

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍԻՏՈՒՏ

ԿՈՏԼՈՎ ՆԻԿԻՏԱ ՅՈՒՐԻԻ

ԴԻՖՈՒԶ ԽՈՇՈՐ ԲՋՋԱՅԻՆ ԼԻՄՖՈՄԱՅԻ ՄԻԿՐՈՄԻՋԱՎԱՅՐԻ  
ԵՆԹԱՏԵՍԱԿՆԵՐԻ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԴԱՍՎԱՐԳՈՒՄ ԵՎ  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆ ՏՐԱՆՍԿՐԻՊՏՈՄԱՅԻՆ ՏՎՅԱԼՆԵՐԻ ՀԻՄԱՆ ՎՐԱ

Գ.00.03. – «Մոլեկուլյային և քջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածովի գիտական աստիճանի հայցման  
առենախոսության

ՍԵՐՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2025

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

КОТЛОВ НИКИТА ЮРЬЕВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ПОДТИПОВ  
МИКРООКРУЖЕНИЯ ДИФФУЗНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ НА ОСНОВЕ  
ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.03 - «Молекулярная и клеточная биология»

ЕРЕВАН – 2025

Աստենախոսության թեման հաստատվել է << ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական դեկավար՝

Կ.Գ.Թ. Բագաև Ալեքսանդր Վլադիմիրավի

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կ.Գ.Դ. Նազարյան Կարեն Բարկենի  
Կ.Գ.Թ. Մանուկյան Գայանե Փաշիկի

Առաջատար կազմակերպություն՝

Հայ-Ռուսական համալսարան

Աստենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2025 թ. նոյեմբերի 20-ին, ժամը 14:00-ին, << ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (<< 0014, ք. Երևան, Հասրաթյան 7):

Աստենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ << ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <https://imb.am/> կայքում:

Աստենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2025 թ. հոկտեմբերի 20-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. թեկնածու

Ո.Վ. Զախարյան

---

Тема диссертации утверждена на заседании учченого совета Институт молекулярной биологии НАН РА.

Научный руководитель:

к.б.н. Багаев Александр Владиславович

Официальные оппоненты:

д.б.н. Назарян Карен Бабкенович

կ.б.н. Манукян Гаянэ Пашиковна

Ведущая организация:

Российско-Армянский университет

Запись диссертации состоится 20 ноября 2025 г. в 14:00, на заседании специализированного совета 042, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте <https://imb.am/>.

Автореферат диссертации разослан 20 октября 2025 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042  
кандидат биол. наук.

Захарян Р.В.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Постановка задачи.** Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) является наиболее распространенной формой агрессивных неходжкинских лимфом, составляя до 40% всех случаев. Ежегодно в США диагностируется около 18–20 тысяч новых пациентов, медианный возраст постановки диагноза превышает 65 лет. Заболевание отличается выраженной клинико-биологической гетерогенностью: оно включает спектр морфологических и молекулярных фенотипов, объединяемых в рамках единого диагноза как диагноз исключения[Li et al., 2018].

Стандарт первой линии терапии (R-CHOP) позволяет достичь излечения примерно у 60–65% больных, однако треть пациентов не отвечает на лечение или быстро рецидивирует, что указывает на необходимость разработки более точных прогностических и стратификационных подходов[Nowicka et al. 2021; Tilly et al., 2022; Shune et al., 2025].

Одним из ключевых направлений изучения DLBCL стало транскриптомное профилирование, которое позволило выделить два основных подтипа по клетке происхождения (СОО): GCB (germinal center B-cell-like) и ABC (activated B-cell-like). Они отличаются не только экспрессионными профилями, но и прогнозом, а также молекулярными механизмами лимфомогенеза. Тем не менее, даже в пределах этих групп сохраняется значительная гетерогенность[Alizadeh et al., 2000; Wright et al., 2003].

К числу факторов, определяющих клинический исход, относятся транслокации генов BCL2, BCL6 и MYC, а также агрессивные варианты, такие как double-hit и triple-hit лимфомы, лимфомы с двойной экспрессией MYC и BCL2 (DEL), и другие молекулярные подтипы (например, MHG, DHTsig-положительные). Их выделение имеет непосредственное прогностическое и терапевтическое значение[Sha et al., 2019; Ennishi et al., 2019; Mehta et al., 2020].

Наряду с характеристикой опухолевых клеток все большее внимание привлекает микроокружение лимфомы (LME). Работы последних двух десятилетий показали, что состав и функциональное состояние Т- и В-клеток, макрофагов, фибробластов и элементов внеклеточного матрикса существенно влияют на рост опухоли и ответ на терапию. Иммунная инфильтрация может как поддерживать противоопухолевый контроль, так и способствовать иммунной супрессии. Особую роль играют Т-хелперы, Т-киллеры, макрофаги и стромальные клетки, формирующие характерные сигнатуры экспрессии, связанные с прогнозом[Mintz and Cyster, 2020; Ishii et al., 2023; Zhan et al., 2023; Liongue et al., 2024].

Эпигенетические механизмы также занимают важное место в патогенезе DLBCL. Нарушения метилирования ДНК, репрограммирование хроматина и инактивация супрессоров опухолей через эпигенетическое подавление сопровождают прогрессию болезни и формирование устойчивости к терапии. Отдельное значение имеет гиперметилирование регуляторных генов, включая элементы сигнального пути TGF $\beta$ [Zhang et al., 2013; Subbarayan et al., 2018; Stelling et al., 2019].

Таким образом, DLBCL представляет собой болезнь со сложной иерархией генетических, транскриптомных, иммунных и эпигенетических изменений. Современные подходы требуют интеграции информации о клетке происхождения, молекулярных нарушениях и состоянии микроокружения. Это обосновывает актуальность исследования биологических подтипов DLBCL с учетом экспрессионных профилей и характеристик LME для разработки новых систем стратификации пациентов и поиска терапевтических мишней.

### **Цель и задачи работы**

Цель диссертационной работы: разработка молекулярной классификации подтипов опухолевого микроокружения в диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме, исследование их биологических свойств, клинической значимости и взаимодействия с генетическим контекстом опухоли.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать и верифицировать классификацию подтипов опухолевого микроокружения (LME) на основе транскриптомных данных.
2. Исследовать ассоциации подтипов LME с клинико-патологическими и молекулярными характеристиками DLBCL, включая известные экспрессионные классификации.
3. Оценить прогностическую значимость LME-подтипов на независимых когортах, включая данные клинических испытаний с различными режимами терапии.
4. Проверить функциональную роль LME-подтипов в доклинических моделях.
5. Провести характеристику подтипов микроокружения и генетических подтипов DLBCL и их связь с структурными особенностями В-клеточного рецептора лимфомы (изотип, сегмент IGHV).
6. Интегрировать данные о микроокружении и мутационном профиле для выявления новых биологически значимых и клинически релевантных подтипов DLBCL.

**Научная новизна.** Работа вносит вклад в понимание молекулярной и клинической гетерогенности диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы. Предложенная транскриптомная классификация подтипов опухолевого микроокружения (LME) отражает воспроизводимые биологические состояния, связанные с иммунной активностью, эпигенетическим статусом и стромальной архитектурой опухоли.

Показано, что подтипы LME обладают прогностической и потенциальной предиктивной значимостью, в том числе в контексте терапии обинутузумабом, и уже используются как биомаркеры в клинических исследованиях. Иммуносупрессивный подтип LME-DP характеризуется обратимым эпигенетическим подавлением и может быть функционально перепрограммирован с помощью деметилирующих агентов, например, азасидиана, что подтверждает возможность терапевтически корректировать микроокружение лимфом.

Выявленные ассоциации между структурой В-клеточного рецептора, мутационным профилем и подтипами микроокружения позволяют более точно реконструировать происхождение и эволюцию опухоли, а также определять группы пациентов с высоким риском неблагоприятного исхода.

**Практическая ценность работы** заключается в создании интегративной модели, объединяющей транскриптомные, генетические и эпигенетические данные, что открывает возможности для стратификации больных, прогнозирования ответа на терапию и разработки новых схем лечения, основанных на функциональной ре-программируемости опухолевого микроокружения.

**Апробация результатов исследования.** Основные результаты исследования докладывались и обсуждались на международных конференциях по онкогематологии, молекулярной биологии и биоинформатике. Включая устные доклады на ASH 2019 (622.Lymphoma Biology-Non-Genetic Studies| November 13, 2019) <https://doi.org/10.1182/blood-2019-128889>, Ash 2023 <https://doi.org/10.1182/blood-2023-182390>. Отдельные фрагменты исследования представлены в публикациях в рецензируемых журналах с высоким индексом цитирования, включая Cancer Cell, Cancer Discovery, Journal of Experimental Medicine и Clinical Cancer Research. Результаты также были представлены на заседаниях Ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА.

Полученные данные использовались при разработке совместных проектов с ведущими исследовательскими центрами (Weill Cornell Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, National Cancer Institute) и фармацевтическими компаниями. Классификация подтипов микроокружения DLBCL включена в качестве вторичной конечной точки в современные клинические испытания (GUIDANCE-01, NCT054648234), что подтверждает ее практическую значимость и востребованность.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа содержит 59 оригинальных рисунков и 2 таблицы. Список литературы включает 141 библиографическую ссылку.

**Публикации.** Основные результаты диссертации отражены в 6 научных публикациях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Формирование когорт.** Для исследования был проведен систематический поиск и отбор данных в международных публичных базах (GEO, AltagayExpress, SRA, ENA). В итоговую мета-когорту вошло более 5000 экспрессионных профилей опухолевых и нормальных лимфоидных тканей, включая свыше 4500 случаев DLBCL. Дополнительно в анализ включались образцы фолликулярной (FL) и буркиттской лимфомы (BL), что позволило расширить спектр сравнения и уточнить границы между лимфомными подтипами. Такой масштабный пул данных обеспечил статистическую устойчивость полученных результатов и позволил выделять воспроизводимые закономерности.

**Сигнатуры клеточных популяций.** Для оценки вклада различных типов клеток микроокружения был собран референсный компендиум более чем из 5000 RNA-seq профилей очищенных клеточных популяций. Он включал как опухолевые, так и нормальные В-клетки, различные подтипы Т-лимфоцитов, макрофаги, фибробласты и другие элементы микроокружения. Использование этого компендия позволило построить надежные экспрессионные сигнатуры, описывающие клеточный состав и функциональные состояния, включая воспалительные и иммуносупрессивные фенотипы.

**Классификация клеточного происхождения и микроокружения.** Для определения клеточного происхождения (COO) использовались как классические модели (GCB и ABC), так и расширенные алгоритмы для выделения DNMTsig-положительных подтипов. Для описания микроокружения применялись методы деконволюции транскриптомных профилей, что позволило количественно оценить представительство иммунных и стромальных компонентов в опухолях. Такая интеграция дала возможность описывать не только саму опухолевую клетку, но и её взаимодействие с окружающими иммунными и стромальными элементами.

**Эпигенетический анализ.** Для исследования роли эпигенетических механизмов применялся метод сокращенного представления бисульфитного секвенирования (eRRBS). На основе полученных данных рассчитывался индекс CIMP, отражающий степень гиперметилирования генома, и подробно анализировался промоторный регион гена SMAD1. Такой подход позволил выявить эпигенетические различия между подтипами и установить их связь с формированием иммуносупрессивного фенотипа.

**Генетический анализ и реконструкция BCR.** Изучение мутационного профиля проводилось на основе данных полноэкзомного (WES), полногеномного (WGS) и транскриптомного (RNA-seq) секвенирования. Особое внимание уделялось реконструкции В-клеточного рецептора (BCR), которая позволила оценить закономерности использования сегментовIGHV и распределение изотипов иммуноглобулинов. Эти данные отражают не только эволюцию опухолевого клона, но и механизмы активации В-клеток, что имеет значение для понимания патогенеза DLBCL.

**Исследование внеклеточного матрикса.** Для анализа роли структурных компонентов опухолевого микроокружения была собрана база данных внеклеточного матрикса (matrisome), дополненная результатами протеомных и транскриптомных исследований. Рассматривалась функциональная роль таких молекул, как декорин и бигликан, участвующих в регуляции межклеточных взаимодействий и сигналинга. Это позволило

связать экспрессию матриксных компонентов с клиническим прогнозом и иммунным фенотипом опухолей.

**Доказательственные модели.** Для функциональной проверки биологических находок использовались ксенотрансплантаты опухолей DLBCL у мышей (PDTX-модели). Они применялись для тестирования действия деметилирующего агента азасидида и изучения его влияния на перепрограммирование иммуносупрессивного фенотипа. Эти эксперименты подтвердили возможность обратимой регуляции состояния микроокружения с помощью эпигенетических препаратов.

**Иммуногистохимия.** Иммуногистохимическое окрашивание применялось для верификации полученных биоинформационических предсказаний. В частности, оценивалось распределение клеточных популяций и уровень экспрессии ключевых белков, включая маркеры иммунной активации и супрессии. Это обеспечивало независимое подтверждение транскриптомных данных.

**Статистический анализ.** Для достоверности результатов использовались тесты Фишера и  $\chi^2$  при сравнении категориальных переменных, лог-ранк тест и модель пропорциональных рисков Кокса при анализе выживаемости. Методы кластеризации и факторизации матриц применялись для выявления экспрессионных сигнатур и подтипов. Такой многоуровневый подход позволил объединить молекулярные данные с клиническими исходами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Выделение кластеров микроокружения DLBCL

Для описания клеточного состава микроокружения лимфоузлов при DLBCL был создан набор из 276 генов, сгруппированных в 22 функциональные сигнатуры, отражающие основные популяции иммунных и стромальных клеток (T- и B-лимфоциты, NK-клетки, макрофаги, фибробласти, FDC, FRC) и ключевые биологические процессы, включая ремоделирование внеклеточного матрикса и пролиферативную активность. Сигнатуры были сформированы на основании анализа более 300 публикаций и адаптированы для расчета методом ssGSEA, что позволило количественно оценить вклад отдельных клеточных

компонентов в опухолевом образце. Для проверки их

специфичности использовалась коллекция экспрессионных профилей сортированных клеток различных типов, в которой сохранение клеточной идентичности подтверждалось кластеризацией на tSNE-проекциях как в пространстве всех генов, так и в пространстве выбранных сигнатур (Рисунок 1).

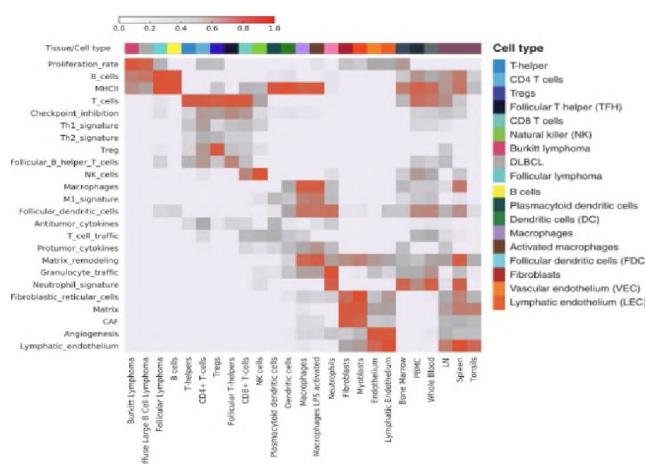


Рисунок 1. Медианный сигнал сигнатур в каждом виде сортированных иммунных, стromальных клеток или лимфом.

На основе рассчитанных сигнатур был выполнен анализ более 5000 транскриптомов лимфом из объединенной мета-когорты, включающей 4655 случаев DLBCL и дополнительные образцы FL и BL. После нормализации данных и устранения батч-эффектов проведена кластеризация методом Louvain, позволившая выделить четыре устойчивых подтипа опухолевого микроокружения (LME): LME-GC (похожий на герминативный центр, 15%), LME-MS (мезенхимальный, 33%), LME-IN (воспалительный, 25%) и LME-DE (обедненный, 27%). Каждый из подтипов характеризовался уникальным набором клеточных и функциональных сигнатур. LME-GC демонстрировал признаки организации герминативного центра и высокий уровень Tfh и FDC; LME-MS — активное ремоделирование матрикса и стромальную перестройку; LME-IN — воспалительную инфильтрацию с преобладанием CD8+ Т-лимфоцитов и NK-клеток; LME-DE — обеднение как иммунных, так и стромальных элементов и признаки эпигенетического подавления. Распределение подтипов было равномерным между различными когортами и платформами, что подтверждает их биологическую устойчивость (Рисунки 2-3).

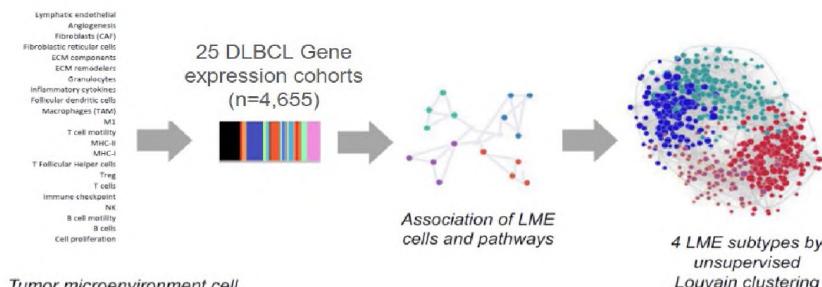


Рисунок 2. Схема получения подтипов.

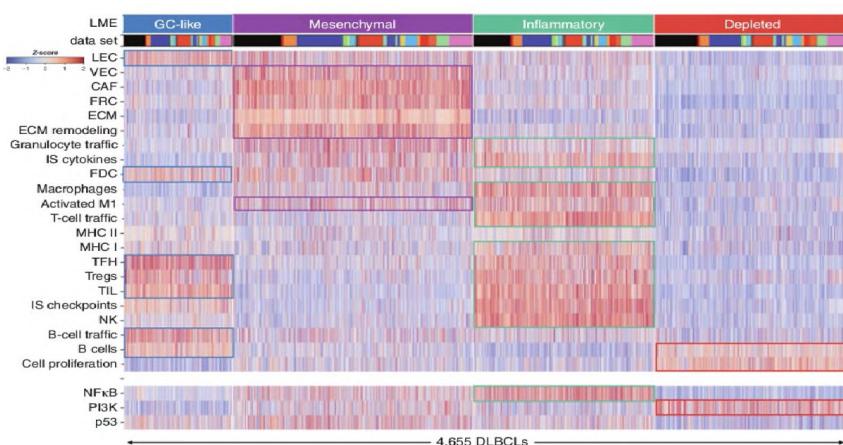


Рисунок 3. Тепловая карта 4655 образцов DLBCL в пространстве сигнатур. Легенды показывают кластер и когорту. На тепловой карте отражены нормализованные значения синтетических для каждого образца в диапазоне от -2 (синий цвет) до 2 (красный цвет). Прямоугольниками выделены некоторые определяющие свойства соответствующих кластеров.

## Характеризация подтипов

Первый подтип был назван LME-GC. Его транскриптомные сигнатуры соответствовали нормальным герминативным центрам лимфатических узлов. В опухолях этой группы отмечалось высокое содержание фолликулярных дендритных клеток, CD4-положительных Т-хелперов, включая Tfh, а также не опухолевых В-лимфоцитов. Наличие этих компонентов отражает сохранение элементов нормальной лимфоидной архитектуры, обеспечивающей иммунный надзор. Пациенты с таким фенотипом имели лучший прогноз, что согласуется с предположением о поддержке противоопухолевого контроля за счет сохранения герминативных центров (Рисунок 4).

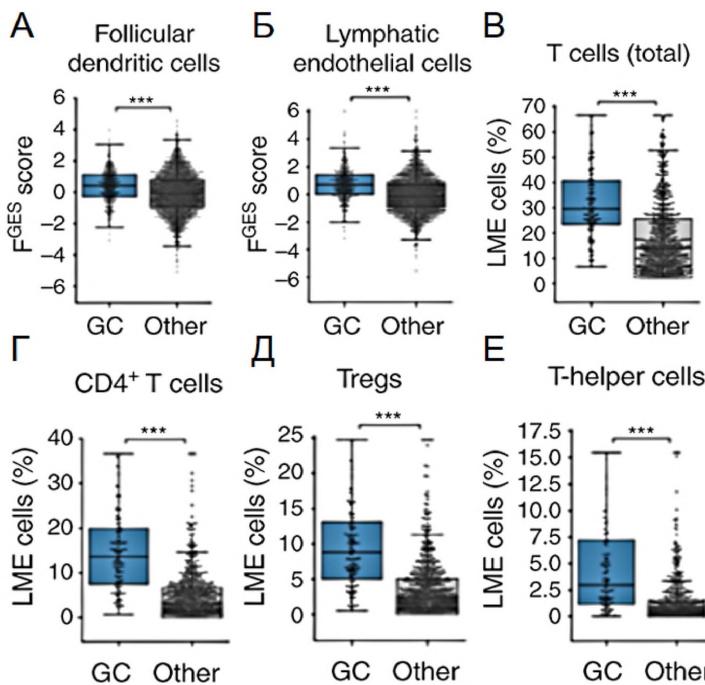


Рисунок 4. Сравнение значений сигнатур (А-Б) или процентов клеток (В-Е) между LME-GC и другими подтипами.

LME-MS характеризовался высоким содержанием фибробластов, эндотелиальных клеток и значительной экспрессией генов внеклеточного матрикса. В этих опухолях наблюдалась активация сигнальных путей TGF $\beta$  и гипоксии, что указывает на глубокую перестройку стromы и ремоделирование тканей (Рисунок 5).

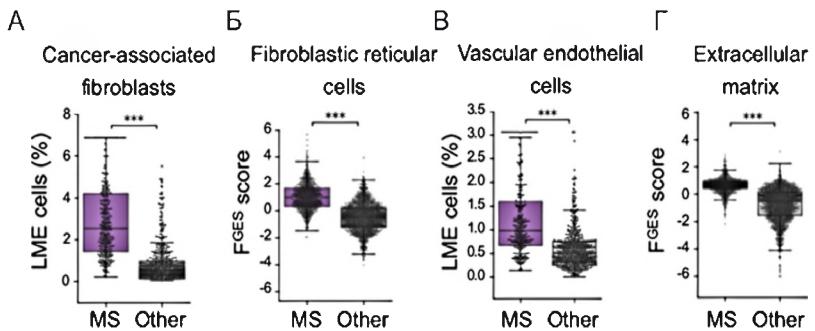


Рисунок 5. Сравнение значений сигнатур или процентов соответствующих клеток между LME-MS и другими подтипаами.

LME-IN представлял собой воспалительный подтип с выраженной инфильтрацией CD8-положительных Т-лимфоцитов и NK-клеток. Продукция провоспалительных цитокинов была самая высокая, но и экспрессия супрессорных молекул, таких как IDO1 и PDL1 была наибольшей (Рисунки 6-7).

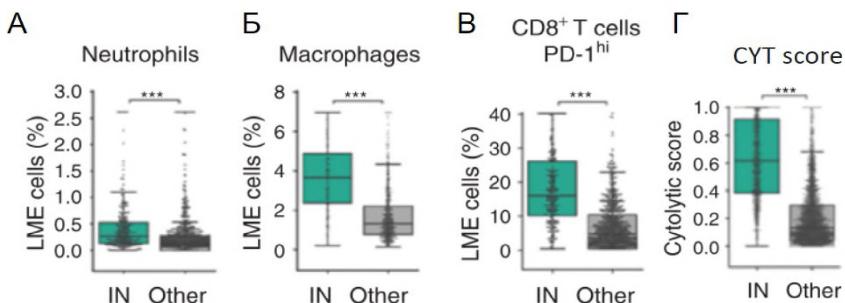


Рисунок 6. (А-Г) Сравнение процентов клеток и значений сигнатур между LME-IN и остальными кластерами.

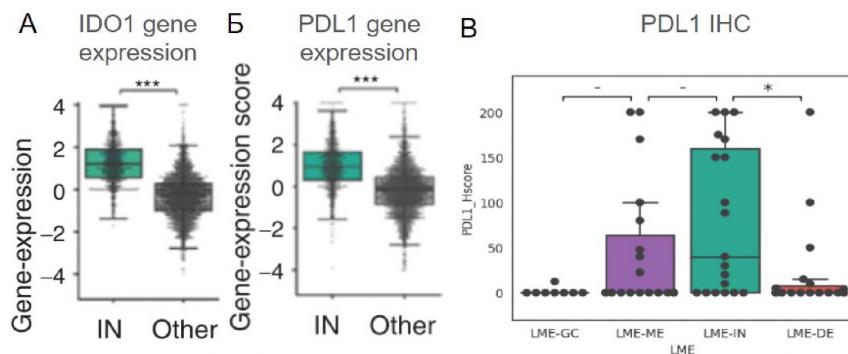


Рисунок 7. А, Б - сравнение экспрессии *IDO1* и *PDL1*; В - сравнение позитивности по *PDL1* (IHC) между LME-IN и остальными кластерами.

Наиболее неблагоприятным оказался подтип LME-DP, характеризующийся обедненным микроокружением и низким содержанием как иммунных, так и стромальных клеток. В этих опухолях наблюдалась потеря экспрессии генов антиген-презентации, снижение уровней молекул МНС и эпигенетическое подавление сигнатур иммунной активности. Так же сигнатуры пролиферации опухоли были самые высокие среди подтипов (Рисунки 8-9).

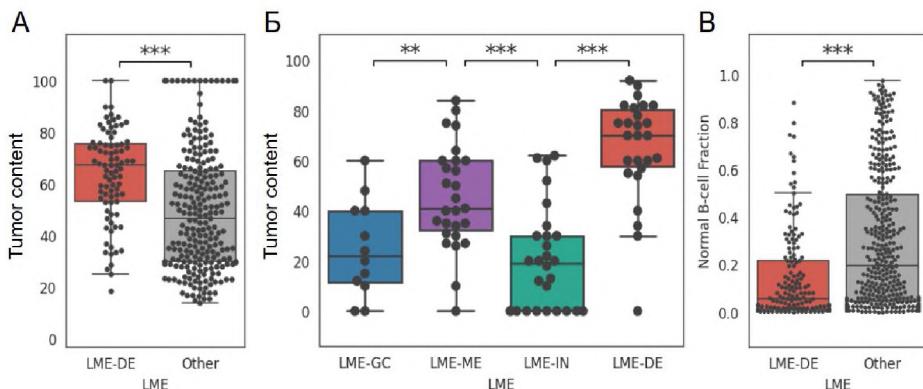


Рисунок 8. (А) — сравнение процента опухолевых клеток между подтипов LME-DE и остальными подтипов на Мета когорте. (Б) — сравнение процента опухолевых клеток между подтиповами на когорте Mayo. (В) — сравнение процента нормальных В-клеток по данным В-клеточных репертуаров между LME-DE и остальными подтиповами на Мета когорте.

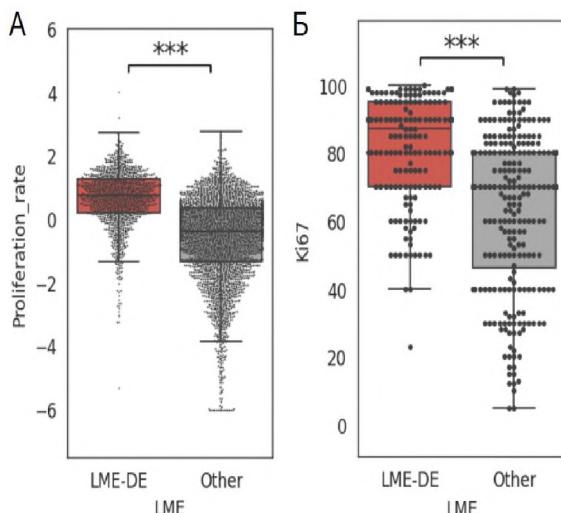


Рисунок 9. (А) – сравнение значений сигнатуры пролиферации между подтипов LME-DE и остальными подтипов на Мета когорте. (Б) – сравнение показателей пролиферации по маркеру Ki67, измеренных методом иммуногистохимии, между LME-DE и остальными подтиповами на Мета когорте.

## Валидация прогностической силы подтипов LME

Прогностическая значимость подтипов подтверждалась на мета когорте (Рисунок 10), а также во всех независимых когортах, включая клиническое исследование GOYA (Рисунок 11) и HMRN (Рисунок 12). Пациенты с LME-GC и LME-IN демонстрировали достоверно лучшую общую и безрецидивную выживаемость, что сохранялось и при многофакторном анализе с учетом индекса IPI и других клинических переменных. LME-MS имел промежуточные результаты, а LME-DE уверенно выделялся как группа высокого риска.

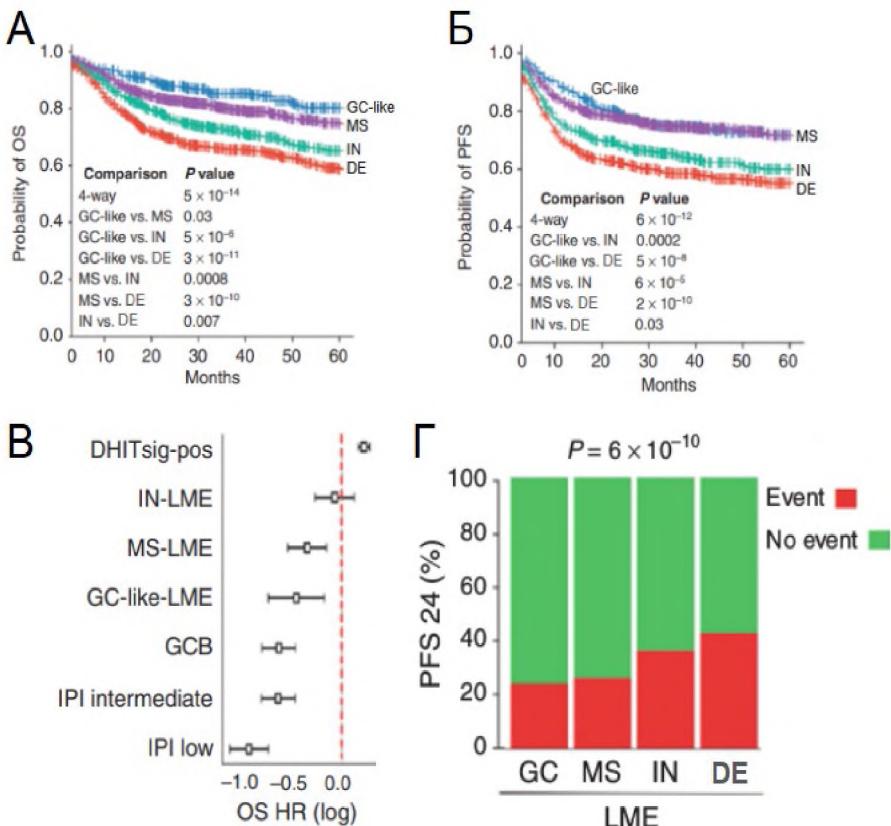


Рисунок 10. (А) – графики общей выживаемости (OS), (Б) – выживаемости без прогрессии (PFS), сравнение между LME подтипами, p-value рассчитано методом log-rank. (В) – результаты многомерного анализа по модели регрессии Кокса для LME подтипов с поправкой на DHITsig+, COO и IPI. (Г) – сравнение процента достижения PFS24 между LME подтипами, указан p-value критерия хи-квадрат.

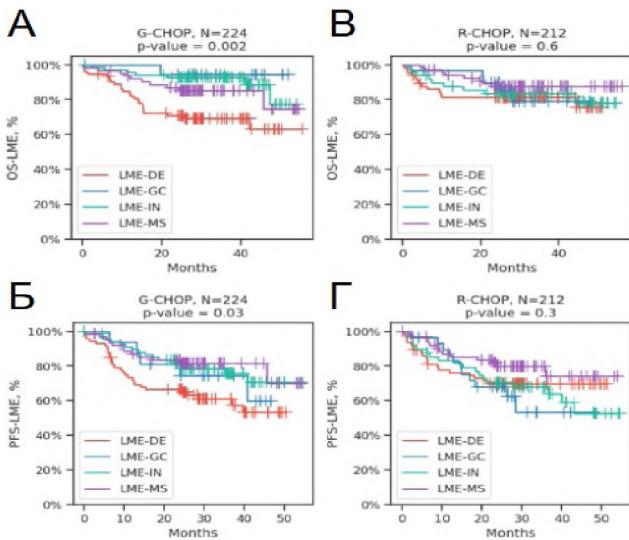


Рисунок 11. Сравнение OS и PFS между подтипами LME: (А-Б) когорта G-CHOP (GOYA), (В-Г) когорта R-CHOP (GOYA). В заголовках графиков указаны р-значения, рассчитанные с использованием четырехстороннего лог-рангового теста.

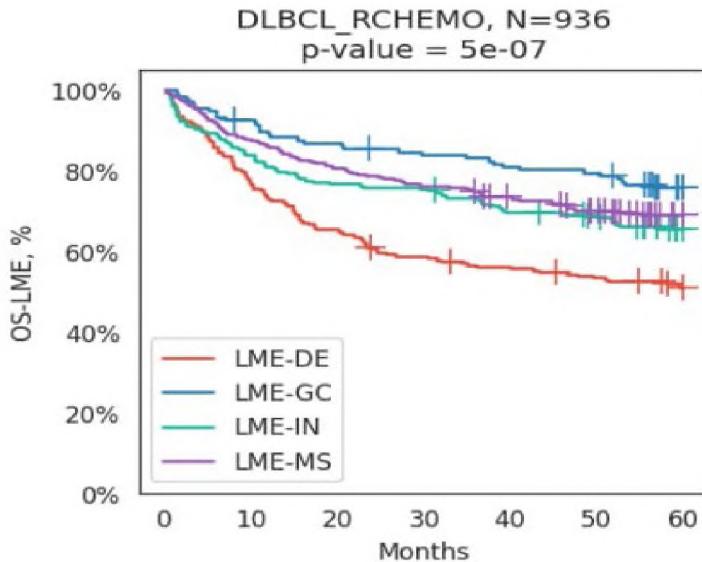


Рисунок 12. Кривые выживаемости для LME подтипов на когорте HMRN.

**Подтип LME-DE обогащен СИМР опухолями. Лечение Азаситидином позволяет обратить этот фенотип, а также ре-активировать экспрессию опухолевых супрессоров, включая TGFb**

Подтип LME-DP, характеризуется сочетанием крайне низкой клеточной плотности микроокружения и выраженных эпигенетических нарушений. Для него выявлена высокая степень метилирования ДНК (CIMP-подобный фенотип), охватывающая промоторные области множества генов, ответственных за антиген-презентацию, иммунную активацию и клеточную адгезию. Особенно значимым оказался гиперметилированный промотор гена SMAD1 — ключевого медиатора пути TGF $\beta$ . Это указывает на функциональное подавление антипролиферативных и дифференцировочных сигналов TGF $\beta$ , что способствует утрате контроля над ростом опухоли и формированию иммуносупрессивной среды. В совокупности эпигенетическая инактивация генов, связанных с TGF $\beta$ -сигналингом, и глобальный CIMP-фенотип создают для LME-DE типичный профиль «молчалца» микроокружения, в котором активность иммунных клеток минимальна, а опухоль избегает распознавания и уничтожения (Рисунок 13).

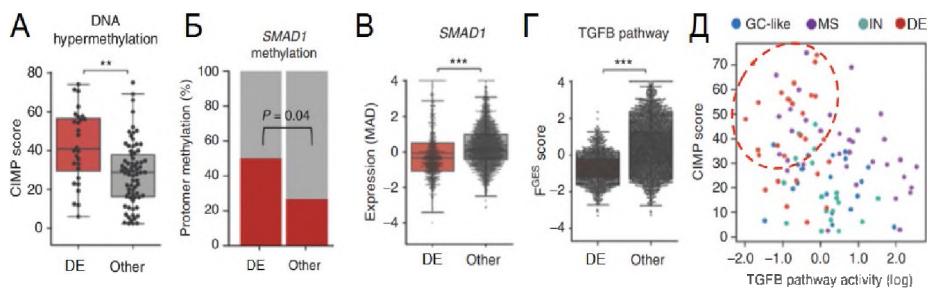


Рисунок 13. Подтип LME-DE характеризуется повышенным уровнем CIMP (А), более высокой частотой гиперметилирования промотора гена SMAD1 (Б), сниженной экспрессией SMAD1 (В) и пониженной активностью сигнального пути TGF $\beta$  (Г) по сравнению с другими подтипами. (Д) — обогащение опухолей LME-DE в пространстве, определяемом уровнями CIMP и активностью TGF $\beta$ .

Функциональная значимость эпигенетических нарушений в LME-DE была проверена в доклинических экспериментах с использованием ксенотрансплантатов опухолей DLBCL (PDTX-моделей). У животных, несущих LME-DE-подтип, наблюдалась низкая экспрессия генов антиген-презентации и сигнатур Т-клеточной инфильтрации, что воспроизводило профиль иммуносупрессивного микроокружения, выявленный в клинических образцах. Лечение деметилирующим агентом азацитидидином вызывало частичное обращение этого состояния: восстанавливалась экспрессия генов МНС класса I и II, повышались уровни SMAD1 и компонентов TGF $\beta$ -сигналинга, в опухолевом микроокружении возрастало количество CD3 $^+$  и CD8 $^+$  Т-лимфоцитов. Эти изменения сопровождались уменьшением объема опухоли и замедлением роста ксенотрансплантатов. Таким образом, эпигенетическая терапия продемонстрировала способность функционально перепрограммировать иммуносупрессивное LME-DE-состояние, что подтверждает ключевую роль эпигенетического контроля в регуляции противоопухолевого иммунного ответа при DLBCL (Рисунки 14-15).

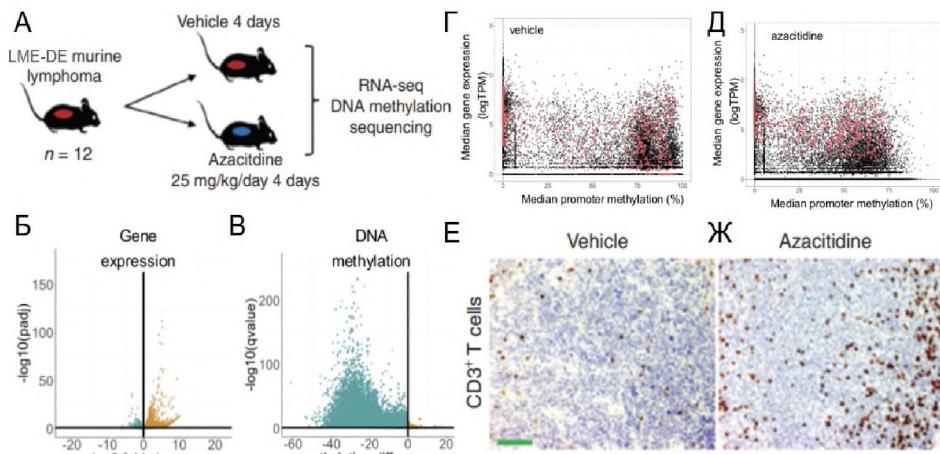


Рисунок 14. (А) дизайн эксперимента; (Б) график вулкан дифференциальной экспрессии генов между опухолями, обработанными азасцитидином, и контролем; (В) график вулкан дифференциального метилирования; (Г, Д) сравнение экспрессии и уровня метилирования промотора в контрольном и обработанном образцах, красным отмечены гены с повышенной экспрессией после лечения; (Е, Ж) репрезентативные регионы опухолей, окрашенных на CD3+, в контрольной и леченной группах соответственно.

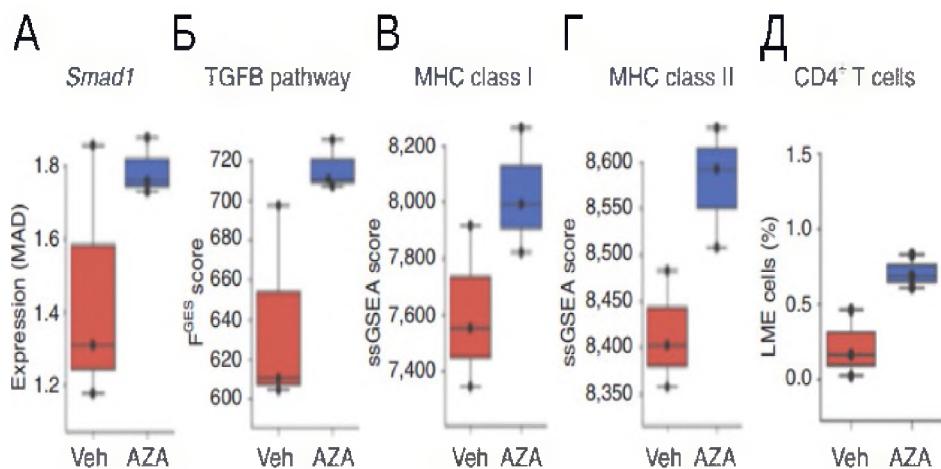


Рисунок 15. (А–Д) сравнение экспрессии гена *SMAD1*, активности сигнального пути TGFb, экспрессии молекул МНС I и II классов, а также доли CD4+ Т-лимфоцитов между контрольными опухолями и образцами после лечения азасцитидином.

Экспрессия бигликана и декорина выше в LME-ME. Их экспрессия ассоциирована с лучшим прогнозом

Экспрессия генов декорина и бигликана была значимо выше в подтипе LME-MS на расширенной когорте пациентов, что согласуется с повышенной представленностью

фибробластов в данной группе. Более того, высокая экспрессия этих генов (выше медианного уровня по всей когорте) ассоциировалась с благоприятным прогнозом даже в подтипе LME-DE (Рисунок 16). Протеогликаны в микроокружении лимфом могут оказывать влияние на опухоли через взаимодействие с факторами роста, рецепторами и другими компонентами внеклеточного матрикса [Neill et al., 2012].

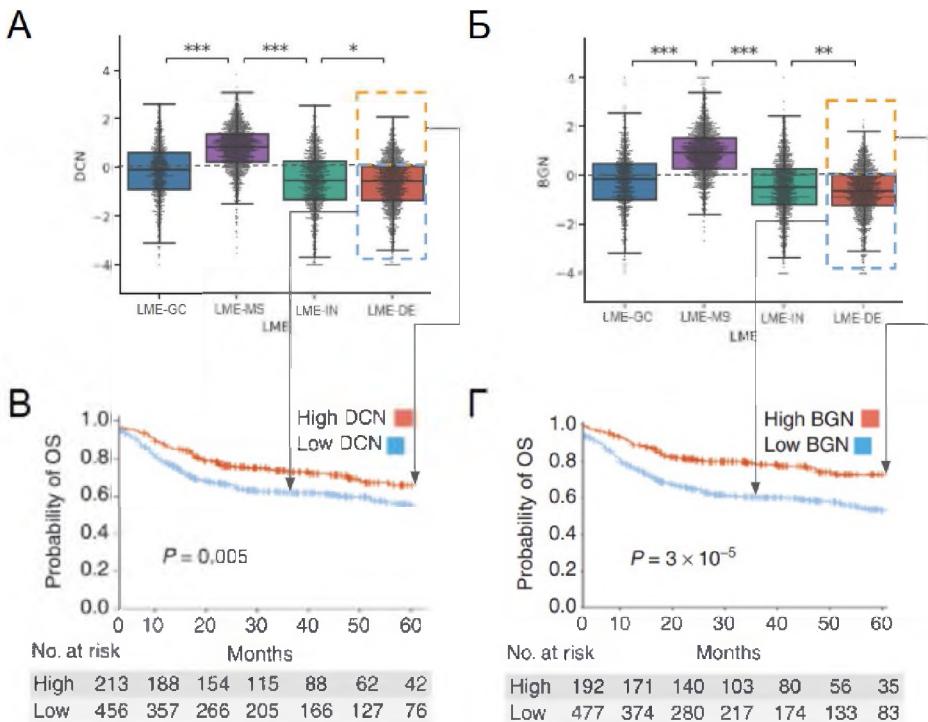


Рисунок 16. Экспрессия декорина (А) и бигликана (Б) отличается между подтипами LME, и максимальна в LME-MS. Далее кривые выживаемости, показывающие разницу дожития пациентов с высоким ( $>$  медианы по всей когорте) и низким значением декорина (В) и бигликана (Г) среди пациентов подтипа LME-DE.

#### Введение декорина и бигликана останавливали рост опухолей в ксенографитных моделях DLBCL

Для оценки функциональной роли компонентов внеклеточного матрикса были проведены эксперименты на ксенотрансплантических моделях DLBCL, полученных из опухолей пациентов с подтипами ABC и LME-DE. После имплантации опухолевых фрагментов и достижения заданного размера животным вводили в брюшную полость контрольные векторы, а также препараты, содержащие рекомбинантные формы декорина или бигликана, в соответствии со схемой, представленной на (Рисунок 17А). В обоих типах моделей введение декорина или бигликана приводило к выраженному замедлению роста опухолей по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о прямом влиянии этих матрикских белков на динамику опухолевого процесса. После прекращения введений рост опухолей возобновлялся, достигая темпов, сопоставимых с контролем (Рисунок 17Б–Д). Эти

результаты подтверждают, что как декорин, так и бигликан способны модифицировать микроокружение DLBCL и временно ограничивать пролиферацию опухолевых клеток *in vivo*.

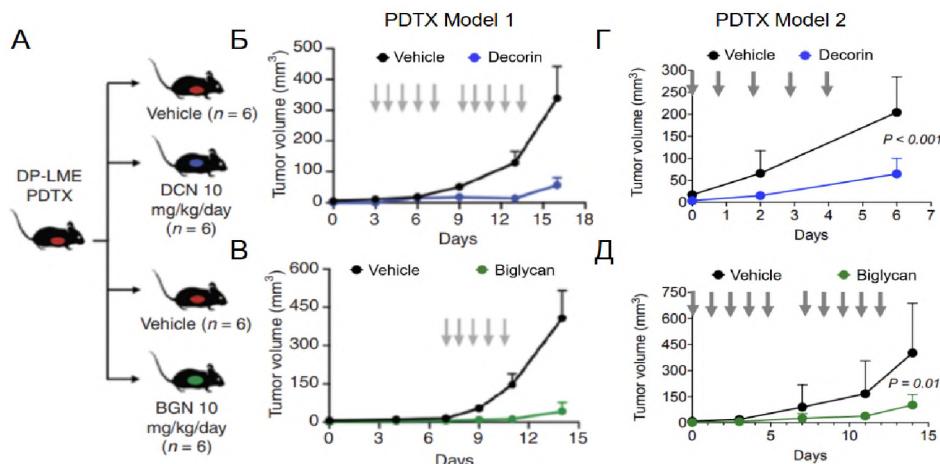


Рисунок 17. (А) схема проведения эксперимента по введению декорина или бигликана в модели ксенографтов; (Б, В) динамика относительного объема опухолей при введении декорина (Б) или бигликана (В) в модели 1; (Г, Д) аналогичное сравнение для модели 2.

### Связь репертуара В-клеточного рецептора лимфомы с микроокружением

Были проанализированы перестройки генов иммуноглобулиновых цепей по данным RNA-seq для определения особенностей репертуара В-клеточного рецептора (BCR) в разных биологических контекстах DLBCL. Подтипы микроокружения отличались по использованию сегментов IGHV и изотипов иммуноглобулинов: для LME-GC характерно преобладание зрелых соматически гипермутационных вариантов, тогда как LME-DP чаще ассоциировался с наивными или несостоявшимися перестройками. Генетические подтипы также демонстрировали различия в паттернах IGHV, что отражает разную стадию происхождения опухолевых клонов и их взаимодействие с микроокружением.

### Дефицит FAS в DLBCL ассоциирован с воспаленным фенотипом, но неблагоприятным прогнозом

Известно, что одним из ключевых механизмов селекции В-клеток в герминативном центре является FAS/FASL-индукрованный апоптоз (Обзор литературы 1.2.7). Утрата FAS ведет к нарушению этого механизма отбора В-клеток с низким аффинитетом к антигену и способствует выживанию потенциально аутогенетивных или менее эффективных клонов. Закономерным образом, инактивация FAS через мутации особенно характерна для GCB-подтипа DLBCL. Несмотря на то, что GCB-лимфомы в целом ассоциированы с более благоприятным прогнозом, у части пациентов заболевание оказывается устойчивым к терапии и прогрессирует. При этом, функциональная роль FAS в взаимодействии с микроокружением DLBCL остается мало изученной.

Мутации гена FAS были обнаружены преимущественно в опухолях подтипа GCB и встречались значительно реже в ABC и UNC DLBCL. Внутри GCB-подтипа наличие мутаций FAS ассоциировалось с достоверно худшей общей выживаемостью, тогда как в ABC-подтипе подобной зависимости не наблюдалось. Из 97 выявленных мутаций почти половина

приводила к полной утрате домена гибели (DD), необходимого для активации апоптоза, а еще около трети — к патогенным заменам в пределах DD (Рисунок 18).

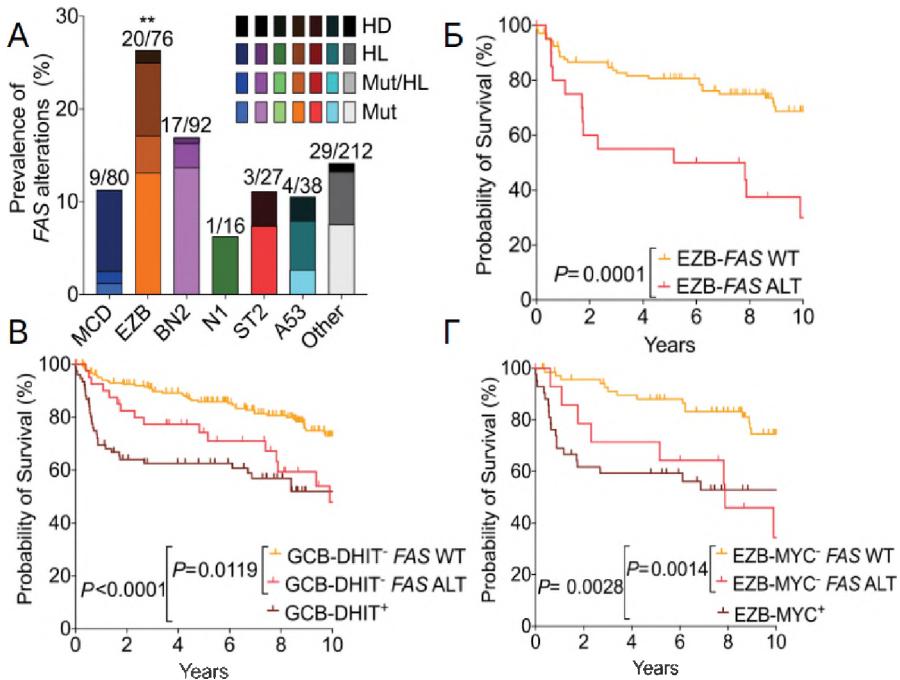


Рисунок 18. (А) частота мутаций в FAS в когорте NCICCR с распределением по генетическим подтипам HL: heterozygous loss, HD: homozygous deficiency, Mut/HL mutation and heterozygous loss, Mut: mutation; (Б) сравнение OS между FAS-alt и FAS-WT опухолями среди подтипа EZB; (В) OS пациентов с GCB-опухолями, стратифицированными на группы DHIT<sup>+</sup>, FAS-alt и FAS-WT; (Г) OS в подгруппах EZB: MYC<sup>+</sup>, MYC<sup>-</sup> с мутациями FAS и MYC<sup>-</sup> без мутаций FAS.

Дальнейший анализ показал, что альтерации FAS преимущественно встречаются в генетическом подтипе EZB и взаимно исключаются с активацией MYC, типичной для DHIT<sup>sig+</sup> опухолей. Опухоли с мутациями FAS демонстрировали значительно худшую выживаемость как в пределах всей группы EZB, так и среди подмножеств без MYC-активации, что подтверждает независимую прогностическую значимость дефицита FAS. В этих опухолях часто выявлялись сопутствующие альтерации TNFRSF14, CD274 (PDL1), IRF8 и S1PR2, что указывает на нарушение регуляции взаимодействий между опухолевыми клетками и Tfh. Сравнение четырех подгрупп EZB DLBCL показало, что худшие клинические исходы характерны именно для FAS-alt опухолей, тогда как обе группы FAS-WT, независимо от статуса TNFRSF14, имели достоверно лучший прогноз. Эти результаты подтверждают, что функциональная потеря FAS формирует особый биологический и клинический контекст в пределах GCB/EZB DLBCL, ассоциированный с воспаленным фенотипом и неблагоприятным течением заболевания.

В ходе анализа мутационного профиля DLBCL выявлено, что нарушения в гене FAS встречаются преимущественно в подтипа, характеризующихся высоким уровнем

воспаления и инфильтрацией Т-клеток. При этом такие опухоли демонстрировали парадоксальное сочетание признаков активации противоопухолевого иммунитета с неблагоприятными клиническими исходами. Сравнение выживаемости пациентов с EZB-подтипом DLBCL показало, что опухоли с мутациями FAS (FAS-alt) характеризуются значительно худшей общей выживаемостью по сравнению с FAS-WT независимо от наличия алтераций TNFRSF14, что подтверждает независимую прогностическую значимость дефицита FAS. При этом в группе EZB FAS-alt MYC<sup>-</sup> не наблюдалось обогащения каким-либо подтипом микроокружения, однако полностью отсутствовали случаи LME-DE, ассоциированные с эпигенетическим подавлением. Анализ экспрессионных сигнатур показал, что FAS-alt опухоли имели повышенные значения Tfh-сигнатур, указывая на усиленную инфильтрацию Tfh-клеток и перестройку герминативно-подобной ниши. Эти данные позволяют предположить, что дефицит FAS приводит к смешению иммунного микроокружения в сторону повышенной активности Tfh при одновременном снижении вероятности формирования иммуносупрессивного LME-DE фенотипа, что отражает сложное взаимодействие мутационного статуса опухоли и ее микроокружения (Рисунок 19).

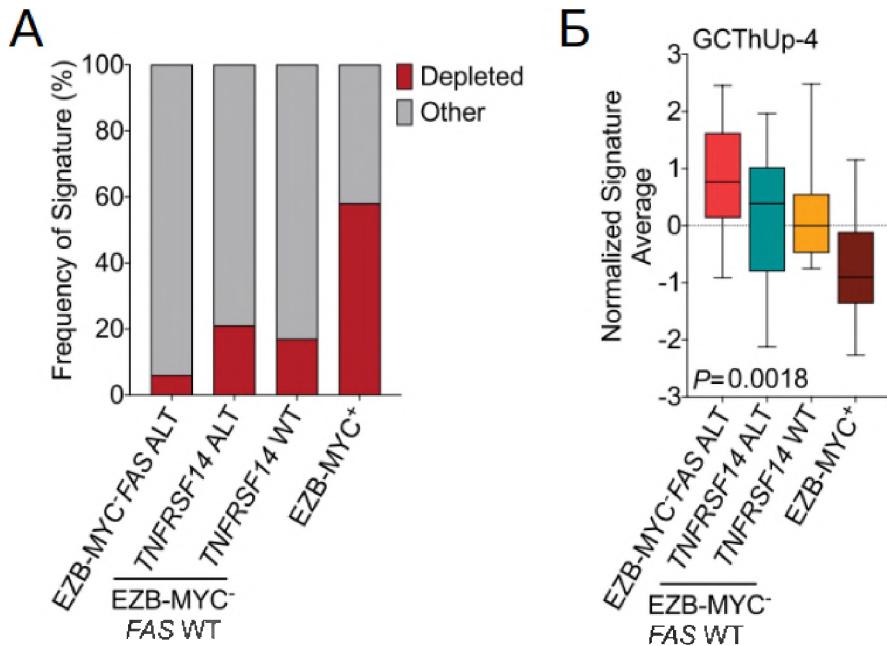


Рисунок 19. (А) доля опухолей подтипа LME-DE в каждой из четырех групп, стратифицированных по статусу *MYC*, *FAS* и *TNFRSF14*; (Б) значения сигнатуры Tfh (GCThUp-4)[Shaffer et al., 2006] в тех же группах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлена система подтипов опухолевого микроокружения LME в DLBCL, основанная на транскриптомных данных. Разработанная классификация отражает воспроизводимые биологические различия в составе опухоли и обладает как прогностической, так и потенциальной предиктивной значимостью. Это подтверждается тем, что ассоциация LME с ответом на терапию уже используются в качестве вторичных конечных точек (secondary endpoint) в современных клинических исследованиях, включая клинические испытания GUIDANCE-01[3] и NCT05464823[4].

LME устойчиво ассоциированы с клинико-патологическими характеристиками опухоли, включая классификацию по COO, молекулярные сигнатуры иммунного ответа, экспрессию супрессоров и регуляторов активации, а также сигнальные пути, вовлеченные в коммуникацию между опухолевыми и иммунными клетками. Прогностическая значимость LME-подтипов подтверждена на независимых когортах: иммuno-активные формы LME-GC и LME-MS ассоциированы с благоприятным клиническим исходом, тогда как подтипы LME-IN, LME-DE — с иммуносупрессивным и эпигенетически подавленным состоянием, а также с худшей выживаемостью.

Функциональная значимость микроокружения была подтверждена в доклинической модели: ксенографты с фенотипом LME-DE демонстрировали ответ на лечение азатитидином, сопровождающийся деметилированием промоторов, активацией опухолевых супрессоров, усилением экспрессии молекул МНС и инфильтрацией Т-лимфоцитов. Эти данные лежали в основе дизайна клинических испытаний с использованием AZA в DLBCL: NCT0100499 [6], NCT04799275[7].

Помимо этого, в генетических подтипов MCD, BN2 и A53 было продемонстрировано обогащение изотипа IgM и сегмента IGHV4-34, что связано с активацией сигнального каскада БКР и меньшей зависимостью от микроокружения. Дополнительно было показано, что в опухолях с IgM-изотипом присутствует значимое обогащение мутаций гена CD79B — ключевого компонента сигнального комплекса БКР. Эти данные подчеркивают важность взаимодействия между структурой БКР и мутационным профилем.

Интеграция данных о микроокружении и мутациях позволила идентифицировать ранее не описанный агрессивный подтип GCB DLBCL с мутациями в FAS, сопровождающейся нарушением апоптоза и сопутствующей инактивацией TNFRSF14 и PDL1. Эти опухоли демонстрировали повышенное количество Tfh, при этом значимо реже были LME-DP, но при этом были ассоциированы с неблагоприятным клиническим исходом. Это подчеркивает сложное взаимодействие между нарушениями клеточной смерти, иммунной регуляцией и композицией микроокружения.

Таким образом, проведенная работа демонстрирует ценность комплексного подхода к характеристике опухоли, сочетающего транскриптомные, мутационные и иммунологические данные. Полученные результаты являются основой для создания прогностических моделей, рационального дизайна терапии и внедрения молекулярной стратификации в клиническую практику при DLBCL.

## ВЫВОДЫ

- Предложена и верифицирована классификация LME-подтипов, включающая четыре устойчивых биологических состояния опухолевого микроокружения, воспроизводимых на разных когортах.
- Подтипы LME демонстрируют значимые ассоциации с клеточным происхождением опухоли, сигнатурами иммунной активности и эпигенетическим статусом, отражая функциональное состояние опухоли и ее взаимодействие с микроокружением.
- Прогностическая ценность подтипов LME завалидирована на данных консорциума HMRN при лечении стандартной комбинацией с ритуксимабом R-CHEMO. Кроме того, подтипы LME обладают прогностической ценностью при терапии другим антителом против CD20 - обинутузумабом, что подтверждено на данных исследования GOYA. Это позволяет использовать их в рамках клинических стратификаций.
- Иммunoупрессивный подтип LME-DE может быть функционально обращен в доклинической модели под действием азацитидина, что сопровождается активацией опухолевых супрессоров, повышением экспрессии МНС и Т-клеточной инфильтрацией.
- Генетические подтипы и типы микроокружения DLBCL различаются по использованию изотипов и сегментовIGHV, что связано с мутациями в сигнальных белках БКР. Это подчеркивает важность взаимодействия БКР-сигналинга с генетическим контекстом и микроокружением при патогенезе DLBCL.
- Интеграция данных о составе микроокружения и мутационном ландшафте позволила выявить агрессивный подтип GCB DLBCL, характеризующийся мутациями в FAS и сопутствующими нарушениями регуляции взаимодействия с Tfh, несмотря на воспаленный фенотип.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

- Tumuluru S, Godfrey JK, Cooper A, Yu J, Chen X, MacNabb BW, Venkataraman G, Zha Y, Pelzer B, Song J, Duns G, Sworoder BJ, Raj S, Bolen C, Penuel E, Postovalova E, Kotlov N, Bagaev A, Fowler N, Shouval R, Smith SM, Alizadeh AA, Steidl C, Kline J. Integrative genomic analysis of DLBCL identifies immune environments associated with bispecific antibody response. **Blood**. 2025 May 22;145(21):2460-2472. doi: 10.1182/blood.2024025355.
- Котлов Н.Ю. Валидация прогностической силы подтипов микроокружения крупноклеточной лимфомы при лечении обинутузумабом в первой линии. Вестник РАУ. 2024;1:67-73. DOI: 10.24412/1829-0450-fm-2024-1-67-74
- Cooper A, Tumuluru S, Kissick K, Venkataraman G, Song JY, Lytle A, Duns G, Yu J, Kotlov N, Bagaev A, Hodkinson B, Srinivasan S, Smith SM, Scott DW, Steidl C, Godfrey JK, Kline J. CD5 Gene Signature Identifies Diffuse Large B-Cell Lymphomas Sensitive to Bruton's Tyrosine Kinase Inhibition. **J Clin Oncol**. 2024 Feb 1;42(4):467-480. doi: 10.1200/JCO.23.01574.

4. Kotlov N, Bagaev A, Revuelta MV, Phillip JM, Cacciapuoti MT, Antysheva Z, Svekolkin V, Tikhonova E, Miheecheva N, Kuzkina N, Nos G, Tabbo F, Frenkel F, Ghione P, Tsiper M, Almog N, Fowler N, Melnick AM, Leonard JP, Inghirami G, Cerchietti L. Clinical and Biological Subtypes of B-cell Lymphoma Revealed by Microenvironmental Signatures. **Cancer Discov.** 2021 Jun;11(6):1468-1489. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0839.
5. Razzaghi R, Agarwal S, Kotlov N, Plotnikova O, Nomie K, Huang DW, Wright GW, Smith GA, Li M, Takata K, Yamadi M, Yao C, O'Shea JJ, Phelan JD, Pittaluga S, Scott DW, Muppudi JR. Compromised counterselection by FAS creates an aggressive subtype of germinal center lymphoma. **J Exp Med.** 2021 Mar 1;218(3):e20201173. doi: 10.1084/jem.20201173.
6. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Coulibaly ZA, Roulland S, Young RM, Wang JQ, Schmitz R, Morin RD, Tang J, Jiang A, Bagaev A, Plotnikova O, Kotlov N, Johnson CA, Wilson WH, Scott DW, Staudt LM. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. **Cancer Cell.** 2020 Apr 13;37(4):551-568.e14. doi: 10.1016/j.ccr.2020.03.015.

## Կոտլով Նիկիտա Յուրիի

Դիֆուզ խոշոր բջջային լիմֆոմայի միկրոմիջավայրի ենթատեսակների  
մոլեկուլային դասակարգում և ուսումնասիրություն տրանսկրիպտոմային  
տվյալների հիման վրա

### Ամփոփում

Դիֆուզ խոշոր Բ բջջային լիմֆոման (DLBCL) ոչ հոգկինյան լիմֆոմայի ամենատարածված և կենսաբանորեն ամենատարածել ենթատիպն է՝ չափահասների մոտ կազմելով դեպքերի միջև 40%-ը: Չնայած ստանդարտ խոննաքիմիաթերապիայի (R-CHOP) բարձր բուժական արդյունավետությանը՝ մոտ մեկ երրորդ հիվանդների մոտ զարգանում է ռեցիրիդ կամ բուժման նվազմամբ կայուն ծև, ինչն ընդգծում է հիվանդության մոլեկուլային ենթատիպերի տարրերակման և անհատականացված բուժական ռազմավարությունների մշակման անհրաժեշտությունը: Վերջին տարիների գենոմային հետազոտությունները էաաբս խորացրել են մեր պատկերացումները ուսուցքային բջջներին բնորոշ փոփոխությունների մասին, սակայն ուսուցքային միկրոմիջավայրի (TME) կապը կիխիկական ելքի հետ դեռևս բավարար չափով ուսումնասիրված չէ:

Այս աշխատանքի նպատակն է մշակել դիֆուզ խոշոր բջջային Բ-լիմֆոմայի ուսուցքային միկրոմիջավայրի ենթատիպերի մոլեկուլային դասակարգում և ուսումնասիրել դրանց կենսաբանական առանձնահատկությունները, կիխիկական նշանակությունն ու կապը ուսուցքի գենետիկական փոփոխությունների հետ:

Ավշային հյուսվածքի ավելի քան 5000 նմուշների՝ ներայալ 4655 DLBCL ուսուցքներից ստացված, համապարփակ տրանսկրիպտոմային վերլուծությունը հնարավորություն է տվել վերականգնել միկրոմիջավայրի բջջային կազմը՝ կիրառելով 276 գեներից բարկացած հմունյին, ստրոմալ և հիմնական ազդանշանային ուղիների ֆունկցիոնալ գենային հավաքածուներ: Տվյալների չվերահսկվող կլաստերավորումը բացահայտել է լիմֆոմայի միկրոմիջավայրի (LME) չորս կայուն և վերարտադրելի ենթատիպ՝ LME-GC (գերմինատիվ կենտրոնանման), LME-MS (մեզենքրիմա), LME-IN (բորբոքային) և LME-DE (սպառված): Այս ենթատիպերը վայելացվել են անկախ ընտրանքներում՝ ցույց տալով դրանց կենսաբանական կայունությունը:

Յուրաքանչյուր ենթատիպ բնութագրվում է չարորակ Բ բջջների և հարակից հյուսվածքի փոխազդեցության յուրահատուկ ծևով: Մասնավորապես, LME-GC-ի դեպքում դիտվում է լավ արտահայտված գերմինատիվ կենտրոն՝ հարուստ ֆոլիկուլային դենդրիտիտային բջջներով, T helper բջջներով և ոչ չարորակ Բ բջջներով: LME-IN ենթատիպը բնորոշվում է ակտիվ բորբոքային միջավայրով՝ ցիտոսորբիկ CD8+ T և NK բջջների գերակշռությամբ, որոնք արտադրում են հարուրորքային ցիտոկիններ: LME-MS-ում դիտվում է ֆիբրոբլաստների պրոլիֆերացիա, արտաքային մատրիքսի վերածևավորում և TGFβ-կախյալ ստրոմալ ակտիվացում: Մինչդեռ LME-DE ենթատիպը բնութագրվում է իմունային և ստրոմալ տարրերի զգալի նվազեցմամբ և էպիգենետիկական ճնշման մարկերներով:

Վերլուծությունները ցույց են տվել, որ LME դասակարգումն ունի պրոգնոստիկ կիխիկական արժեք՝ անկախ այլ պարամետրերից: LME-GC և LME-IN ենթատիպերը

ասոցացվում են ապրելիության բարձր, իսկ LME-MS-ը՝ միջին ցուցանիշների հետ: Մինչեւ LME-DE-ն բնութագրվում է ստանդարտ թերապիայի նկատմամբ կայունությամբ և բարձր մահացությամբ: Այս արդյունքները հաստատում են ուռուցքային միկրոմիջավայրի դերը՝ որպես DLBCL-ի պրոգնոստիկ կարևոր գործոն: LME-DE նմուշներում դեմերիլացնող ազացիտիդինի կիրառումը հանգեցրել է էափենետիկական ճնշված ֆենոտիպի մասնակի բարելավման՝ *SMAD1* և *MHC* գեների ակտիվացման, *TGFβ* ազդանշանային ուղղության վերականգնման, *CD3<sup>+</sup>* ու *CD8<sup>+</sup>* T բջիջների ներթափանցման բարձրացման: Այս արդյունքները վկայում են, որ իմունաբանորեն «լուռ» լիմֆոմաները կարող են էափենետիկորեն վերածրագրավորվել իմունային ակտիվ վիճակի՝ իմունավորելով հիպոմեթիլացնող միջոցների կիխիկական կիրառման նպատակահարմարությունը DLBCL որոշ ենթատիպերի դեպքում:

Ցոյց է տրվել արտաքշային մատրիքսի պրոտեոգլիկաններ դեկորինի և բիգլիկանի ակտիվ մասնակցությունը ուռուցք-ստրոմա փոխազդեցության մեջ: Ենթարինի բարձր էքսպրեսիան կոռելացվում է իմունային ակտիվացման և ապրելիության բարձր ցուցանիշների հետ, մինչդեռ բիգլիկանի դեպքում քրոնիկ բորբոքման և անբարենպաստ ելքի հետ: ABC և LME-DE ուռուցքների ժամանակ ուկերմինանտ դեկորինի կամ բիգլիկանի ընդունումը զգալիորեն դանդաղեցնում է ուռուցքի աճը: Ստացված տվյալները վկայում են, որ այս պրոտեոգլիկանները կարող են դիտարկվել որպես հնարավոր թերապևտիկ թիրախներ:

Գենետիկական փոփոխությունների վերլուծությունը ցոյց է տվել, որ *FAS* գենի մուտացիաները զգալիորեն հարստացած են DLBCL-ի GCB և EZB մոլեկուլային ենթատիպերում և հազվադեպ են համընկնում *MYC* ակտիվացման հետ՝ մատնանշելով որոշակի էկուուցիոն ուղիներ: *FAS* մուտացիաները խաթարում են ապոպտոզի ազդանշանի փոխանցումը և նմանակում առտոմիոնային լիմֆոպրոլիֆերատիվ համախտանիշի ժամանակ դիտվող մուտացիաները: *FAS* սպիտակոցի կորուստ ունեցող ուռուցքներն ունեն բորբոքյան, սակայն ֆունկցիոնալ առումով սպառված միկրոմիջավայր՝ T helper և ցիտոտոքսիկ T բջիջների բարձր ներթափանցմամբ, բայց նվազած ապոպտոտիկ զգայունությամբ: Կիխիկորեն այդամիտ դեպքերը ցուցաբերել են ապրելիության ավելի վատքար ցուցանիշներ՝ անկախ *TNFRSF14* կամ *MYC* կարգավիճակից, ինչը հաստատում է *FAS*-ը՝ որպես անբարենպաստ ելքի անկախ ցուցանիշ:

Ընդհանուր առմամբ, ստացված արդյունքները ծևավորում են ինտեգրատիվ մոլեկուլային պատկեր, որը կապում է ուռուցքային բջիջների գենետիկական և էափենետիկական փոփոխությունները միկրոմիջավայրի կառուցվածքի և ֆունկցիայի հետ DLBCL-ի դեպքում: Առաջարկվող LME մոլեկուլային դասակարգումը արտացոլում է կենսաբանորեն վերարտադրելի և կիխիկական առումով նշանակայի տարատեսություն՝ ապահովելով պրոգնոստիկ և պրեդիկտիվ արժեք: Արդյունքները ներառվել են ընթացիկ կիխիկական փորձարկումներում (օր՝ GUIDANCE-01, NCT054648234) և ընդգծում են միկրոմիջավայրը թիրախսավորող և էափենետիկական թերապիաների ներուժը՝ ագրեսիվ Յ բջային լիմֆոմաների դեպքում արդյունավետ հակառակության իմունիտետի վերականգնման համար:

**Kotlov Nikita Yurievich**

**Molecular classification and characterization of tumor microenvironment subtypes in diffuse large B-cell lymphoma based on transcriptomic data**

**Summary**

**Keywords:** Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL); tumor microenvironment (TME); transcriptomic profiling; immune subtypes; decorin; biglycan; azacitidine; prognostic biomarkers

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most frequent and biologically heterogeneous subtype of non-Hodgkin lymphoma, accounting for up to 40% of all adult cases. Despite the curative potential of standard immunochemotherapy (R-CHOP), approximately one third of patients relapse or develop refractory disease, highlighting the urgent need for molecular stratification and personalized therapeutic approaches. Recent genomic studies have expanded our understanding of tumor-intrinsic alterations; however, the role of the tumor microenvironment (TME) in determining clinical outcome remains insufficiently characterized.

This study aimed to develop an integrative molecular classification of DLBCL that incorporates transcriptomic, genetic, and epigenetic features of both tumor and non-malignant components of the lymph node ecosystem.

Comprehensive transcriptomic analysis of over 5000 lymphoid tissue samples, including 4655 DLBCL tumors, allowed systematic reconstruction of the cellular composition of the microenvironment. Based on a curated panel of 276 genes grouped into 22 biologically interpretable signatures, the expression profiles were deconvoluted to quantify immune, stromal, and signaling components. Unsupervised clustering of these data revealed four robust and reproducible microenvironmental subtypes, collectively termed Lymphoma MicroEnvironment (LME) classes: germinal-center-like (LME-GC), mesenchymal (LME-MS), inflammatory (LME-IN), and depleted (LME-DE). These subtypes were consistently identified across independent cohorts and sequencing platforms, confirming their biological stability.

Each LME subtype represents a distinct mode of interaction between malignant B-cells and their surrounding tissue. LME-GC recapitulates the structure of a normal germinal center, enriched in follicular dendritic cells, helper T cells, and non-malignant B cells. LME-IN reflects an activated, inflammatory milieu dominated by cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells producing proinflammatory cytokines. LME-MS is characterized by fibroblast proliferation, extracellular matrix remodeling, and strong TGF $\beta$ -driven stromal activation. In contrast, LME-DE exhibits marked depletion of immune and stromal elements, global DNA hypermethylation (CIMP phenotype), and silencing of antigen-presentation and interferon-response genes.

Prognostic analysis across multiple cohorts demonstrated that LME classification has strong and independent clinical relevance. Patients with LME-GC and LME-IN tumors had significantly better overall and progression-free survival, even after adjustment for IPI and COO. The LME-MS subtype showed intermediate outcomes, while LME-DE was associated with resistance to standard therapy and the poorest survival rates. These findings establish the microenvironment as a critical determinant of prognosis in DLBCL.

Functional experiments further confirmed the biological impact of microenvironmental states. In patient-derived xenografts (PDX) of the LME-DE subtype, treatment with the demethylating agent azacitidine led to partial reversal of the epigenetically suppressed phenotype: upregulation of SMAD1 and MHC genes, restoration of TGF $\beta$  signaling, and increased infiltration of CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. These results provide experimental evidence that immunologically “silent” lymphomas can be epigenetically reprogrammed toward an immune-reactive state, supporting the rationale for clinical application of hypomethylating agents in selected DLBCL subtypes.

Further investigation of extracellular matrix proteoglycans decorin (DCN) and biglycan (BGN) revealed their active involvement in tumor-stroma interactions. High expression of DCN correlated with immune activation and improved survival, whereas BGN was linked to chronic inflammation and poor outcome. In xenograft experiments using ABC and LME-DE tumors, intraperitoneal administration of recombinant decorin or biglycan significantly slowed tumor growth, which resumed after treatment cessation. These results confirm that structural matrix components can modulate tumor behavior *in vivo* and represent potential therapeutic targets.

Integrative analysis of genetic alterations revealed that FAS mutations are highly enriched in the GCB and EZB molecular subtypes of DLBCL and rarely co-occur with MYC activation, indicating distinct evolutionary pathways. Most FAS mutations affected the death domain, disrupting apoptosis signaling and mimicking mutations observed in autoimmune lymphoproliferative syndrome. Tumors harboring FAS loss exhibited an inflamed yet functionally exhausted immune microenvironment, with increased infiltration of Tfh and cytotoxic T cells but reduced apoptotic sensitivity. Clinically, FAS-deficient cases had significantly worse overall survival, independent of TNFRSF14 or MYC status, underscoring FAS as an independent marker of adverse outcome.

Together, these findings define an integrated molecular framework connecting tumor-intrinsic genetic and epigenetic alterations with the structure and function of the surrounding microenvironment in DLBCL. The proposed LME classification captures biologically reproducible and clinically relevant heterogeneity, offering both prognostic and predictive insights. The results have been incorporated as a secondary endpoint in ongoing clinical trials (e.g., GUIDANCE-01, NCT054648234) and highlight the potential for microenvironment-targeted and epigenetic therapies to restore effective antitumor immunity in aggressive B-cell lymphomas.

