

*На правах рукописи*

**Самарина Светлана Валерьевна**

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ДИФфуЗНОЙ  
В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ  
НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
КЛИНИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ  
ПОКАЗАТЕЛЕЙ**

14.01.21 – гематология и переливание крови

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Киров  
Санкт-Петербург

2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» Федерального медико-биологического агентства и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства»

**Научные руководители:**

Грицаев Сергей Васильевич, д.м.н.

Дьяконов Дмитрий Андреевич, к.м.н.

**Официальные оппоненты:**

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

**Барях Елена Александровна**, доктор медицинских наук, профессор кафедры гематологии и трансфузиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущее учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2021 г. в \_\_ : \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.074.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России) по адресу: 191024, г. Санкт-Петербург, улица 2-я Советская, д. 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на сайте ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России ([www.bloodscience.ru](http://www.bloodscience.ru)).

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук

Татьяна Валентиновна Глазанова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) - наиболее часто встречающийся вариант агрессивных неходжкинских лимфом. Заболевание отличается разнообразием морфологических, иммунофенотипических и молекулярно-генетических характеристик, проявляется склонностью к быстрому прогрессирующему росту, имеет неблагоприятный прогноз и высокую летальность [M. Crump, 2017].

Учитывая гетерогенность ДВККЛ, принципиальное значение приобретает стратификация больных на группы риска в дебюте заболевания. К настоящему времени разработано значительное число шкал, позволяющих с той или иной степенью достоверности прогнозировать вероятность возникновения рецидива и длительность выживаемости больных. Наибольшее распространение получил Международный прогностический индекс (International Prognostic Index, IPI), разработанный в 1993 году [M. Shipp, 1993]. Однако шкала IPI не учитывает морфологическое и молекулярно-генетическое разнообразие заболевания, что наглядно демонстрируют результаты ответа больных ДВККЛ на индукционную терапию по схеме RCHOP, когда в 25-30% случаев достигается только частичный ответ, у 20% больных регистрируется первичная резистентность и еще у 10% возникает ранний рецидив заболевания [M. Shipp, 1993].

Улучшению качества прогнозирования течения заболевания способствовало выделение GCB и ABC подтипов ДВККЛ, а также изучение мутационного статуса гена *c-MYC* в сочетании с экспрессией генов *BCL2* и/или *BCL6* и выделение double-hit и triple-hit (DH и TH) вариантов лимфомы [A. Alizadeh, 2000; G. Lenz, 2008; N. Johnson, 2009]. Тем не менее, до настоящего времени не разработаны подходы к определению прогноза с учетом ключевых иммунологических и генетических механизмов, формирующих патологический клон у больных с однотипной гистологической картиной заболевания.

В последнее десятилетие в клинической и экспериментальной онкологии большое внимание уделяется вопросам иммунологии и поиску новых мишеней для лечебного воздействия в индукционной терапии ДВККЛ. Перспективным направлением является определение уровня экспрессии белков PD-1 и PD-L1, изучение механизмов их регуляции, а также оценке их прогностической значимости [L.Y. Hu, 2017]. Опухолевые клетки используют PD-1/PD-L1-сигнальный путь для предотвращения активации опухоль-специфических Т-лимфоцитов и тем самым уклоняются от распознавания иммунной системой. Это дает возможность рассматривать данные белки в качестве возможных «мишеней» для таргетной терапии в индукционном периоде, а также для определения их роли в прогнозе заболевания.

Таким образом, поиск новых диагностических маркеров, дальнейшее совершенствование систем прогноза течения заболевания, необходимость разработки новых алгоритмов диагностики и, соответственно, выбора интенсивности индукционной и противорецидивной терапии ДВККЛ, по-прежнему сохраняет свою актуальность.

### **Степень разработанности темы исследования**

Большинство прогностических шкал, используемых при ДВККЛ, включает в себя анализ клинико-лабораторных показателей, которые не могут отразить все особенности течения заболевания [M. Shipp, 1993; K. Prochazka, 2016; L. Sehn, 2007]. Перспективными направлениями являются использование в прогностической системе иммуногистохимических или молекулярных маркеров и их комбинаций [Z.Y. Xu-Monette, 2016]. Опубликованы единичные сообщения о прогностическом значении экспрессии белков PD-L1 и PD-1 на клетках опухолевого субстрата при ДВККЛ [J. Kiyasu, 2015; D. Kwon, 2016; L.Y. Hu, 2017]. Не исключено, что определение порогового уровня экспрессии белков PD-L1 и PD-1 в дебюте заболевания позволит с большей вероятностью оценить роль контрольных иммунных точек в прогнозе заболевания и сформулировать показания для проведения таргетной терапии в индукционном периоде. До настоящего времени окончательно не сформирована общепринятая точка зрения на прогностический потенциал различных иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров.

**Цель:** Повышение качества стратификации больных ДВККЛ путем комплексного использования иммуногистохимических характеристик опухоли и шкалы IP1 при диагностике заболевания.

### **Задачи:**

1. Оценить эффективность индукционной терапии по схеме RCHOP в зависимости от клинических показателей и биологических характеристик ДВККЛ.
2. Установить прогностическое значение комплексного использования иммуногистохимического подтипа лимфомы и шкалы IP1 путем применения метода машинного обучения CART (Classification and Regression Tree).
3. Определить пороговое значение экспрессии белков PD-L1 и PD-1 на клетках опухолевого субстрата больных ДВККЛ, позволяющие распределить пациентов с ДВККЛ на группы, различающиеся по ОБ (общей выживаемости) и БПВ (беспрогрессивной выживаемости).
4. Обнаружить взаимосвязь экспрессии PD-L1 и PD-1 у больных ДВККЛ с клинико-лабораторными характеристиками опухоли.
5. Установить ассоциацию экспрессии маркеров PD-L1 и PD-1 с общей и беспрогрессивной

выживаемостью больных ДВККЛ.

### **Научная новизна исследования**

Впервые с помощью метода машинного обучения CART предложен способ стратификации больных ДВККЛ путем комплексного использования иммуногистохимического подтипа заболевания и шкалы IPI.

Впервые установлены пороговые значения биомаркеров PD-L1 и PD-1 методом CART.

Проанализирована взаимосвязь клинико-лабораторных характеристик больных ДВККЛ с экспрессией белков PD-L1 и PD-1 на клетках опухолевого субстрата.

Продемонстрировано прогностическое значение экспрессии белка PD-L1 у пациентов с ДВККЛ в группе высокого риска по шкале IPI, с выделением подгруппы больных с крайне неблагоприятным прогнозом.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Комплексное использование иммуногистохимического подтипа и шкалы IPI способствует улучшению стратификацию больных ДВККЛ на этапе диагностики заболевания.

Определение экспрессии PD-L1 в группе высокого риска по какой шкале IPI в дебюте заболевания позволяет выделить категорию больных с наиболее неблагоприятным течением ДВККЛ, что может служить основанием для интенсификации терапии и/или применения таргетных препаратов.

### **Методология и методы исследования**

При выполнении работы использовались ретроспективный анализ клинических и лабораторных данных, статистические методы. Объект исследования – пациенты с впервые установленным диагнозом ДВККЛ, получавшие терапию 1 линии по схеме RCHOP. Изучаемые явления: взаимосвязь ответа на индукционную терапию с клинико-лабораторными параметрами больных ДВККЛ, сочетание IPI и иммуногистохимических подтипов как новый алгоритм прогноза течения заболевания, экспрессия белков PD-1 и PD-L1 на клетках опухолевого субстрата ДВККЛ.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Эффективность индукционной терапии по схеме RCHOP зависит от соматического статуса пациента, варианта прогностического индекса и уровня ЛДГ, стадии заболевания и не зависит от иммуногистохимического подтипа ДВККЛ.
2. Сочетанное использование шкалы IPI и иммуногистохимических подтипов (GCB и non-

GCB) повышает качество стратификации больных ДВККЛ.

3. Гиперэкспрессия PD-L1 на клетках опухолевого субстрата коррелирует с non-GCB подтипом ДВККЛ

4. Уровень экспрессии белка PD-L1  $\geq 24,5\%$  на клетках опухолевого субстрата ассоциирован с неблагоприятным прогнозом у больных ДВККЛ высокого риска.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Диссертационная работа включает в себя анализ результатов диагностики и лечения 97 больных ДВККЛ. Достоверность результатов проведенной научной работы подтверждается использованием сертифицированного лабораторного оборудования, статистических программ для обработки качественных и количественных данных, соответствующих цели и задачам исследования.

Основные положения диссертации представлены в 8 докладах на научно-практических конференциях молодых ученых (Киров, 2018), «Алгоритмы диагностики и современные подходы к терапии лимфопролиферативных заболеваний» (Киров, 2019), «Злокачественные лимфомы» с международным участием (Москва, 2018), «Центр передового опыта в городской клинической больнице им. Боткина» (Москва, 2020); «Лимфофорум» (Москва, 2020); «Современные подходы к диагностике и лечению диффузной В-крупноклеточной лимфомы» (Екатеринбург 2021), «Лимфофорум» (Москва, 2021), на интернет-конференции «Чем мы лечим ДВККЛ сегодня? Опыт различных центров» (Москва, 2021).

Результаты работы представлены в 4 постерных докладах на конференциях: «Злокачественные лимфомы» в 2018, 2020 г.г. Москва, на IV и V Гематологических конгрессах в 2018, 2020 г. г. Москва.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, где изложены основные результаты диссертационных исследований.

Опубликовано 16 тезисов, в том числе 6 в сборниках трудов международных конгрессов: 23th Congress of European Hematology Association June 14-17 2018 Stockholm, 24th Congress of European Hematology Association June 13-16 2019 Amsterdam, 25th Congress of European Hematology Association June 09-14 2020 Frankfurt, 15th International Conference on Malignant Lymphoma June 18 – 22 2019 Lugano, 26th Congress of European Hematology Association June 10-13 2021 Vienna.

## **Внедрение**

Результаты диссертационной работы внедрены в практику лаборатории патоморфологии, используются в лечебном процессе клинико-диагностического, взрослого отделения гематологии и химиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства».

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 110 страницах машинописного текста. Состоит из введения, основной части, включающей обзор литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы содержит 155 источников, в том числе 6 отечественных и 149 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 21 таблицей.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Больные, материалы и методы исследования**

Проведен ретроспективный анализ данных за период с 2010 по 2018 гг. на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» и Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства».

В исследование включены 97 больных с диагнозом ДВККЛ, из которых 48 мужчин (49,5%) и 49 женщин (50,5%). Медиана возраста составила 59 лет (от 29 до 83 лет), 46 (47,4%) больных были старше 60 лет.

Диагноз ДВККЛ устанавливали в соответствии с классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2017 г. [S.H. Swerdlow, 2017]. В исследование не включались пациенты моложе 18 лет, с первичной лимфомой ЦНС, яичка, первичной медиастинальной крупноклеточной лимфомой, «Double-hit» и «Triple-hit» лимфомами. Все гистологические блоки подвергались проведению Fish анализа для исключения лимфом высокой степени злокачественности (DHL и THL).

Стадия заболевания устанавливалась в соответствии с классификацией Ann-Arbor по результатам КТ с внутривенным болюсным контрастированием органов грудной клетки, брюшной полости и малого таза [S.A. Rosenberg, 1977]. Первая, вторая, третья и четвертая

стадии диагностированы у 13 (13,4%), 27 (27,8%), 20 (20,6%) и 37 (38,2%) больных, соответственно. Соматический статус оценивался по шкале ECOG. Количество пациентов, имевших в дебюте заболевания  $\geq 2$  баллов – 43 (44,3%). Показатели ЛДГ выше референсных значений имели 75 (65,2%) пациентов. По результатам иммуногистохимического исследования у 36 (37,1%) обследованных диагностирован иммуногистохимический GCB подтип, у 61 (62,9%) – non-GCB. В соответствии с критериями IPI, низкий, промежуточный низкий, промежуточный высокий и высокий варианты установлены у 27 (27,8%), 27 (27,8%), 20 (20,6%) и 23 (23,8%) больных, соответственно. В зависимости от ответа на индукционную терапию пациенты были распределены в группы с ПО (полный ответ), ЧО (частичный ответ), стабилизацией и прогрессированием после индукционной терапии по схеме RCHOP: 60 (61,9%), 22 (22,7%), 7 (7,2%) и 8 (8,2%) больных соответственно. Медиана наблюдения за обследуемыми составила 17 (4-168) месяцев.

Экспрессия белка PD-L1 проанализирована в гистологических образцах на опухолевых клетках у 85 пациентов, экспрессия маркера PD-1 – исследована на клетках микроокружения у 68 больных. Медиана возраста больных в каждой группе составила 59 (29-83) лет.

Лечение проводилось во взрослом гематологическом отделении, в отделении дневного стационара клинико-диагностического отделения ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в период с 2010 по 2018 гг.. Все пациенты получали индукционную иммунохимиотерапию по схеме RCHOP. Ответ оценивался в соответствии с рекомендациями, разработанными международной рабочей группой в Лугано в 2014г. [B.D. Cheson, 2014].

В качестве материала для исследования были использованы образцы биопсии лимфоузлов или других, вовлеченных в патологический процесс, органов и тканей (парафиновые блоки), с дальнейшим проведением гистологического, иммуногистохимического, морфометрического анализа. Исследование для верификации диагноза и установления иммуногистохимического подтипа проводили в лаборатории патоморфологии ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

Морфологические, иммуногистохимические и морфометрические исследования PD-1, PD-L1 выполняли в лаборатории по изучению лейкозов РосНИИГТ ФМБА России. Иммуногистохимические реакции проводили по стандартной методике, основываясь на рекомендациях фирмы-производителя с соответствующими моноклональными антителами. Экспрессия белка PD-1 оценивалась на мембранах клеток микроокружения опухоли, изучение белка PD-L1 проводилось на мембранах опухолевых клеток.

Статистическую обработку результатов, полученных в ходе исследования, проводили с использованием MS Office Excel версии 2016, программного продукта IBM SPSS Statistics версии 25 и метода машинного обучения - дерева классификации и регрессии CART. Для сравнения частотных характеристик показателей применяли критерий  $\chi^2$  Пирсона. Анализ ОБ и БПВ



выполняли с применением метода Каплан-Мейера. Для сравнения кривых выживаемости использовали критерии log-rank test. Расчёты проводили с применением программного обеспечения для статистической обработки и визуализации данных R, версия 3.3.3. С целью выявления независимых факторов прогноза ДВККЛ применяли метод регрессии Кокса. Оптимальный пороговый уровень экспрессии для каждого из исследуемых биомаркеров устанавливали с помощью метода машинного обучения CART. Различия между показателями считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Оценка взаимосвязи ответа на лечение с клинико-лабораторными показателями

На первом этапе изучено значение клинико-лабораторных и иммуногистохимических характеристик опухоли в достижении ответа после индукционной терапии по схеме RCHOP.

При распределении ответов у больных с I-II и III-IV стадиями обнаружено, что регистрация ПО в 1,8 раз встречается чаще у пациентов с I-II стадиями, чем у больных с III-IV стадиями заболевания. В то же время частота достижения ЧО после индукционной терапии по схеме RCHOP в 2,3 раза выше при более распространенных вариантах ( $p_{1-2}=0,019$ ). Прогрессирующее течение заболевания после индукционной терапии не выявлено ни у одного пациента с I-II стадиями ( $p < 0,001$ ). Таким образом, глубина достижения ответа после стандартной терапии RCHOP определяется, в частности, распространенностью опухолевого процесса. Эффективность лечения данной схемой снижается при III-IV стадии заболевания (рисунок 1).

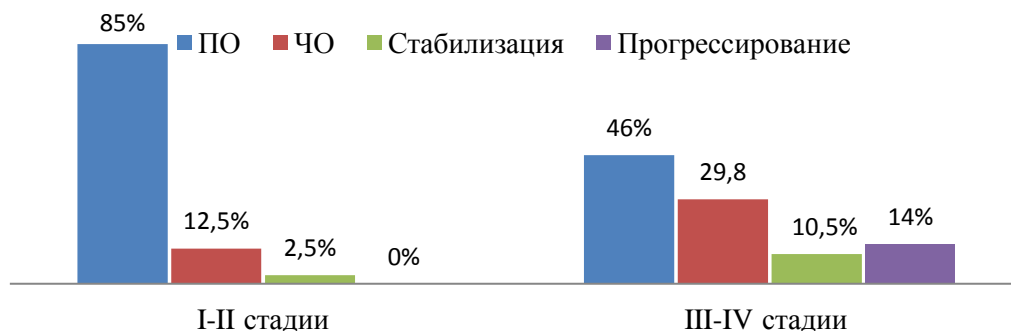


Рисунок 1 - Ответ на терапию в зависимости от стадии заболевания

При проведении сравнительного анализа результатов лечения у пациентов, имевших в дебюте заболевания соматический статус по шкале ECOG  $< 2$  и  $\geq 2$  баллов получены данные, свидетельствующие о статистически значимой взаимосвязи статуса пациентов с ответом на проведенную терапию ( $p < 0,001$ ). Так, пациенты, имевшие  $\geq 2$  баллов в дебюте заболевания,

достигают ПО в 2,3 раза реже, а ЧО регистрируется в 2,5 раза чаще, чем у пациентов с более благоприятным соматическим статусом. Это может быть связано с большой опухолевой массой и выраженной интоксикацией, а также коморбидностью, что ведет к редукции доз и удлинению межкурсовых интервалов. Ни у одного из пациентов с соматическим статусом  $<2$  баллов не отмечалась прогрессия заболевания, что отличает эту группу больных от соматически более тяжелых, где прогрессия обнаружена в 19% случаев (рисунок 2).

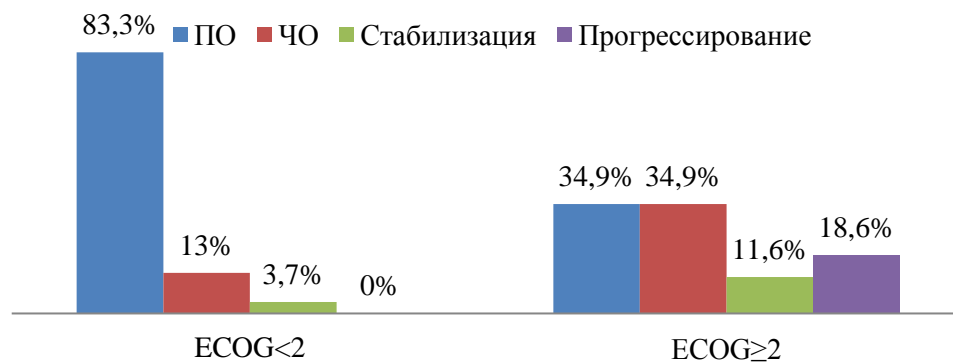


Рисунок 2 - Распределение ответа на лечение в зависимости от количества баллов по шкале ECOG

Обнаружена взаимосвязь концентрации ЛДГ у больных в дебюте заболевания с ответом на терапию ( $p=0,001$ ). При референсных значениях ЛДГ пациенты достигали ПО в 90% случаев, прогрессирующее течение заболевания отсутствовало. ПО при повышенном уровне ЛДГ определялся в 2 раза реже. Таким образом, данный лабораторный маркер рассматривается как показатель благоприятного ответа при референсных значениях в дебюте заболевания (рисунок 3).

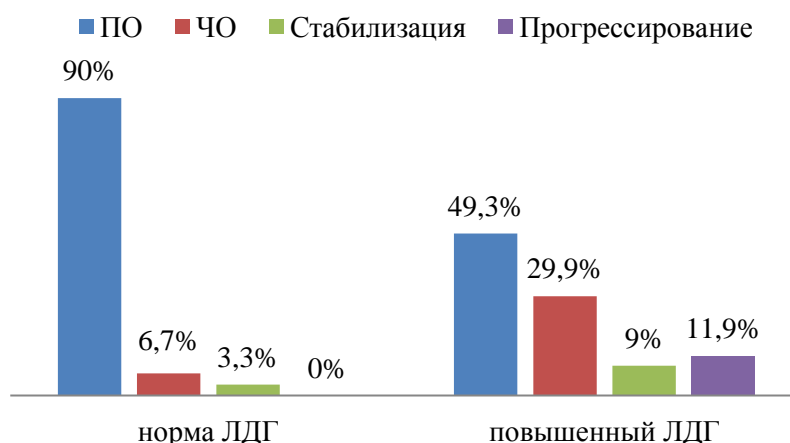


Рисунок 3 - Распределение ответа на лечение в зависимости от концентрации ЛДГ в сыворотке крови

При анализе распределения ответов на терапию в зависимости от группы риска IP1 установлены достоверные межгрупповые различия ( $p=0,001$ ). Пациенты с низким риском по

шкале IPI достигали ПО на индукционную терапию RCHOP в 85,2 % случаев. Частота достижения ПО при высоком риске ниже в 4 раза, чем при низком риске IPI. Обращает на себя внимание тот факт, что у больных с высоким риском зафиксирован ПО и прогрессирующее течение заболевания практически с одинаковой частотой, что свидетельствует о равной возможности пациентов как достичь ремиссию, так и не ответить на терапию при неблагоприятном прогнозе (рисунок 4).

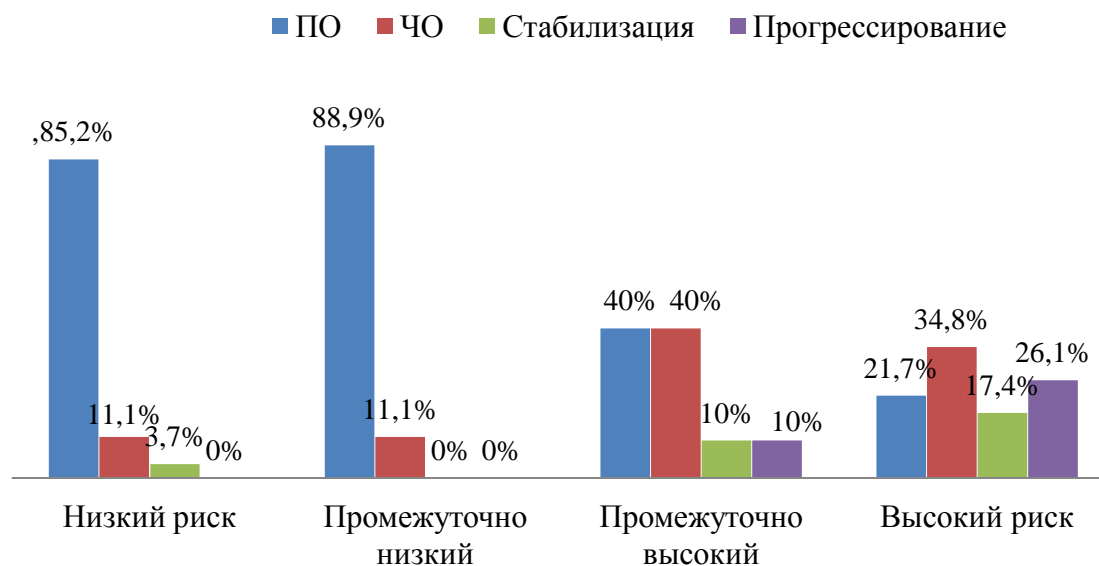


Рисунок 4 – Взаимосвязь ответа на лечение с группой риска по IPI

При анализе распределения ответов у больных с GCB и non-GCB иммуногистохимическими подтипами статистически значимых различий не выявлено ( $p=0,147$ ), но сохранялась тенденция к менее благоприятному ответу при non-GCB подтипе (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнение частоты ответа на терапию в зависимости от подтипа ДВККЛ

ИГХ подтип	Ответ на терапию				p
	Полный ответ, n=60 абс. (%)	Частичный ответ, n=22 абс. (%)	Стабилизация, n=7 абс. (%)	Прогрессирование (рецидив), n=8 абс. (%)	
	1	2	3	4	
GCB	25 (41,7)	9 (40,9)	0	2 (25)	p=0,147
non-GCB	35 (58,3)	13 (59,1)	7 (100)	6 (75)	

### Влияние клиничко-лабораторных показателей и иммуногистохимического подтипа на БПВ и ОВ

Проанализирована корреляция следующих клиничко-лабораторных характеристик: стадия заболевания, IPI, иммуногистохимический подтип, концентрация ЛДГ, статус по ECOG с ОВ и БПВ больных в регрессионной модели Кокса. Обнаружено, что высокий риск по IPI, подтип

non-GCB и тяжелый соматический статус больных оказывали значимое влияние на ОВ и БПВ (таблица 2).

Таблица 2 - Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса для общей и беспрогрессивной выживаемости

Параметр	ОВ			БПВ		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	P
ЛДГ повышенный	2,9	0,85-9,68	0,090	2,2	1,01-4,75	0,051
ИГХ подтип (non-GCB)	6,9	1,62-29,69	0,009*	2,5	1,19-5,29	0,016*
Риск IP1 высокий	7,5	2,15-26,76	0,002*	5,4	2,26-13,06	<0,001*
Риск IP1 промежуточный высокий	1,8	0,40-8,06	0,440	2,4	0,91-6,19	0,075
Риск IP1 промежуточный низкий	0,7	0,12-4,16	0,691	0,9	0,35-2,68	0,948
Стадия 3	2,4	0,68-8,53	0,176	2,3	0,94-5,50	0,068
Стадия 4	2,4	0,78-7,49	0,127	1,8	0,81-4,12	0,068
ECOG $\geq 2$ баллов	3,9	1,54-10,09	0,004*	2,8	1,46-5,25	0,002*

Примечание: \*- различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

В многофакторной модели независимое прогностическое значение в течении заболевания имел высокий риск IP1 и подтип non-GCB (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты многофакторного регрессионного анализа Кокса предикторов общей и беспрогрессивной выживаемости

Параметр	ОВ			БПВ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
ИГХ подтип (non-GCB)	5,2	1,21-22,71	0,027*	2,5	1,17-5,27	0,018*
Риск IP1 высокий	5,3	0,88-31,48	0,049*	5,1	1,51-17,15	0,009*
ECOG $\geq 2$ баллов	1,3	0,32-5,24	0,726	1,1	0,43-3,05	0,781

Примечание: \*- различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Полученные результаты обосновывают целесообразность комбинированного подхода к данным системам с целью повышения уровня стратификации больных ДВККЛ на группы риска.

### **Алгоритм прогнозирования эффективности индукционной терапии R-CHOP методом CART**

На втором этапе исследования для создания алгоритма, основанного на сочетании IP1 и иммуногистохимических подтипов, выбран метод машинного обучения CART, позволяющий рекурсивно делить исходный набор данных на подгруппы, которые наиболее гомогенны относительно определенных признаков внутри каждой подгруппы и наиболее гетерогенны между ними.

В результате получена модель прогнозирования, согласно которой больные разделены на

3 группы. Группа 1 или низкого риска включает с себя GCB подтип в сочетании с низким, промежуточным низким и промежуточным высоким IPI. Группа 2 или промежуточного риска - non-GCB в сочетании с низким, промежуточным низким и промежуточным высоким IPI). Группа 3 или группа высокого риска IPI представляет собой высокий риск по IPI независимо от иммуногистохимического подтипа. Различия в исследуемых группах пациентов достигли статистической значимости ( $p < 0,001$ ). В группе 1 прогнозируется благоприятное течение заболевания при назначении в первой линии терапии схемы RCHOP: 2-летняя и 4-летняя ОВ соответствует 100%. Во 2 группе – 2-летняя ОВ составила 76%, 4-летняя – 73%. В группе 3 прогноз самый неблагоприятный: 2-летняя и 4-летняя ОВ составила всего 36%, что доказывает недостаточную эффективность терапии RCHOP (рисунок 5).

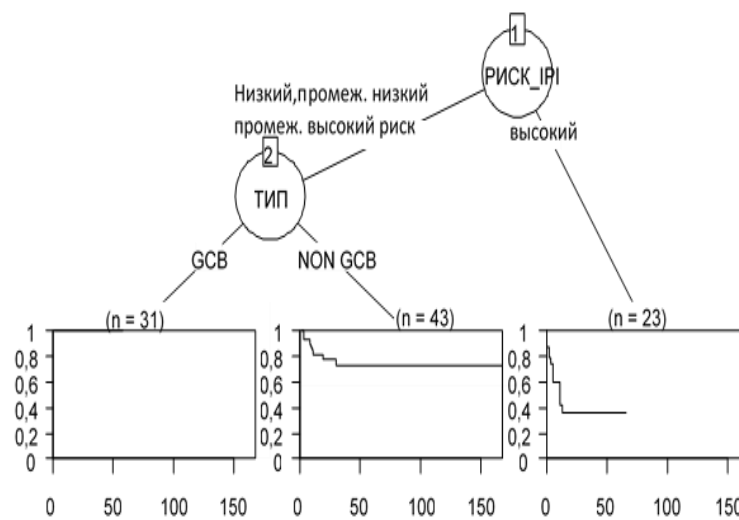


Рисунок 5 - Алгоритм прогноза общей выживаемости больных в зависимости от иммуногистохимического подтипа и группы риска по IPI.

Подтверждена прогностическая значимость модели, сформированной путем комбинации иммуногистохимического подтипа и групп риска IPI в БПВ: различия между группами статистически достоверны ( $p < 0,001$ ). Так, 2-летняя БПВ в группах низкого, промежуточного и высокого риска составляла 81%, 50%, 25% соответственно (рисунок 6).

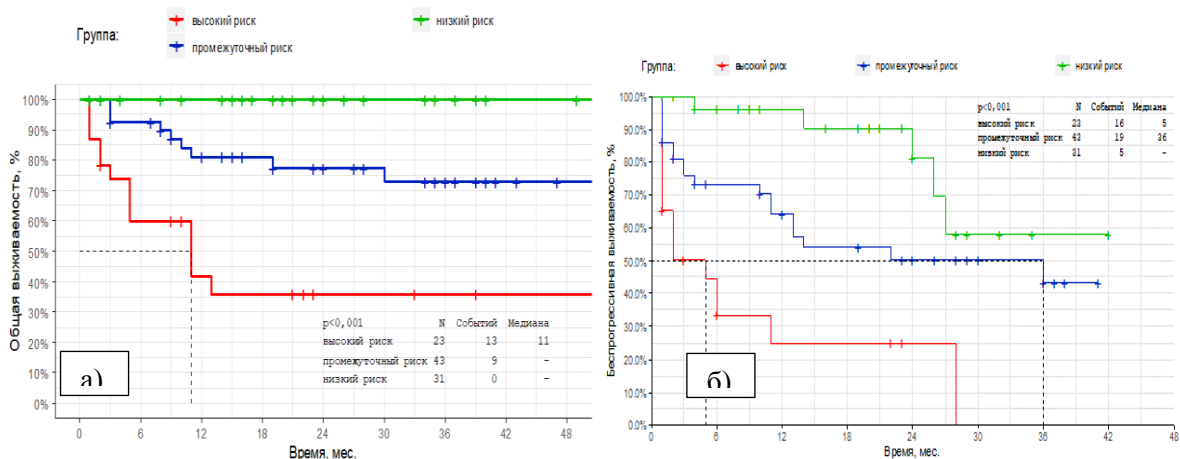


Рисунок 6 – а) ОВ и б) БПВ больных ДВККЛ в группах, сформированных при сочетании групп риска по шкале IPI и иммуногистохимического подтипа

Таким образом, сочетание иммуногистохимического подтипа и шкалы IPI позволяет эффективно стратифицировать больных на группы риска. Преимущество данного подхода состоит в использовании биологических факторов в комбинации со шкалой IPI.

### **Ассоциация экспрессии белка PD-L1 с клинико-лабораторными показателями и выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой**

На третьем этапе исследования определена роль экспрессии белка PD-L1 в прогнозе заболевания в общей когорте и в модели, полученной путем сочетания групп риска по шкале IPI и иммуногистохимического подтипа.

Проанализированы данные 85 пациентов. С помощью метода машинного обучения CART установлено пороговое значение экспрессии белка PD-L1 на опухолевых клетках, который соответствовал 24,5% (рисунок 7).

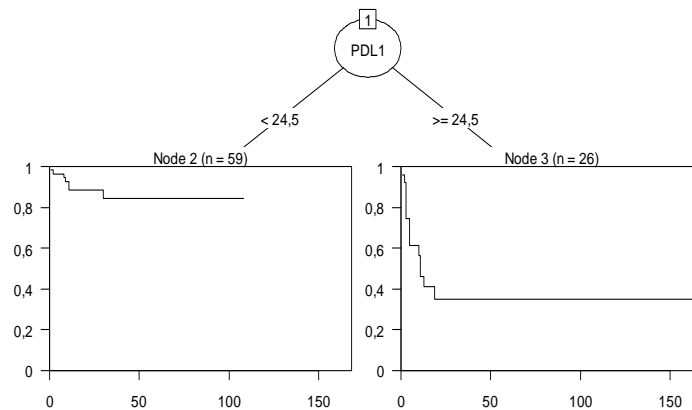


Рисунок 7 - Определение порогового уровня PD-L1 методом CART

С учетом полученных данных пациентов разделили на группы с высокой и низкой степенью экспрессии указанного маркера. Количество пациентов с гиперэкспрессией PD-L1 составило 26 (30,5%) от общего числа обследованных. В группу с низкой экспрессией вошли 59 (69,5%) больных (рисунок 8).

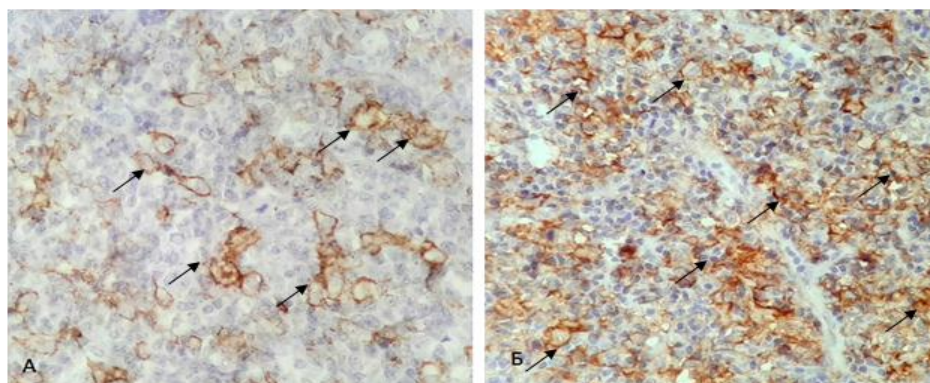


Рисунок 8 – а) низкая экспрессия (PD-L1<24,5%);

б) высокая экспрессия (PD-L1≥24,5%)

Проведен сравнительный анализ клинико-лабораторных характеристик в зависимости от высокой и низкой экспрессии PD-L1 и проанализирована прогностическая значимость указанного маркера в общей когорте и в группах, сформированных на основе комбинации иммуногистохимического подтипа и шкалы IPI.

Установлено, что доля опухолевых клеток с гиперэкспрессией чаще выявлялась у пациентов с non-GCB вариантом, чем у больных с GCB подтипом ДВККЛ: 81% против 19% ( $p=0,05$ ). Не обнаружено корреляции экспрессии PD-L1 с полом, возрастом, стадиями заболевания, концентрацией ЛДГ, группами риска по IPI. Выявлена тенденция к увеличению частоты встречаемости гиперэкспрессии исследуемого белка у мужчин, чем у женщин: 65% и 35% соответственно;  $p=0,095$  (таблица 4).

Таблица 4 - Взаимосвязь экспрессии PD-L1 с клинико-лабораторными показателями

Показатель	PD-L1<24,5% n=59, абс. (%)	PD-L1≥24,5% n=26, абс. (%)	P
Пол:			
- мужской	27 (46)	17 (65)	p=0,095
- женский	32 (54)	9 (35)	
Возрастная группа:			
< 60 лет	36 (61)	15 (57)	p=0,774
≥ 60 лет	23 (39)	11 (43)	
Концентрация ЛДГ:			
- повышена	37 (63)	21 (81)	p=0,099
- нормальная	22 (37)	5 (19)	
Стадия:			
- I	11 (19)	2 (7)	p=0,457
- II	16 (27)	7 (27)	
- III	11 (19)	8 (31)	
- IV	21 (35)	9 (35)	

## Продолжение таблицы 4

Риск по IPI:			
- низкий	17(29)	7 (27)	p=0,643
- промежуточно низкий	19 (32)	5 (19)	
- промежуточно высокий	12 (20)	5 (19)	
- высокий	11 (19)	9 (35)	
Подтип:			
- GCB	24 (41)	5 (19)	p=0,05*
- non-GCB	35 (59)	21 (81)	

Примечание: нормальные показатели концентрации ЛДГ в сыворотке крови 145-224 Ед/л.

По результатам проведенного исследования определено, что гиперэкспрессия PD-L1 в общей когорте ассоциируется с более низкими показателями выживаемости. Так, 2-летняя БПВ имела достоверно значимые различия между высокой и низкой экспрессией исследуемого белка: 34% и 58% соответственно ( $p=0,012$ ). Медиана БПВ при гиперэкспрессии PD-L1 соответствовала 5 месяцам, при низкой экспрессии - 36 месяцам. При анализе 2-летней ОБ обнаружено, что продолжительность жизни больных в группе с высокой экспрессией исследуемого белка была ниже в 2,5 раза, чем с низкой ( $p<0,001$ ). Медиана ОБ в группе с низкой экспрессией маркера не была достигнута, с гиперэкспрессией - соответствовала 11 месяцам (рисунок 9).

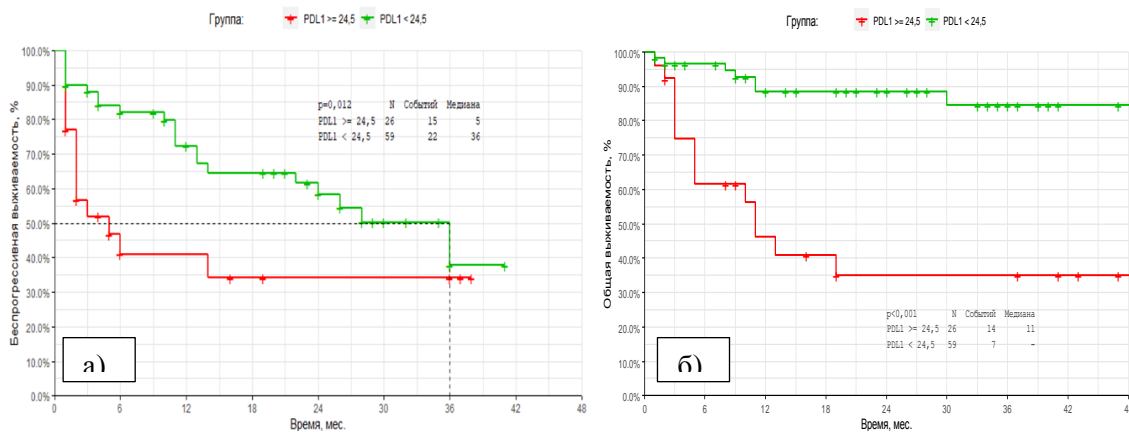


Рисунок 9 - Взаимосвязь уровня экспрессии PD-L1 и 2-летней БПВ (а) и ОБ (б) в общей когорте пациентов

Проведен анализ корреляции выживаемости больных ДВККЛ со степенью выраженности экспрессии PD-L1 в группах, сформированных путем комбинации варианта IPI и иммуногистохимического подтипа. Не обнаружено статистически значимых различий между уровнями экспрессии PD-L1 при анализе БПВ и ОБ в 1 группе. Низкая и высокая экспрессия PD-L1 выявлена у 21 (84%) и 4 (16%) больных, соответственно. При низкой экспрессии 2-летняя БПВ соответствовала 76%, медиана не достигнута (рисунок 10). У 4 пациентов с гиперэкспрессией биомаркера PD-L1 продолжительность жизни от постановки диагноза до прогрессии составила 4, 16, 2 и 6 месяцев.



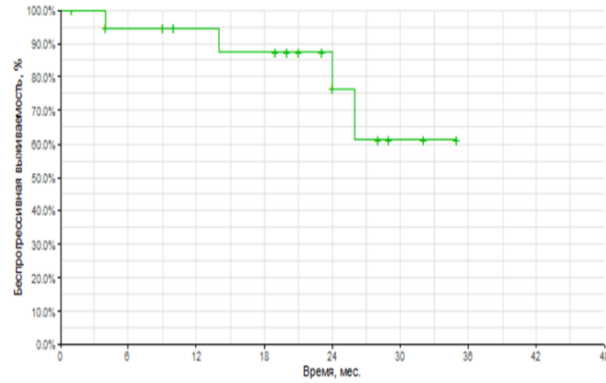


Рисунок 10 - Беспрогрессивная выживаемость пациентов с ДВККЛ из группы 1 (GCV подтип и IPI риск любой кроме высокого) с низкой экспрессией PD-L1

В группе 2 БПВ не имела статистически значимых различий у пациентов с высокой и низкой экспрессией исследуемого маркера ( $p=0,803$ ). При этом 2-летняя ОВ оказалась в 1,6 раза ниже при гиперэкспрессии PD-L1 ( $p=0,049$ ). Медиана в обоих случаях не достигнута (рисунок 11).

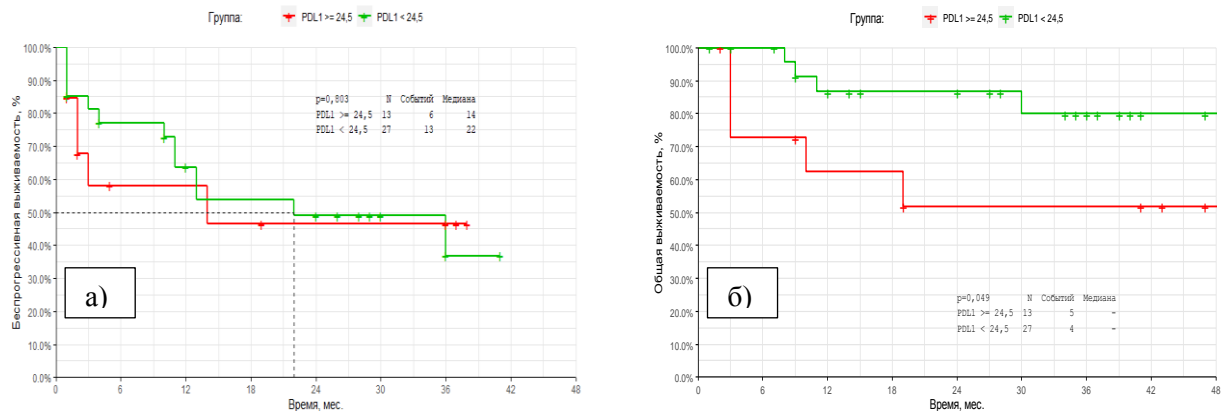


Рисунок 11 – БПВ (а) и ОВ (б) пациентов с ДВККЛ из группы 2 (non-GCV подтип и IPI риск любой кроме высокого)

При анализе группы больных с высоким риском обнаружено, что у 90% пациентов через 6 месяцев после инициации лечения по схеме RCHOP развился рецидив либо прогрессирование заболевания, максимальная продолжительность жизни составила 13 месяцев, что предопределяет крайне неблагоприятное течение заболевания при гиперэкспрессии PD-L1. Таким образом, больных ДВККЛ с высоким риском IPI и гиперэкспрессией PD-L1 в дебюте заболевания, следует относить к группе сверхвысокого риска. С помощью метода регрессии Кокса установлено, что экспрессия белка  $PD-L1 \geq 24,5\%$  является независимым фактором прогноза ОВ и БПВ: риск развития неблагоприятного события как для ОВ, так для БПВ был в 4,1 раза выше при гиперэкспрессии маркера по сравнению с его низким уровнем (рисунок 12).

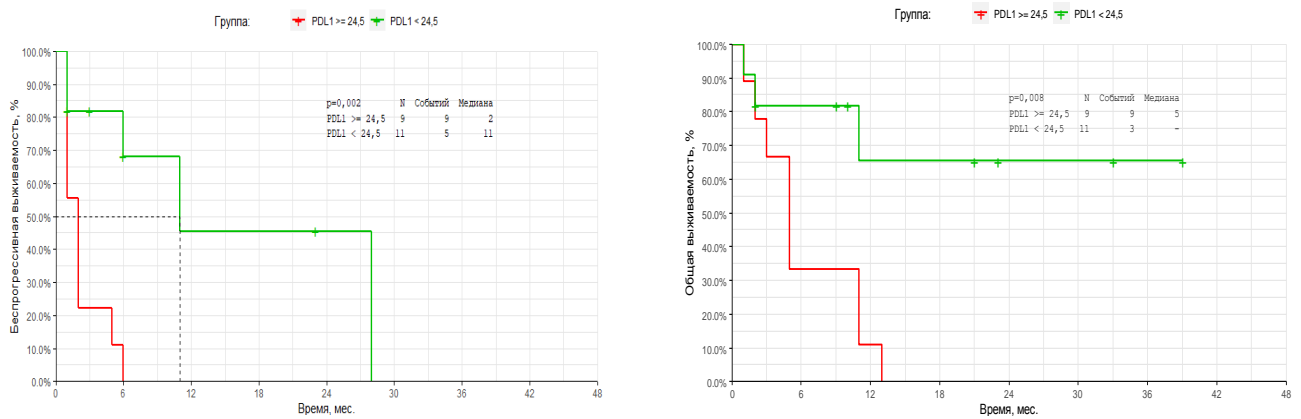


Рисунок 12 – БПВ (А) и ОБ (Б) пациентов из группы высокого риска (высокий IPI-риск независимо от подтипа GCB/non-GCB)

С использованием регрессионного анализа Кокса выполнена оценка значения высокого риска по шкале IPI, подтипа non-GCB и гиперэкспрессии PD-L1 для БПВ и ОБ (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса предикторов общей и беспрогрессивной выживаемости больных ДВККЛ

Параметр	ОБ			БПВ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Экспрессия PD-L1 ( $\geq 24,5\%$ )	6,5	2,6-16,2	<0,001*	5,2	2,11-13,1	<0,001*
ИГХ подтип (non-GCB)	5,7	1,34-24,7	0,019*	5,9	1,38-25,5	0,017*
Риск IPI (высокий)	6,5	2,72-15,7	<0,001*	6,2	2,56-15,1	<0,001*

Примечание: \*- различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

По результатам анализа указанные критерии статистически значимо влияли на ОБ и БПВ. При этом риск развития неблагоприятного исхода при гиперэкспрессии PD-L1 и высоком IPI был сопоставимым. С использованием многофакторного регрессионного анализа Кокса оценено независимое влияние нескольких предикторов на ОБ и БПВ (таблица 6).

Таблица 6 – Результаты многофакторного регрессионного анализа Кокса предикторов общей и беспрогрессивной выживаемости у больных ДВККЛ

Параметр	ОБ			БПВ		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Экспрессия PD-L1 $\geq 24,5\%$	4,1	1,58-10,7	0,004*	4,1	1,62-10,7	0,003*
ИГХ подтип (non-GCB)	3,2	0,71-14,1	0,132	1,9	0,83-4,14	0,133
Риск IPI высокий	3,7	1,43-12,5	0,031*	4,6	1,86-11,7	0,001*

Примечание: \*- различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Независимыми факторами прогноза течения ДВККЛ являлись экспрессия PD-L1  $\geq 24,5\%$  и высокий риск по шкале IPI. Наличие гиперэкспрессия маркера увеличивало риск развития

неблагоприятного события в 4 раза ( $p=0,004$  и  $p=0,003$  соответственно). Биомаркер PD-L1 расценен как независимый фактор прогноза течения ДВККЛ в группе пациентов высокого риска.

### **Ассоциация экспрессии белка PD-1 с клинико-лабораторными показателями и выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой**

Исследование экспрессии белка PD-1 на клетках опухолевого субстрата проведено у 68 больных. С помощью метода CART определен пороговый уровень экспрессии белка PD-1, который равнялся 0%. По результатам исследования не обнаружено корреляции между экспрессией PD-1 с полом, возрастом, стадией, IPI, иммуногистохимическим подтипом.

После проведения однофакторного анализа не выявлено достоверных различий в ОБ и БПВ при наличии и отсутствии экспрессии PD-1 ни в общей когорте, ни в группах риска с учетом комбинации шкалы IPI и иммуногистохимического подтипа.

Суммируя все полученные данные можно сделать заключение, что определение риска по шкале IPI недостаточно для эффективной стратификации больных ДВККЛ на группы риска. Это обосновывает потребность в новых биологических маркерах, сопряженных с неблагоприятным течением ДВККЛ. Создание комбинированной модели с использованием биологических факторов позволяет разделить пациентов на группы риска и выделить группу неблагоприятного прогноза выживаемости. Обнаружение гиперэкспрессии PD-L1 в группе высокого риска ассоциировано с крайне неблагоприятным ответом на терапию RCHOP и может являться дополнительным фактором прогноза течения ДВККЛ.

#### **Выводы:**

1. Полный ответ на индукционную схему RCHOP регистрируется у 61% больных ДВККЛ и коррелирует со значениями шкал ECOG, IPI, стадиями заболевания и концентрацией ЛДГ. Взаимосвязи между иммуногистохимическими подтипами и достижением полного ответа не обнаружено.

2. Предложенная комплексная модель, полученная методом CART и включающая в себя иммуногистохимические подтипы и группы риска по шкале IPI, позволяет на этапе диагностики ДВККЛ стратифицировать больных на 3 группы, различающиеся по выживаемости. Показатели БПВ и ОБ в группах значимо различались: БПВ в группах низкого, промежуточного и высокого рисков соответствовала 81%, 50%, 25%; ОБ соответствовала 100%, 76%, 36% соответственно ( $p<0,001$ ).

3. Установлен прогностически значимый уровень экспрессии белка PD-L1  $\geq 24,5\%$  на клетках опухолевого субстрата у больных ДВККЛ, позволяющий распределить больных ДВККЛ

на группы, различающиеся по ОВ и БПВ.

4. Обнаружена взаимосвязь гиперэкспрессии PD-L1 на клетках опухолевого субстрата с non-GCB подтипом ( $p=0,05$ ). Ассоциации маркера PD-1 с клинико-лабораторными характеристиками ДВККЛ не выявлено.

5. Гиперэкспрессия белка PD-L1 коррелирует с крайне неблагоприятным прогнозом заболевания у больных с высоким риском ИР при проведении индукционной иммунохимиотерапии по схеме RCHOP: 2-летняя БПВ при высокой и низкой экспрессии 0% и 46% ( $p=0,002$ ), ОВ 0% и 66% ( $p=0,008$ ). Взаимосвязи маркера PD-1 с выживаемостью пациентов с ДВККЛ не выявлено.

### Практические рекомендации

1. При определении прогноза при ДВККЛ целесообразно использовать комплексную модель, включающую в себя совокупный анализ группы риска по шкале ИР и иммуногистохимический подтип.

2. У больных с высоким риском ИР необходимо включение в алгоритм диагностики информации об уровне экспрессии PD-L1 на клетках опухолевого субстрата, что позволит выделить пациентов с крайне агрессивным течением заболевания, являющихся кандидатами на новые схемы лечения в фазе индукции

### Список сокращений

**БПВ** – беспрогрессивная выживаемость

**ДВККЛ** – диффузная В-крупноклеточная лимфома

**ИГХ** – иммуногистохимия

**КТ** - компьютерная томография

**ЛДГ** – лактатдегидрогеназа

**ОВ** – общая выживаемость

**ПО** – полный ответ

**ЧО** – частичный ответ

**ABC /non- GCB** – (non -Germinal center B-cell), В-клетка постгерминального происхождения

**BCL** – (B-cell lymphoma), белок В-клеточной лимфомы

**CART** – (Classification and Regression Tree), деревья классификации и регрессии

**DHL** – double-hit lymphoma

**ECOG** – (Eastern Cooperative Oncology Group), Восточная Кооперативная Группа

Исследования Рака

**GCB** – (Germinal center B-cell), В-клетка герминального происхождения

**IPI** – (International Prognostical Index), Международный Прогностический Индекс

**PD-1** – (Programmed cell death – 1), рецептор запрограммированной клеточной смерти 1

**PD-L1** – (Programmed cell death ligand – 1), лиганд рецептора запрограммированной смерти 1

**THL** – triple-hit lymphoma

**R-CHOP** – (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicinum, Oncovin, Prednisolone), ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизолон

### Список публикаций

1. Самарина С.В., Назарова Е.Л., Минаева Н.В., Зорина Н.А., Зотина Е.Н., Грицаев С.В. Роль трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой с неблагоприятными факторами прогноза // Medline – 2018 - Том 19 – С. 249-257.
2. Самарина С.В., Назарова Е.Л., Минаева Н.В., Грицаев С.В. Клинико-гематологические маркеры прогноза ответа на терапию первой линии у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой // Клиническая онкогематология - 2019. - №12 – С. 68-72.
3. Самарина С.В., Лучинин А.С., Минаева Н.В., Дьяконов Д.А., Росин В.А., Ванеева Е.В., Грицаев С.В. Иммуногистохимический подтип и параметры международного прогностического индекса в новой модели прогнозирования течения ДВККЛ // Клиническая онкогематология – 2019 - №4 С.385-391.
4. Самарина С.В., Назарова Е.Л., Минаева Н.В., Осипова Е.С., Грицаев С.В. Клинико-гематологические маркеры прогноза ответа на терапию первой линии RCHOP у пациентов с диффузной в-крупноклеточной лимфомой // Гематология и трансфузиология - Москва. - 2020. - Т.63, №1. – С.173.
5. Самарина С.В., Назарова Е.Л., Минаева Н.В., Росин В.А. Федоровская Н.С., Грицаев С.В. Иммуногистохимические прогностические факторы ответа на терапию первой линии у больных диффузной в-крупноклеточной лимфомой // Гематология и трансфузиология - Москва. - 2020. - Т.63, №1. – С.173.
6. S. Samarina, E. Nazarova, N. Minaeva, E. Osipova, S. Grichev Clinical and hematological markers of the response forecast to first-line therapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma. // HemaSphere. - 2018. – Т.2. – Suppl. 1 – P. 716.
7. Самарина С.В., Лучинин А.С., Минаева Н.В., Дьяконов Д.А., Росин В.А., Ванеева Е.В., Грицаев С.В. Влияние иммуногистохимического подтипа и международного прогностического индекса на общую выживаемость больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой. // Сборник тезисов XV Российской конференции с международным участием «Злокачественные

лимфомы» 25-26.10.18 г.Москва.

8. Самарина С.В., Лучинин А.С., Минаева Н.В., Ванеева Е.В., Семенова Н.Ю., Грицаев С.В. Ассоциация клинико-морфологических показателей и выживаемости больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой с экспрессией PD-L1 // Сборник тезисов XV Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» 25-26.10.18 г.Москва.
9. S. Samarina, A. Luchinin, S. Gritsaev Immunohistochemical type adjusted-international prognostic index (I-IPI) is better for prognosis of outcome than standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma // HemaSphere. - 2019. - Т.3. – Suppl. 1 – P. 819.
10. Samarina S.V., Luchinin A.S., Minaeva N.V., Semenova N.Y., Gritsaev S. The significance of PD-L1 and PD-1 receptors expression in patients with diffuse B-cell large-cell lymphoma // 2019. - Hematological Oncology. - Vol. 37 Suppl. 2 June 2019. – P.361.
11. Самарина С.В., Лучинин А.С., Минаева Н.В., Дьяконов Д.А., Росин В.А., Ванеева Е.В., Грицаев С.В. Комплексное использование иммуногистохимического подтипа и международного прогностического индекса в новой модели прогнозирования течения диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы // Вестник гематологии. - 2019. Т.15. №3. С 61-62.
12. Самарина С.В. Лучинин А.С., Минаева Н.В., Ванеева Е.В., Семенова Н.Ю., Грицаев С.В. Значение экспрессии рецептора PD-1, и лиганда PD-L1 у больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой // Вестник гематологии 2019. Т.15. №4. С. 51-52.
13. Ванеева Е.В., Росин В.А., Дьяконов Д.А., Самарина С.В., Рылов А.В. Оценка прогностического значения экспрессии pSTAT3 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме на российской выборке пациентов // Сибирский научный медицинский журнал. - 2019. - Т.39, №5. - С. 125-133.
14. E. Vaneeva, V. Rosin, D. Dyakonov, S. Samarina, E. Poponina, A. Rylov, I. Paramonov STAT3 protein as a prognostic factor of diffuse large B-cell lymphoma // HemaSphere. - 2019. - Vol.3 (Suppl.1). - P. 833.
15. Ванеева Е.В., Росин В.А., Дьяконов Д.А., Самарина С.В., Рылов А.В. Прогностическое значение экспрессии белка STAT3 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии”. - Санкт-Петербург. - 2019. - С.61.
16. Самарина С.В, Лучинин А.С., Минаева Н.В., Семенова Н.Ю., Грицаев С.В. Прогностическое значение маркеров ангиогенеза CD34 у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой // Гематология и трансфузиология. – 2020.-Т. 65. - №1.- С. 213.
17. S.Samarina, A.Luchinin, N.Minaeva, N. Semenova, S.Gritsaev The prognostic role of CD34 angiogenesis marker in patients with diffuse large B-cell lymphoma // HemaSphere. - 2020. – Т.4. – Suppl. 1 – P. 1001.

18. Ванеева Е.В., Росин В.А., Дьяконов Д.А., Самарина С.В. Значение экспрессии pAKT1 у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой // Гематология и трансфузиология - Москва. - 2020. - Т.65, №1. - С.124.
19. Ванеева Е.В., Росин В.А., Дьяконов Д.А., Самарина С.В. Ассоциация экспрессии pSTAT3, pAKT1 с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой // Казанский медицинский журнал. - 2020. - Т.101, №4. - С.501-506.
20. Самарина С.В., Минаева Н.В., Дьяконов Д.А., Росин В.А., Ванеева Е.В., Семенова Н.Ю., Грицаев С.В. Значение маркера PD-L1 в новой модели прогнозирования общей и беспрогрессивной выживаемости у больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой. // Сборник тезисов XVII Российской конференция с международным участием «Злокачественные лимфомы» 29-30.10.20 г. Москва.
21. S.Samarina., N.Semenova., N.Minaeva, D.Diakonov, V.Rosin, E.Vaneeva, S.Gritsaev Value of PD-L1 protein expression in a combined model for prediction of the survival of diffuse large B- cell lymphoma patients // HemaSphere. – 2021. - Т.5. – Suppl. 2 – P. 691.
22. Самарина С.В., Семенова Н.Ю., Минаева Н.В., Дьяконов Д.А. Росин В.А. Ванеева Е.В., Грицаев С.В. Значение экспрессии белка PD-L1 в комбинированной модели прогнозирования выживаемости больных диффузной в-крупноклеточной лимфомой // Клиническая онкогематология.- 2021. - Т.14 - №3 С. 308-315.
23. Ванеева Е.В., Росин В.А., Дьяконов Д.А, Самарина С.В., Лучинин А.С, Кочетов Н.Л Значение экспрессии pAKT1 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме // Бюллетень сибирской медицины. - 2021. - № 3.