EZH2* при злокачественном лимфопролиферативном заболевании. Генотип GG полиморфизма rs2072407 в гене *EZH2* связан с высокой чувствительностью опухоли к противоопухолевым лекарственным препаратам в отличие от других генотипов ( $p = 0,01$ ). Генотип AA полиморфизма rs2072407 при ФЛ 1–2-го и 3А цитологических типов в данной работе выявлялся в 2 раза чаще, чем в общей популяции, что, возможно, связано с риском развития ФЛ в изученной когорте больных. Полученные результаты планируется подтвердить на выборке с большим числом пациентов.

Принимая во внимание прогностическое влияние t(14;18) на результаты лечения, целесообразно исследовать опухолевый биоптат ФЛ на предмет наличия реаранжировок гена *BCL-2* с целью дифференцировать случаи с низким и высоким риском трансформации ФЛ и модифицировать лечение при необходимости. Ранее разработанная нами прогностическая модель PPI3 (personalized predictive index, 3 группы риска), включающая такие факторы, как 3А цитологический тип (ОР 3,1;  $p = 0,0001$ ), «bulky» (> 6 см) (ОР 2,4;  $p = 0,0056$ ), Ki-67 > 35 % (ОР 1,6;  $p = 0,0008$ ), короткая продолжительность интервала от времени появления первых симптомов болезни до начала противоопухолевой терапии (ОР 1,2;  $p = 0,1485$ ), позволила с высокой достоверностью стратифицировать больных ФЛ на группы риска [23–26]. Дополненная прогностическая модель, возможно, будет положена в основу диф-

ференцированной терапии ФЛ. Включение в более раннюю модель биологических маркеров, вероятно, усилит ее прогностическую значимость, что позволит разрабатывать риск-адаптированные алгоритмы лечения.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. А.М. Ковригина, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовала в рецензировании рукописи.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Е.С. Нестерова, А.Б. Судариков, Н.А. Северина.

**Сбор и обработка данных:** Е.С. Нестерова, Н.А. Северина, Б.В. Бидерман.

**Предоставление материалов исследования:** все авторы.

**Анализ и интерпретация данных:** Е.С. Нестерова, А.Б. Судариков, Н.А. Северина, Б.В. Бидерман.

**Подготовка рукописи:** Е.С. Нестерова.

**Окончательное одобрение рукописи:** все авторы.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375–90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569.
- Бабичева Л.Г., Поддубная И.В. Первая линия терапии индолентных неходжкинских лимфом в рутинной клинической практике. Современная онкология. 2020;22(2):119–25. doi: 10.26442/18151434.2020.2.200125. [Babicheva LG, Poddubnaya IV. First-line therapy of indolent non-Hodgkin's lymphoma in routine clinical practice. *Journal of Modern Oncology*. 2020;22(2):119–25. doi: 10.26442/18151434.2020.2.200125. (In Russ)]
- Ardeshna KM, Qian W, Smith P, et al. Rituximab versus a watch-and-wait approach in patients with advanced-stage, asymptomatic, non-bulky follicular lymphoma: an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):424–35. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70027-0.
- Matasar MJ, Luminari S, Barr PM, et al. Follicular Lymphoma: Recent and Emerging Therapies, Treatment Strategies, and Remaining Unmet Needs. *Oncologist*. 2019;24(11):e1236–e1250. doi: 10.1634/theoncologist.2019-0138.
- Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, 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.
- Casulo C, Day B, Dawson KL, et al. Disease characteristics, treatment patterns, and outcomes of follicular lymphoma in patients 40 years of age and younger: an analysis from the National Lymphocare Study. *Ann Oncol*. 2015;26(11):2311–7. doi: 10.1093/annonc/mdv375.
- Smith A, Crouch S, Lax S, et al. Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004–2014: sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2015;112(9):1575–84. doi: 10.1038/bjc.2015.94.
- Bachy E, Houot R, Morschhauser F, et al. Long-term follow up of the FL2000 study comparing CHVP-interferon to CHVP-interferon plus rituximab in follicular lymphoma. *Haematologica*. 2013;98(7):1107–14. doi: 10.3324/haematol.2012.082412.
- Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. 2010;42(2):181–5. doi: 10.1038/ng.518.

- 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.
- Carlotti E, Wrench D, Matthews J, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone. *Blood*. 2009;113(15):3553–7. doi: 10.1182/blood-2008-08-174839.
- Kridel R, Mottok A, Farinha P, et al. Cell of origin of transformed follicular lymphoma. *Blood*. 2015;126(18):2118–27. doi: 10.1182/blood-2015-06-649905.
- Dubois S, Mareschal S, Picquenot J-M, et al. Immunohistochemical and genomic profiles of diffuse large B-cell lymphomas: implications for targeted EZH2 inhibitor therapy? *Oncotarget*. 2015;6(18):16712–24. doi: 10.18632/oncotarget.3154.
- Huet S, Xerri L, Tesson B, et al. EZH2 alterations in follicular lymphoma: biological and clinical correlations. *Blood Cancer J*. 2017;7(4):e555. doi: 10.1038/bcj.2017.32.
- Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Can histologic transformation of follicular lymphoma be predicted and prevented? *Blood*. 2017;130(3):258–66. doi: 10.1182/blood-2017-03-691345.
- Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(13):8886–91. doi: 10.1073/pnas.132253599.
- Yap DB, Chu J, Berg T, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood*. 2011;117(8):2451–9. doi: 10.1182/blood-2010-11-321208.
- Okosun J, Bodor C, Wang J, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(2):176–81. doi: 10.1038/ng.2856.
- Beguelin W, Popovic R, Teater M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell*. 2013;23(5):677–92. doi: 10.1016/j.ccr.2013.04.011.
- Caganova M, Carrisi C, Varano G, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest*. 2013;123(12):5009–22. doi: 10.1172/JCI70626.
- Smith S. Transformed lymphoma: what should I do now? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2020;2020(1):306–11. doi: 10.1182/hematology.2020000115.
- Carlton G, Trotman J. Time for an individualized approach to first-line management of follicular lymphoma. *Haematologica*. 2022;107(1):7–18. doi: 10.3324/haematol.2021.278766.
- Нестерова Е.С., Кравченко С.К., Мангасарова Я.К. и др. Фолликулярная лимфома. Высокодозная иммунохимиотерапия с трансплантацией аутологичных стволовых клеток крови: результаты первого проспективного исследования в России. *Терапевтический архив*. 2016;88(7):62–71. doi: 10.17116/terarkh201688762-71. [Nesterova ES, Kravchenko SK, Mangasarova YaK, et al. Follicular lymphoma. High-dose immunochemotherapy with autologous blood stem cell transplantation: Results of the first prospective study in Russia. *Terapevticheskii arkhiv*. 2016;88(7):62–71. doi: 10.17116/terarkh201688762-71. (In Russ)]
- Нестерова Е.С., Кравченко С.К., Ковригина А.М. и др. Фолликулярная лимфома: результаты многоцентрового исследования терапии первой линии препаратами бендамустин и ритуксимаб; факторы риска неблагоприятных событий (протокол FL-RUS-2013). *Онкогематология*. 2018;13(3):10–24. doi: 10.17650/1818-8346-2018-13-3-10-24. [Nesterova ES, Kravchenko SK, Kovrigina AM, et al. Follicular lymphoma: results of multicenter study of first-line therapy with bendamustine and rituximab; risk factors for adverse events (FL-RUS-2013 protocol). *Oncohematology*. 2018;13(3):10–24. doi: 10.17650/1818-8346-2018-13-3-10-24. (In Russ)]
- Нестерова Е.С., Кравченко С.К., Барях Е.А. и др. Трансплантация аутологичных стволовых клеток крови в первой ремиссии фолликулярной лимфомы как «терапия спасения» пациентов с факторами неблагоприятного прогноза. Результаты первого проспективного исследования. *Современная онкология*. 2016;18(5):31–2. doi: 10.26442/1815-1434\_2016.5.31-32. [Nesterova ES, Kravchenko SK, Baryah EA, et al. Autologous stem cells transplantation in the first remission of follicular lymphoma as “rescue therapy” in patients with unfavorable prognosis factors. The first prospective study results. *Journal of Modern Oncology*. 2016;18(5):31–2. doi: 10.26442/1815-1434\_2016.5.31-32. (In Russ)]
- Нестерова Е.С., Кравченко С.К., Ковригина А.М. и др. Фолликулярная лимфома: критерии выбора терапии первой линии. *Терапевтический архив*. 2019;91(8):75–83. doi: 10.26442/00403660.2019.08.000388. [Nesterova ES, Kravchenko SK, Kovrigina AM, et al. Follicular lymphoma: first-line selection criteria of treatment. *Terapevticheskii arkhiv*. 2019;91(8):75–83. doi: 10.26442/00403660.2019.08.000388. (In Russ)]
- Rummel MJ, Maschmeyer G, Ganser A, et al. Bendamustine plus rituximab (B-R) versus CHOP plus rituximab (CHOP-R) as first-line treatment in patients with indolent lymphomas: Nine-year updated results from the StiL NHL1 study. *J Clin Oncol*. 2017;35(15\_suppl):7501. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.7501.

**28.** Нестерова Е.С., Яцык Г.А., Луцик Н.С. и др. Информативность диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии всего тела и позитронно-эмиссионной томографии с компьютерной томографией при фолликулярной лимфоме. *Терапевтический архив*. 2020;92(7):55–62. doi: 10.26442/00403660.2020.07.000774.

[Nesterova ES, Yatsyk GA, Lutsik NS, et al. Informativeness of whole-body diffusion-weighted magnetic resonance imaging and positron emission tomography with computed tomography in follicular lymphoma. *Terapevticheskii arkhiv*. 2020;92(7):55–62. doi: 10.26442/00403660.2020.07.000774. (In Russ)]

**29.** Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, et al. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(4):842–54. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0773.

**30.** Kahl BS, Yang DT. Follicular lymphoma: evolving therapeutic strategies. *Blood*. 2016;127(17):2055–63. doi: 10.1182/blood-2015-11-624288.

**31.** Morschhauser F, Tilly H, Chaidos A, et al. Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(11):1433–42. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30441-1.

**32.** Fischer T, Zing NPC, Chiattoni CS, et al. Transformed follicular lymphoma. *Ann Hematol*. 2018;97(1):17–29. doi: 10.1007/s00277-017-3151-2.

