Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

# Молекулярные предикторы ответа на индукционную терапию бортезомиб-содержащими схемами у пациентов с множественной миеломой

3.1.28. – Гематология и переливание крови
3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Сергеева Анна Михайловна

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор Менделеева Лариса Павловна
кандидат медицинских наук Сидорова Юлия Владимировна

Москва 2026

# Оглавление

ВВЕДЕНИЕ ..... 5

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ..... 14

1.1. Определение, клинические проявления, критерии диагностики, эпидемиология и классификация множественной миеломы. ..... 14

1.2. Этиология и патогенез множественной миеломы ..... 18

1.3. Стратификация риска при множественной миеломе ..... 20

1.4. Современные аспекты терапии множественной миеломы ..... 23

1.5. Ответ на терапию бортезомиб-содержащими схемами у пациентов с множественной миеломой ..... 25

1.6. Анализ молекулярных нарушений в опухолевых клетках при множественной миеломе 28

1.6.1. Хромосомные перестройки ..... 28

1.6.2. Точечные мутации ..... 29

1.6.3. Субклональная гетерогенность ..... 30

1.7. Мутации генов *KRAS* и *NRAS* в опухолевых клетках при множественной миеломе ..... 32

1.7.1. Изоформы белков RAS, функциональная значимость и частота встречаемости мутаций в генах *NRAS* и *KRAS* ..... 32

1.7.2. Прогностическое значение мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* в опухолевых клетках у пациентов с множественной миеломой ..... 35

1.7.3. Ассоциация мутаций в генах *KRAS/NRAS* с другими генетическими аберрациями. ... 38

1.8. Профиль экспрессии генов в опухолевых клетках при множественной миеломе ..... 39

1.9. Сигнальные каскады, активированные в опухолевых клетках у пациентов с множественной миеломой ..... 42

1.10. Влияние цитокинов на развитие опухоли при множественной миеломе ..... 47

Заключение обзора литературы ..... 48

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ..... 50

2.1. Характеристика больных ..... 50

2.2. Методы исследования ..... 53

2.2.1. Выделение клеток и нуклеиновых кислот ..... 53
2.2.2. Секвенирование генов *KRAS* и *NRAS* по Сэнгеру ..... 56
2.2.3. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени ..... 58
2.2.4. Высокопроизводительное РНК-секвенирование ..... 60
2.2.5. Статистический анализ данных ..... 62
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ..... 64
3.1. Встречаемость мутаций в генах семейства *RAS* и комплексная оценка клинического значения этих мутаций у пациентов с множественной миеломой ..... 64
3.1.1. Количественные и качественные характеристики мутаций в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках костного мозга у больных множественной миеломой ..... 64
3.1.2. Взаимосвязь мутаций в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках и эффективности ответа на терапию триплетными схемами PAD/VCD больных с ММ ..... 69
3.1.3. Анализ ОВ и ВБП в зависимости от типа мутации в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках у пациентов с ММ, получивших ауто-ТГСК ..... 74
3.1.4. Взаимосвязь клинико-лабораторных показателей и мутаций в генах *NRAS/KRAS* у пациентов с множественной миеломой ..... 79
3.1.5. Сочетание мутаций в генах *NRAS/KRAS* с цитогенетическими аберрациями высокого риска. ..... 84
3.2. Анализ экспрессии генов в опухолевых клетках больных с множественной миеломой .. 85
3.2.1. Контроль качества и анализ информативности данных РНК-секвенирования ..... 85
3.2.2. Сравнительный анализ методов количественной оценки экспрессии генов: полимеразной цепной реакции в реальном времени и РНК-секвенирования ..... 91
3.2.3. Изучение экспрессии генов – мишеней сигнальных каскадов RAS/ERK в опухолевых клетках при ММ в зависимости от наличия мутации в генах *NRAS/KRAS* ..... 93
3.2.4. Взаимосвязь уровня экспрессии генов-эффекторов *IL-6, CREM, NRL, MMP14, MEF2B* с ответом на терапию и течением заболевания. ..... 96
3.3. Поиск экспрессионных маркеров ответа на бортезомиб-содержащую терапию с помощью транскриптомного анализа ..... 101

3.3.1. Выявление генов, экспрессия которых влияет на эффективность терапии, методом машинного обучения «случайный лес» ..... 101

3.3.2. Взаимосвязь экспрессии генов, ассоциированных с ответом на терапию, и наличия мутации в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках при ММ ..... 107

3.3.3. Взаимосвязь экспрессии генов, ассоциированных с ответом на терапию и клинико-лабораторными показателями. ..... 109

3.4. Генетические изменения и уровень экспрессии эффекторных генов в дебюте и рецидиве ММ (анализ клинического случая) ..... 110

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ..... 115

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ..... 123

ВЫВОДЫ ..... 125

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ..... 126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ ..... 127

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ ..... 131

ПРИЛОЖЕНИЕ А ..... 149

ПРИЛОЖЕНИЕ Б ..... 152

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность исследования

Плазмоклеточная миелома или множественная миелома (ММ) — это мультифокальная неопластическая пролиферация плазматических клеток костного мозга (КМ). При диагностике ММ учитывается наличие моноклональной секреции сывороточного и/или мочевого иммуноглобулина (Ig) и признаков, указывающих на повреждения органов, связанных с заболеванием (***C**alcium elevation, **R**enal failure, **A**nemia, **B**one lesions* - CRAB) и/или наличие маркеров опухолевой активности (***S**ixty percent plasma cells, **Li**ght chain ratio,* **M**RI - SLiM) [1]. Стандартой схемой лечения ММ на этапе индукции является комбинация препаратов, включающая бортезомиб. Пациенты, которые могут перенести высокодозную химиотерапию, на следующем этапе проходят аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) или, в более редких случаях при наличии показаний, аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [2].

ММ – неизлечимое заболевание с высоко гетерогенной структурой на молекулярном уровне. Хромосомные аберрации в сочетании клинико-лабораторными показателями лежат в основе стратификации ММ [3]. Молекулярные механизмы патогенеза ММ связывают с миелома-инициирующими событиями, приводящими к возникновению негипердиплоидных и гипердиплоидного подтипов ММ. Примерно 40% случаев ММ приходится на негипердиплоидные подтипы, для которых характерны хромосомные транслокации с участием одного из онкогенов: *CCND1* t(11;14)(q13;q32), *MMSET* t(4;14)(p16;q32), *MAF* t(14;16)(q32;q23), *MAFB* t(14;20)(q32;q12), *CCND3* t(6;14)(p21;q32) [4]. В большинстве случаев хромосомная аберрация сопровождается увеличением активности онкогена в результате его перемещения под энхансер гена тяжелой цепи иммуноглобулина (*IGH*) в локус 14q32 [5]. Гипердиплоидный кариотип определяется при наличии ≥48 хромосом и при ММ включает трисомию хромосом 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 и/или 21 [6]. Малигнизация плазматической клетки при ММ в большинстве случаев сопровождаются увеличением экспрессии генов ключевых молекул клеточного цикла (CCND1, CCND2) [7, 8]. Хромосомные транслокации в сочетании с гиперэкспрессией онкогенов служат основой для транскриптомной классификации ММ [9, 10, 11]. Для ММ характерны точечные мутации, наиболее часто в генах сигнального каскада RAS/ERK

(*KRAS, NRAS, FGFR3* и *BRAF*), сигнальном каскаде NF-κB (*TRAF3, TRAF2, BIRC2, BIRC3*) и другие мутации [12].

Доказанными факторами, определяющим ход заболевания, является соматический статус пациента, возраст, стадия ММ, наличие минимальной остаточной болезни, молекулярно-генетические нарушения и их аллельная нагрузка. В современную систему стратификаций групп риска (Second **R**evision of the **I**nternational **S**taging **S**ystem, R2-ISS) включены как клинические характеристики больного, так и генетические нарушения [3]. Несмотря на четкие критерии стадирования ММ и разделения на группы риска, ответ на индукционную терапию значительно варьирует даже среди пациентов из одной группы или стадии [13]. Глубина ответа на терапию может варьировать от достижения полной ремиссии до резистентного течения даже среди пациентов первой, самой благоприятной стадии. Кроме того, частоты достижения полного строгого ответа в группах высокого и стандартного цитогенетического риска не отличаются [14]. Очевидно, что данные шкалы и группы риска не включают в себя все критерии, в том числе не учитывают все молекулярно-генетические нарушения, которые могут наблюдаться при ММ. Настоящая работа направлена на поиск новых молекулярно-генетических маркеров, которые бы более полно предсказывали ответ пациента на индукционную терапию.

Точечные мутации в генах *NRAS/KRAS* являются самыми распространенными при ММ [12, 15]. Исследования на клеточных линиях показали, что мутации в генах *NRAS/KRAS* повышают пролиферативную активность и устойчивость к апоптозу [16, 17]. В экспериментах на мышах индукция мутаций в генах *NRAS/KRAS* приводило к развитию миелопролиферативных расстройств с летальным исходом, что демонстрирует их онкогенный потенциал [18, 19]. Несмотря на это, мутации в генах *NRAS/KRAS* не включены в стандартные прогностические шкалы риска при ММ. Необходимо отметить, что частота выявления мутаций в генах *NRAS/KRAS* у пациентов с ММ значительно варьирует в разных исследованиях [20, 21, 22, 23, 24, 25, 26], а прогностическое значение выявления этих мутаций в опухолевых клетках при ММ неоднозначно [12, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34].

Опухолевые клетки у пациентов с ММ наряду с высокой мутационной нагрузкой характеризуются высокоспецифичным профилем экспрессии генов, существенно отличающимся от нормальных плазматических клеток [35]. Существуют экспрессионные генные панели, ассоциированные с биологическими особенностями опухоли и ответом на терапию [7, 9, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42]. Однако, в связи со сложностью проведения анализа и дороговизной, экспрессионные генные панели в настоящее время не используются в рутинной практике.

Помимо панелей, состоящих из множества генов, в клинической практике важное значение играет экспрессия отдельных генов- маркеров ответа на терапию и течения ММ [43, 44]. Поиск экспрессионных маркеров является важной задачей нашего исследования, так как позволит в дальнейшем внедрить более комплексный подход к оценке прогностических рисков при ММ, а также определит векторы таргетной терапии у пациентов с плохим прогнозом. Изучение взаимосвязи эффективности лечения и молекулярных особенностей опухолевых клеток при ММ может значительно повлиять на понимание механизмов, которые лежат в основе эрадикации опухоли современными схемами терапии.

В настоящий момент все пациенты лечатся одинаково вне зависимости от индивидуальных факторов риска или характеристик заболевания. Актуальный вопрос выбора оптимальной терапии может быть решен с помощью использования новых молекулярно-генетических маркеров-предикторов, в дополнение к существующей стратификации риска.

## Степень разработанности темы исследования

На фоне высокой клинической эффективности бортезомиба сохраняется выраженная межиндивидуальная вариабельность ответа на лечение, что обуславливает необходимость исследований молекулярных механизмов резистентности. Результаты исследований показывают, что молекулярные механизмы резистентности связаны с активностью и строением протеасомы [45]. Открыта роль стресс-ответа эндоплазматического ретикулума и системы контроля свертываемости белков в механизмах резистентности к ингибитору протеасомы бортезомибу [46, 47]. Установлено, что активация сигнальных путей NFkB, JAK/STAT, PI3K/AKT может быть фактором снижения чувствительности к бортезомибу [48, 49, 50]. Выявлена роль эпигенетических модификаций в появлении резистентности к схемам, содержащим бортезомиб [51, 52]. Опубликованы прогностические транскриптомные сигнатуры, ассоциированные с устойчивостью к бортезомибу [40, 53, 54].

Мутации в генах семейства *RAS*, *NRAS* и *KRAS* ранее рассматривались как кандидаты на роль факторов неблагоприятного прогноза [16, 18, 55, 56, 57]. Мутации в генах *NRAS/KRAS* однозначно приводили к худшему исходу заболевания, если применялись режимы терапии, не содержащие бортезомиб [58]. В ФГБУ «НМИЦ гематологии» выполнено исследование, в котором показано, что мутации в генах семейства *RAS* в сочетании с гиперэкспрессией *c-MYC* отрицательно влияют на ВБП у больных ММ, принимающих бортезомиб-содержащие схемы

[59]. Современные исследования доказывают негативный эффект этих мутаций при схемах лечения, включающих бортезомиб [29, 32]. В то же время, появление ингибитора протеасомы и других молекул таргетного действия, совпало с эрой мультицентровых исследований ММ, для которых характерно составление больших разнородных выборок. В этих исследованиях авторы заявляют о нейтральном действии мутаций в генах *NRAS/KRAS* [12, 25, 31, 60].

Механизм влияния мутаций в генах *NRAS/KRAS* на нижележащие мишени сигнального пути в опухолевых клетках ММ мало изучен. Известно, что мутации в генах *NRAS/KRAS* активируют сигнальный каскад RAS/ERK, что приводит к его конститутивной активации [61]. В результате фосфорилированный ERK активирует ряд транскрипционных факторов, приводя к усилению экспрессии генов клеточного цикла и повышению пролиферации ПК [62]. Экспериментальные модели ММ показали, что мутантные *NRAS/KRAS* одновременно активируют PI3K/AKT путь, что приводит к подавлению апоптоза и выживанию клеток, повышению метаболической активности клеток [63]. Белки RAS, образовавшиеся в результате мутации, сопровождающейся аминокислотной заменой в опухолевых клетках при ММ способны активировать NF-kB путь [64]. Было показано, что мутации в генах *NRAS/KRAS* усиливают протеасомную активность за счет увеличения экспрессии субъединиц протеасомы и снижения стресс-ответа эндоплазматического ретикулума [65].

## Цель исследования

Определить мутационный статус генов *KRAS/NRAS* и профиль экспрессии генов в опухолевых плазматических клетках у больных ММ в дебюте заболевания и оценить взаимосвязь выявленных нарушений с клинико-лабораторными проявлениями и эффективностью терапии бортезомиб-содержащими схемами.

## Задачи исследования

1. Оценить частоту встречаемости мутаций в генах *KRAS/NRAS* опухолевых клеток у пациентов с впервые диагностированной ММ. Соотнести наличие мутации в генах *KRAS/NRAS* в опухолевых клетках с клиническими проявлениями ММ в дебюте заболевания (наличием

плазмоцитом, степенью остеолитических повреждений, количеством моноклонального белка, уровнем альбумина и креатинина, и др.).

2. Оценить эффективность терапии бортезомиб-содержащими схемами лечения (глубину ответа после 6 курсов и выживаемость без прогрессии) в зависимости от наличия мутаций в генах *KRAS/NRAS* в опухолевых клетках.
3. Провести сравнительный анализ экспрессии генов сигнальных каскадов с участием белков RAS в опухолевых клетках с мутациями в генах *KRAS/NRAS* и без них, методом РНК-секвенирования и количественной полимеразной цепной реакцией.
4. С помощью анализа транскриптома опухолевых клеток выявить гены, уровень экспрессии которых важен для прогнозирования ответа на бортезомиб-содержащие схемы, и сопоставить уровень экспрессии этих генов с наличием мутаций в генах *KRAS/NRAS* и клиническими проявлениями ММ.

## Научная новизна

- Получены достоверные данные о негативном влиянии мутаций в генах *KRAS/NRAS* на эффективность терапии бортезомиб-содержащими триплетными схемами на индукционном этапе. Найдены молекулярные предикторы, позволяющие выделить среди пациентов группу высокого риска с плохим ответом на терапию.
- Впервые в РФ проведено исследование молекулярных механизмов патогенеза ММ на уровне транскриптома. Выделен набор генов, экспрессия которых в наибольшей степени влияет на глубину ответа на бортезомиб-содержащие триплеты.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Сопоставление эффективности лечения пациентов-кандидатов на ауто-ТГСК с мутациями и без мутаций в генах *NRAS/KRAS* позволило определить группу пациентов со сниженной глубиной ответа на индукционную терапию, сниженной выживаемостью без прогрессирования (ВБП) и более серьезными нарушениями клинико-лабораторных показателей. Мутации в генах *NRAS/KRAS* могут рассматриваться как дополнительный маркер неблагоприятного прогноза. Показано, что мутации в изоформе *KRAS* оказывают более неблагоприятное воздействие, что позволяет сузить спектр исследования мутаций.

Изучение экспрессии эффекторных генов-мишеней сигнальных каскадов RAS позволило определить механизмы, через которые реализуется устойчивость к терапии у пациентов с мутациями в генах *NRAS/KRAS*. Это позволит в будущем оптимизировать схемы терапии пациентов уже на этапе индукции.

Анализ транскриптома с целью выявления новых предикторов ответа на терапию позволил выявить экспрессии генов, ранжированные по степени важности признака. Анализ данного списка генов позволяет выявить дополнительные аспекты механизма резистентности опухоли к терапии. Добавление новых предикторов ответа на терапию может улучшить существующие систему стратификации риска у больных с впервые выявленной ММ, а также привести к созданию новой экспрессионной молекулярно-генетической панели для оценки прогноза и ответа на терапию.

## Методология и методы исследования

В исследование включено 105 больных с ММ, которые проходили лечение или получали консультацию в «НМИЦ гематологии» Минздрава России с января 2013 по ноябрь 2019 года и 14 доноров (контрольная группа). Пациенты, поступившие в центр, проходили комплексное обследование, включающее лабораторные и инструментальные методы, необходимые для верификации диагноза и стадирования ММ. Диагностический алгоритм включал: общий и биохимический анализы крови, иммунохимические, морфологические (подсчет миелограммы и/или гистологический анализ), цитогенетическое (**F**luorescent **I**n **S**itu **H**ybridization, FISH) исследования и лучевую диагностику (низкодозовая компьютерная томография (КТ) или магнитно-резонансная томография (МРТ)).

Из аспирата КМ выделяли CD138+ клетки с помощью магнитной сепарации на колонке. CD138+ клетки использовали для выделения геномной ДНК и тотальной РНК. Образцы ДНК использовали для секвенирования генов *NRAS/KRAS*, были проанализированы образцы от 89 пациентов.

С целью исследования уровня экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на образцах РНК, полученных от 14 пациентов и 5 доноров, проводили реакцию обратной транскрипции (ОТ) с последующим выполнением количественной ПЦР.»

Для изучения транскриптома опухоли использовали РНК 62 пациентов и 11 доноров. Проводили РНК-секвенирование тотальной РНК. Далее выполняли биоинформатическую обработку с определением качества полученных данных. После проведения контроля качества и выбраковки образцов с низким качеством, было выбрано 46 образцов пациентов с ММ и 7 образцов доноров для дальнейшего анализа. Данные РНК-секвенирования использовали для анализа экспрессии эффекторных генов-мишеней сигнальных каскадов RAS, а также для поиска наиболее важных экспрессий при прогнозировании глубины ответа пациента на индукционную терапию.

Наличие мутации и уровень экспрессии генов в опухолевых клетках были сопоставлены с глубиной ответа на терапию, показателями общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования, клинико-лабораторными характеристиками пациентов.

## Личный вклад автора

- Автор провел подробный анализ литературных данных, посвященных патогенезу, клиническим и молекулярно-генетическим аспектам ММ. Автором самостоятельно выбрана тема и определены задачи исследования, разработан дизайн и определены методологические подходы. Автор принимал непосредственное участие в формировании исследуемой выборки, сборе клинико-лабораторных данных и биологического материала. Самостоятельно выполнены основные этапы работы лабораторной работы, включая выделение нуклеиновых кислот, подготовку образцов и проведение молекулярно-генетических исследований (в том числе обратной транскрипции, полимеразной цепной реакции и количественной ПЦР, анализа результатов секвенировании по Сэнгеру и РНК-секвенирования.
- Совместно с аналитическим отделом проведена первичная обработка и статистический анализ полученных данных, включая биоинформатическую интерпретацию результатов транскриптомного исследования. Выполнена интеграция молекулярных и клинических данных с последующей оценкой их диагностической и прогностической значимости. Все представленные в работе результаты получены при непосредственном участии автора. Интерпретация данных, формулировка цели и задач, выводов и положений, выносимых на защиту осуществлена совместно с научными руководителями диссертационной работы. Подготовка публикаций выполнена при ведущей роли автора.

## Основные положения, выносимые на защиту

1. Мутации в генах *KRAS/NRAS* в опухолевых клетках в дебюте ММ выявлены у 42% больных. Их наличие ассоциировано с появлением плазмоцитом, множественных остеодеструкций, снижением уровня альбумина и повышением уровня креатинина, а также со сниженными частотой глубоких ответов на индукционную терапию и показателями выживаемости без прогрессирования для пациентов после аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
2. Выявлено, что мутации в гене *KRAS* статистически значимо взаимосвязаны со сниженной эффективностью индукционной терапии, выживаемостью без прогрессирования, повышенным содержанием парапротеина и креатинина, сниженным уровнем альбумина, а мутации в гене *NRAS* ассоциированы с наличием множественных остеодеструкций.
3. В опухолевых клетках с мутациями в генах *KRAS/NRAS* выявлено статистически значимое повышение экспрессии пяти генов: *CREM, NRL, IL-6, MEF2B, MMP14*. Доказано, что гиперэкспрессия гена *NRL* ассоциирована со сниженной глубиной ответа на терапию, а повышенный уровень экспрессии *CREM* и *IL-6* достоверно коррелирует со снижением выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости пациентов соответственно.
4. Установлено, что гиперэкспрессия генов *IDH3B, P2RY2, TTC39B* и *ARHGEF7* ассоциирована с достижением глубокого ответа, в то время как повышенная транскрипционная активность *FBXO17* является маркером низкой эффективности терапии.

## Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность основных выводов диссертационной работы обусловлена глубоким анализом актуальных научных публикаций по теме исследования, а также применением релевантного математико-статистического аппарата для обработки полученных данных.

Апробация диссертационной работы проведена на заседании проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии; проблемы клинической и производственной трансфузиологии» (протокол №5 от 04.05.2026).

Основные положения результатов диссертационного исследования были изложены в виде устных докладов, постеров и тезисов на конференциях и конгрессах:

«Объединенный конгресс гематологов России и конгресс трансфузиологов России», г. Москва, 2018, 2022 и 2024 гг.; Научно-практическая конференция «Иммунология гемопоэза» 2016, 2019 и 2023 гг.; «Xth Eurasian Hematology-Oncology Congress», 2019 г.; «The World Congress on Controversies in Multiple Myeloma», 2018 г.; «European Hematology Association Congress», 2020 и 2025 гг.; «I Научно-практической конференции имени академика В.Г. Савченко», 2022 г.; «Korean Society of Hematology (KSH) International Conference & 67th Annual Meeting», 2026 г.

## Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 16 работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ, 12 тезисных сообщений.

## Структура и объем диссертации

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 170 страницах машинописного текста и состоит разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», «Приложение А» и «Приложение Б». Иллюстративный материал представлен в виде 38 рисунков и 36 таблиц. Список литературы включает 196 литературных источника: 4 отечественных и 192 зарубежных.

# Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Определение, клинические проявления, критерии диагностики, эпидемиология и классификация множественной миеломы.

Множественная миелома – это В-лимфопролиферативное злокачественное заболевание, характеризующееся появлением клональных ПК в костном мозге (≥10%), в большинстве случаев с секрецией моноклонального белка (М-белка, парапротеина). Диагноз устанавливается при наличии CRAB-критериев (гиперкальциемия, почечная недостаточноть, анемия и остеолитические повреждения костной ткани), и/или SLiM-критериев (МРТ, показывающая более одного очагового поражения, соотношение свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов в сыворотке> 100, плазматических клеток в костном мозге> 60%) [1].

В 10-20% случаев ММ протекает бессимптомно и выявляется случайно по повышенной скорости оседания эритроцитов (СОЭ) или увеличению уровня белка в моче при плановых обследованиях. Типичными клиническими проявлениями ММ являются остеолитические повреждения костной ткани (70%) и гиперкальциемия [66, 67]. Опухолевые клетки в костном мозге влияют на окружающие нормальные клетки и стромальное окружение и стимулируют выработку гетерогенного класса цитокинов, IL-1β, TNFβ, M-CSF, IL-3, IL-6, активирующие остеокласты, через взаимодействие с RANKL, лигандом рецептора RANK, семейства факторов некроза опухоли NF-κB [68]. Остеокласты разрушают кость вокруг опухолевых клеток. Деструктивные процессы развиваются в первую очередь в плоских костях (череп, ребра, грудина, кости таза), а также в позвоночнике. Изменения костей проявляются в виде генерализованного остеопороза, единичных или множественных очагов остеолиза и патологических переломов костей. Костный лизис приводит к мобилизации кальция из костей и развитию гиперкальциемии. Нарушается фосфорно-кальциевый обмен, в крови и моче обнаруживается высокая концентрация кальция и фосфора. Гиперкальциемия в крови или моче (> 11,5 мг/дл, или> 2,75 ммоль/л) наблюдается у 25–30 % пациентов с ММ и обычно осложняет течение болезни. Гиперкальциемия при ММ вызывает потерю аппетита, тошноту, сонливость и спутанность сознания, а также может приводить к почечной недостаточности [69]. Почечная недостаточность является частым (50–90 %) и значимым осложнением ММ, представляя собой одну из основных причин сокращения продолжительности жизни пациентов. Диагностическим критерием является уровень креатинина

в сыворотке крови, превышающий 2 мг/дл (> 173 ммоль/л). Развитие почечной недостаточности при ММ тесно связано с гиперпродукцией СЛЦ иммуноглобулинов, секретируемых опухолевыми плазматическими клетками. Избыточное количество СЛЦ фильтруется через почечные канальцы, оказывая на них токсическое воздействие. Реабсорбция СЛЦ клетками эпителия проксимальных канальцев приводит к их повреждению и нарушению функции. Неабсорбированные легкие цепи, известные как белок Бенс-Джонса, поступают в дистальные канальцы, где связываются с уромодулином, формируя белковые цилиндры. Эти цилиндры вызывают обструкцию канальцев, а также инициируют воспаление и фиброз, что в конечном итоге усугубляет повреждение почек и приводит к развитию хронической почечной недостаточности [70]. Среди прочих проявлений ММ можно выделить анемию, неврологические и инфекционные осложнения.

Анемия - распространенное (20-80%) осложнение ММ, обусловленное комплексом причин: укорочением жизни эритроцитов, нарушением метаболизма железа, дефицитом эритропоэтина и подавлением эритроидного ростка костного мозга [71]. В мазке крови у пациентов с ММ может обнаруживаться агрегация эритроцитов в виде монетных столбиков и криоглобулинемия. У некоторых пациентов возникает синдром повышенной вязкости крови, который обусловлен особенностями парапротеина при ММ, чаще встречается при миеломе с парапротеинами А и G3 типов из-за свойственной этим патологическим иммуноглобулинам склонности к полимеризации [72].

Неврологические осложнения встречаются более чем у 20% больных ММ и в 2-20% случаев могут быть первыми признаками заболевания [73]. Эти расстройства могут возникать из-за компрессии спинного мозга или нервных корешков эпидуральными плазмоцитомами, патологических переломов, уремии, гиперкальциемии, геморрагического синдрома, нейротоксического действия лекарств и амилоидоза [74]. Наиболее распространенным неврологическим проявлением является периферическая нейропатия, клинически выявляемая в 3-13% случаев ММ, хотя электронейромиография выявляет ее значительно чаще [75].

Дефицит поликлональных иммуноглобулинов больных при ММ обусловлен сниженным содержанием нормальных иммуноглобулинов на фоне излишнего синтеза парапротеина, и их повышенным разрушением [76]. Предполагают, что снижение продукции нормальных антител связано с появлением у больных ММ популяции циркулирующих регуляторных клеток, действие которых направлено на ограничение роста опухолевых клеток, но параллельно они подавляют синтез нормальных антител [77]. Кроме того, опухолевые клетки при ММ секретируют факторы,

подавляющие нормальный иммунный ответ лимфоцитов на антигенную стимуляцию [78]. Приобретенный иммунодефицит у больных ММ открывают ворота рецидивирующим инфекциям [79].

ММ занимает первое место по частоте встречаемости среди плазмоклеточных неоплазий и других заболеваний с секрецией парапротеина, и составляет 10-15 % гематологических опухолей человека [80]. По данным зарубежных источников (исследование 21 региона и 195 стран), заболеваемость ММ возрастает по всему миру, причем прослеживается высокая гетерогенность показателей среди различных стран. Самая высокая скорость заболеваемости отмечается у стран Северной Америки, Австралии и Западной Европы и ранжируется 3,6 – 6,3 случаев на 100 000 человек (значения стандартизованы по возрастным группам), наименьшие показатели наблюдаются в Азии и Африке и составляют 0,4-1,2 случая [81]. Интересно отметить наличие гендерных и расовых различий распространения заболевания: в США у мужчин - афроамериканцев заболеваемость ММ составила 13,94-16,15 случаев, американцев белой расы – 6,39-7,22; у женщин – 10,96-11,57 и 4,15-4,36 случаев соответственно за период с 1993 по 2012 год [82]. ММ характерна для людей пожилого возраста, медиана составляет 63-68 лет [81, 83, 84], пациенты младше 40 лет составляют всего 2% от всех больных ММ [85]. Существуют единичные данные о пациентах с ММ в возрасте 8 - 26 лет [86]. Абсолютным показателем, отражающим качество лечения ММ, является общая выживаемость (ОВ). Результаты исследования Российского Национального гематологического общества показали, что двухлетняя ОВ больных, диагноз которых был установлен 2015 году, достоверно выше по сравнению с ОВ больных, диагностированными в 2009 году, которые составили 60 и 72% соответственно (p=0,02) [13]. В исследованиях эпидемиологии Кировской обл., Новосибирской обл. и Москвы медиана ОВ составила 36, 68 и 60 месяцев, а пятилетняя ОВ возросла в 2 раза за период наблюдений и составила 36, 58 и 49% соответственно [83, 87, 88], что соответствует данным зарубежных исследований в развитых странах за те же годы [81, 82]. По данным работы 2017 года по эпидемиологии ММ в Кировской области (567 пациентов за период с 1994 по 2016 год), заболеваемость составляет 1,8 случая на 100 тысяч человек и прогнозируется ее увеличение до 2,2-2,3 случаев в ближайшие 2 года, распространенность достигает 11 пациентов на 100 тысяч человек, за наблюдаемый промежуток имеет линейную тенденцию роста [89]. В Сибирском федеральном округе по данным, опубликованным в 2018 году, также наблюдается прирост по заболеваемости в 1,6 раза (2,4 случая на 100 000 человек) и распространению в 4,6 раза за период наблюдения с 2006 по 2016 год и составили 2,4 и 13,8 случаев на 100 000 населения в год

соответственно [88]. В Москве количество случаев с первично диагностированной ММ за период с 2009 по 2018 год возросло на 75,8%, причем увеличение уровня заболеваемости наблюдалось преимущественно в диапазоне 60-69 лет [88]. Все авторы приходят к выводу о том, что за последние годы в России наблюдается положительная динамика по заболеваемости и распространению заболевания и отрицательный тренд по ежегодной летальности [90]. Период, характеризующийся значительным улучшением показателей выживаемости, совпадает со временем введения ингибиторов протеасом и препаратов иммуномодулирующего действия в клиническую практику, а также ростом числа выполняемых ауто-ТГСК. Значительное увеличение показателей выживаемости без прогрессии (ВБП) и ОВ связаны с внедрением терапии с использованием новых препаратов, увеличению количества проведенных ауто-ТГСК, которые привели к отрицательной динамике летальности ММ.

Согласно классификация ВОЗ 2022 года ММ относится к плазмоклеточным неоплазиям и другим заболеваниям с секрецией парапротеина (Рисунок 1.1). Помимо ММ данный раздел включает плазмоцитому и группу плазмоклеточных новообразований с сопутствующими паранеопластическими синдромами.

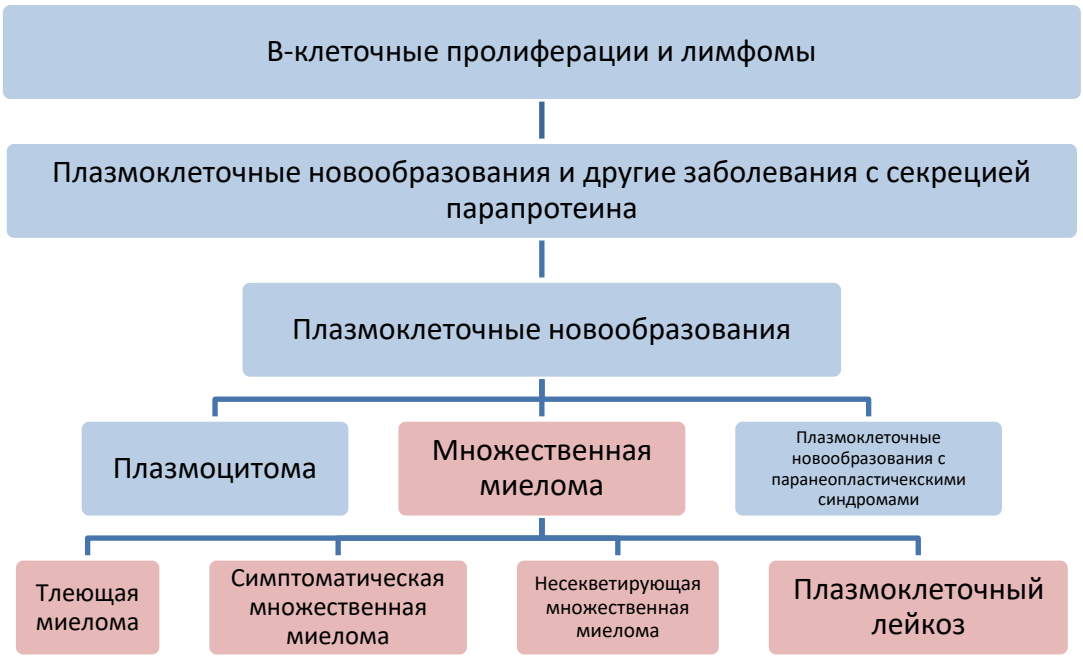



Рисунок 1.1 – ММ в классификации ВОЗ 2022.

Среди подтипов ММ выделяют тлеющую (асимптоматическую), несекретирующую и симптоматическую плазмоклеточную миелому, а также плазмоклеточный лейкоз. Диагностические критерии представлены на Рисунке 1.2. Пациенты с тлеющей миеломой

требуют наблюдения врача-гематолога. Симптоматическая ММ, в том числе несекретирующая форма ММ, требуют назначения терапии [2]. Плазмоклеточный лейкоз является агрессивным заболеванием, который может развиваться в терминальной стадии ММ вследствие избыточного клеточного роста. Моноклональная гаммапатия неясного генеза (МГНГ) – состояние, при котором в крови обнараживается моноклональная секреция Ig без симптомов ММ. Часто МГНГ предшествует ММ (Рисунок 1.3) [91, 92].

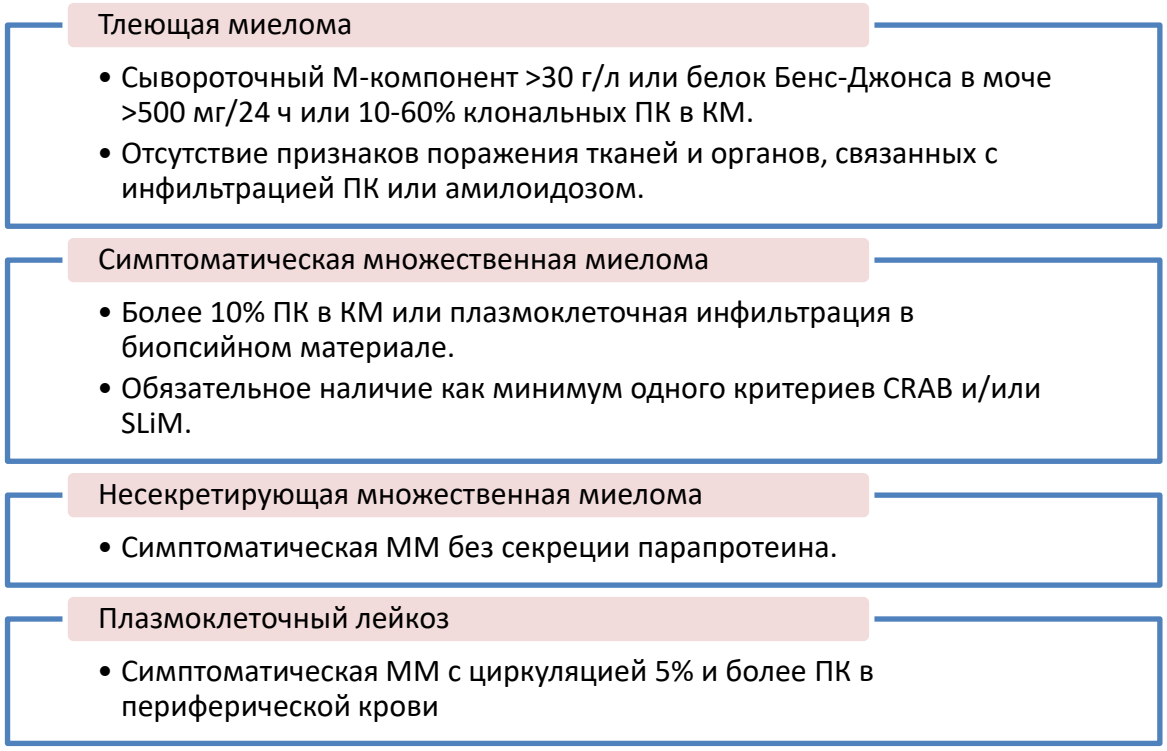



Рисунок 1.2 – Диагностические критерии подтипов ММ.

По иммунохимической классификации ММ разделяют на 6 типов: G (60% случаев), A (20% случаев), D (2% случаев), E (меньше 0,1%) и Бенс-Джонса (18%), редкая М-миелома. Тип ММ определяет класс иммуноглобулина тяжелой цепи, миелома Бенс-Джонса характеризуется присутствием в сыворотке только легких цепей иммуноглобулинов.

## 1.2. Этиология и патогенез множественной миеломы

Причины возникновения ММ неизвестны, но обсуждается ряд генетических факторов, а также воздействие окружающей среды: хроническая антигенная стимуляция вследствие инфекции или других хронических заболеваний, вирусные повреждения генома, воздействие

токсических агентов и радиации. Ретроспективное исследование, включающее более 4 миллионов людей, показало, что риск развития ММ ассоциирован с аутоимунными заболеваниями, инфекционными заболеваниями и воспалительными процессами [93]. Антигенная стимуляция приводит к образованию доброкачественного клона, последующее мутагенное событие служит толчком к злокачественной трансформации. Однако большинство пациентов не могут идентифицировать какую - либо хроническую инфекцию или воздействие токсических веществ, до постановки диагноза ММ [1]. Доказанными факторами риска являются возраст, избыточный вес, наличие близких родственников с выявленными случаями гематологических опухолей [82]. Если среди родственников есть больные с ММ, то риск развития заболевания выше, чем при наличии любой другой гематологической опухоли [94].

Большую роль в изучении патогенеза ММ сыграли молекулярно-генетические исследования, проведенные на В-лимфоцитах разных этапов дифференцировки. Первичные онкогенные события - аберрантные перестройки, при которых протоонкогены встраиваются под промотор гена тяжелой цепи иммуноглобулина, приводят к иммортализации и генетической нестабильности клеток. Было показано, что хромосомные перестройки происходили во время переключения изотипов Ig в герминальном центре фолликула. В опухолевой клетке ММ вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина характеризуется специфическим паттерном нуклеотидных замен, который формируется в результате процесса соматической гипермутации (СГМ). Поскольку вся популяция опухолевых клеток имеет один и тот же паттерн СГМ, можно полагать, что клональная пролиферация опухолевой ПК происходит после прохождения герминального центра периферических лимфоидных органов [5].

Предполагается, что поздние онкогенные события происходят в костном мозге после того, как клетка-предшественник полностью дифференцируется в долгоживущую ПК. После миграции ПК в костный мозг, клетка приобретает признаки малигнизации, которые проявляются в изменении секреции цитокинов стромальными и плазматическими клетками, изменении сигналов пролиферации, уменьшении адгезии ПК к строме КМ. Аккумуляция нарушений на генетическом и экспрессионном уровне белков, контролирующих метаболизм клетки, приводит к дальнейшей малигнизации, которое может сопровождаться выходом ПК из КМ в кровоток – плазмоклеточному лейкозу, агрессивному заболеванию, плохо поддающемуся лечению. Патологические ПК могут возобновлять экспрессию молекул адгезии, таких как CD138, CD56, VLA-4. Вторичное появление молекул адгезии на поверхности малигнизированной клетки

приводит к новой локализации ПК и образованию метастазов за пределами костной ткани – экстрамедуллярной плазмоцитоме (Рисунок 1.3) [95].

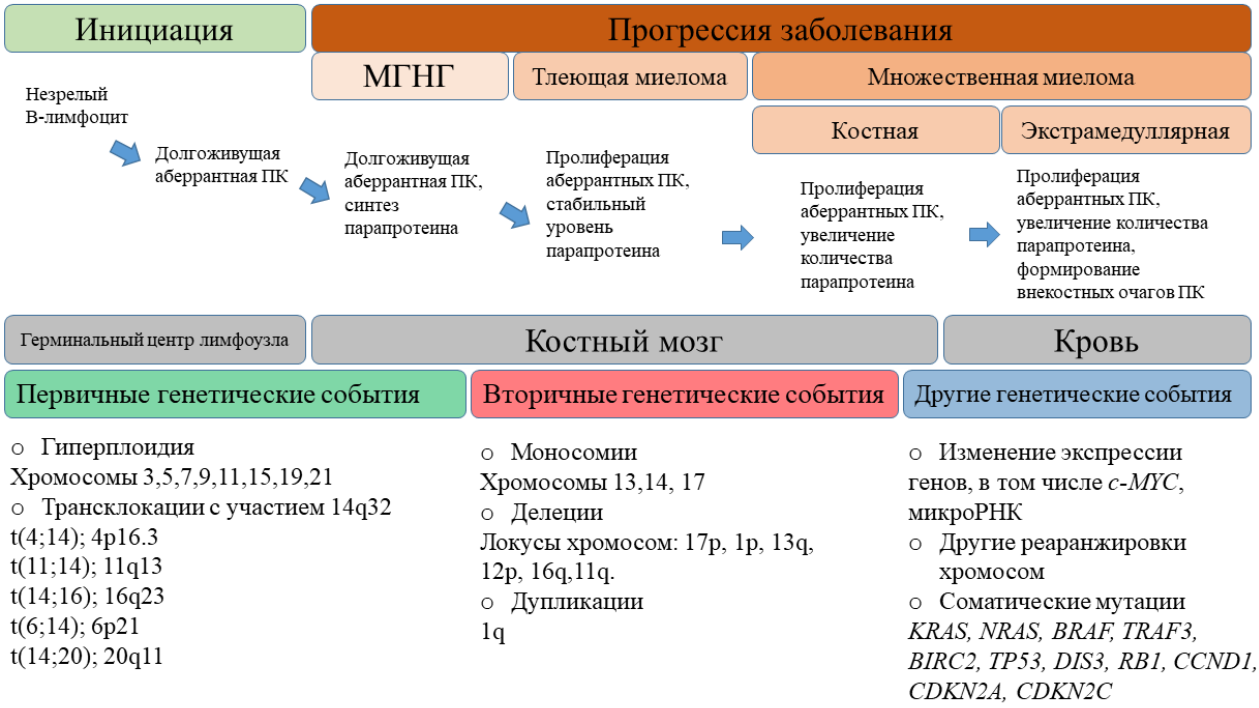



Рисунок 1.3 – Молекулярная эволюция ММ в контексте развития и дифференцировки ПК.

## 1.3. Стратификация риска при множественной миеломе

Возраст и соматический статус больного, наличие сопутствующих заболеваний оказывают значительное влияние на прогноз ММ. В исследовании М. Эндельгарта с соавторами, 125 пациентов с впервые диагностированной ММ были распределены на 3 группы, основываясь на возрасте пациента и 6 различных индексах, кумулятивно оценивающих коморбидность пациента. Для группы больных, находящихся в хорошей физической форме, трехлетняя выживаемость составила 91%, для промежуточной группы – 77%, у больных с хрупким здоровьем - 47% [96]. В 1975 году появилась первая классификация ММ, отражающая размер опухолевой массы и коррелирующая с общей выживаемостью (система стадирования по Durie-Salmon). К критериям прогноза, связанным с размером опухоли, отнесли концентрацию М-компонента в сыворотке крови, величину протеинурии Бенс-Джонса, уровень остеолитического поражения костной ткани, концентрацию гемоглобина и кальция в крови [97].

Позже была введена международная система стадирования (ISS) [98]. В ISS используется прогностическое сочетание уровней β2-микроглобулина (β2м) и альбумина в сыворотке крови. Было показано, что стадия ММ по ISS коррелирует с ОВ. Уровень активности опухолевого процесса отражает β2м - компонент лёгкой цепи главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC I), представленный на всех ядросодержащих клетках организма человека. Уровень β2м также пропорционален массе опухоли. Прогностическая роль β2м при ММ определена впервые в 1984 г., тогда же предложено пороговое значение β2м ≥6 мг/л, определяющее высокую активность течения заболевания [99]. Количество альбумина в сыворотке – не менее важный критерий оценки течения ММ. Альбумин – транспортный белок крови, который синтезируется гепатоцитами. Было показано, что пониженное содержание альбумина в сыворотке крове наряду с высоким β2м, М-протеином, наличием ПК в периферической крови ассоциировано с плохим прогнозом ММ [100].

Накопление новых данных о роли генетических факторов прогноза и внедрение методов генетического тестирования в рутинную клиническую практику привело к появлению системы стадирования R-ISS. Для стратификации групп риска пациентов по системе R–ISS, наряду с β2м и альбумином, прогностическое значение имеет активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ). ЛДГ – внутриклеточный фермент, который участвует в обратимом превращении лактата в пируват и содержится в большинстве тканей организма. Активность ЛДГ в крови повышается при заболеваниях, сопровождающихся повреждением тканей и разрушением клеток. Уровень, превышающий норму ЛДГ, встречается у больных с агрессивным течением ММ. Высокий уровень ЛДГ ассоциируется с более низкой ОВ [1]. К цитогенетическим нарушениям высокого риска по системе R-ISS относятся хромосомные транслокации t(4;14), t(14;16), и делеция 17p. Далее было показано, что доля клеток CD138+ с делецией del(17p) является значимым прогностическим фактором: опухолевая популяция, содержащая более, чем 55–60% клеток с del(17p) связаны с худшим течением ММ [101]. Гипердиплоидный кариотип и транслокация t(11;14) – факторы стандартного риска [102]. Моносомия хромосомы 13 и делеции ее длинного плеча представляют особый интерес. В многочисленных исследованиях, основанных на кариотипировании [103, 104], они считались неблагоприятными прогностическими факторами. Позднее, однако, стал очевиден потенциальный негативный эффект от других хромосомных перестроек, таких как t(4;14) и del(17p), в том же образце опухоли. Позже, при исследовании влияния только моносомии хромосомы 13 и делеции 13q на ОВ, было показано, что эти изменения вносят отрицательный вклад, но их влияние менее выраженное, чем t(4;14) и del(17p)

[105]. В стратификации риска, разработанной клиникой Майо, делеция 13 хромосомы относится к группе промежуточного риска. В группу высокого риска по стратификации риска клиники Майо, также относятся пациенты, имеющие профиль экспрессии генов (ПЭГ) высокого риска gene expression profile (GEP) [37, 106].

В клинических рекомендациях 2025 года чаще всего используют комбинированную шкалу R2-ISS, где остались такие параметры, как стадия ISS, активность ЛДГ, цитогенетические аномалии del(17p), t(4;14), была исключена транслокация t(14;16) и добавлена амплификация локуса 1q. Каждому параметру присваиваются баллы. По сумме баллов определяется стадия ММ и соответствующая группа риска [3] (Рисунок 1.4).

Четких рекомендаций, основанных на результатах рандомизированных исследований, по терапии пациентов, относящихся к различным группам цитогенетического риска, до настоящего момента не разработано. Продолжаются исследования, направленные на поиск молекулярных маркеров для прогнозирования течения ММ, риска развития раннего рецидива и ответа на специфическую терапию.




Стадирование по Durie-Salmon, 1975

| Стадия | I | II | III |
|---|---|---|---|
| Медиана ОВ, годы | 6,5 | 5 | 2 |
| Кальций, ммоль/л | <2,6 | Показатели средние между I и III | >3 |
| Гемоглобин, г/л | >100 | | <80 |
| Количество очагов деструкции | 0-4 | | >20 |
| Концентрация М-компонента, г/л | <50 | | >70 |

Стадирование по ISS, 2005

| Стадия | I | II* | III |
|---|---|---|---|
| Медиана ОВ, мес | 62 | 44 | 29 |
| β2-микроглобулин, г/л | <3,5 | <3,5 | >5,5 |
| Альбумин | >35 | <35 | |
| *или β2-микроглобулин 3,5 - 5,5 мг/л | | | |

| Вариант хромосомной аберрации | ОВ, годы | Уровень риска |
|---|---|---|
| Трисомии | 7-10 | стандартный |
| t(11;14) (q13;q32) | 7-10 | стандартный |
| t(6;14) (p21;q32) | 7-10 | стандартный |
| t(4;14) (p16;q32) | 5 | промежуточный |
| Gain (1q21) | 5 | промежуточный |
| t(14;16) (q32;q23) | 3 | высокий |
| t(14;20) (q32;q11) | 3 | высокий |
| Del(17p) | 3 | высокий |
| Нормальный кариотип | 7-10 | стандартный |

| Стадия | Факторы прогноза в баллах | Сумма в баллах | 5-летняя ОВ, % | Уровень риска |
|---|---|---|---|---|
| I | ISS II - 1 балл, ISS III - 1,5 балла, del(17p) - 1 балл, высокий уровень ЛДГ - 1 балл, t(4;14) - 1 балл, 1q - 0,5 баллов | 0 | 88 | низкий |
| II | | 0,5-1 | 75 | низкий промежуточный |
| III | | 1,5-2,5 | 56 | высокий промежуточный |
| IV | | 3-5 | 37 | высокий |

Рисунок 1.4 - Стратификация риска ММ. Системы стадирования ММ, использующиеся в клинической практике.

## 1.4. Современные аспекты терапии множественной миеломы

Существует широкий спектр лекарственных препаратов для лечения ММ, в последние годы их количество быстро увеличивается. При выявлении симптоматической ММ могут назначаться кортикостероиды (дексаметазон, преднизолон), цитостатики (циклофосфан, мелфалан), ингибиторы протеасом (бортезомиб), иммуномодуляторы (талидомид, леналидомид, помалидомид), и моноклональные антитела (даратумумаб, изатуксимаб). Также применяются ингибиторы гистондеацетилазы (панобиностат) и таргетная терапия, нацеленная на специфические молекулы опухолевых клеток. Тем не менее, ММ в большинстве случаев остается неизлечимой патологией, и поэтому основная цель лечения заключается в увеличении ОВ [107].

Современные методы лечения ММ основываются на комбинированных схемах лечения [108]. Стандартной схемой лечения первой линии терапии, является назначение таргетных препаратов из группы ингибиторов протеасом и/или иммуномодулирующих препаратов [102]. Одним из таких препаратов является бортезомиб (велкейд). Триплеты, включающие бортезомиб, считаются самыми эффективными [109]. Согласно российским клиническим рекомендациям 2025 года на индукционном этапе лечения пациентам с впервые диагностированной ММ рекомендованы трехкомпонентные схемы с включением бортезомиба, такие как VCD (бортезомиб, циклофосфамид и дексаметазон), RVd (леналидомид, бортезомиб и дексаметазон), PAD (бортезомиб, доксорубицин и дексаметазон). По информации мультицентрового исследования Multispect (806 пациентов из РФ), наиболее частой схемой в первой линии терапии была VCD, а схемы PAD/VCD были наиболее распространнеными комбинациями препаратов для 1 линии терапии пациентов с ММ, которые и сейчас применяются в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ [110]. В последнее время в терапевтической практике стали применяться моноклональные антитела к поверхностым антигенам опухолевых клеток при ММ - к CD38, CD138, SLAMF7. Эти препараты имеют особое значение при лечении пациентов из группы высокого риска, а также рефрактерных форм ММ, в тех случаях, когда применение приоритетных схем лечения не имеет достаточной эффективности [111]. Моноклональное антитело может быть в составе химерного рецептора Т-лимфоцита. Такая технология носит название CAR-T клетки. Суть его заключается в том, что Т-клетки больного трансформируют вектором, кодирующим антитело к поверхностным антигенам опухолевой клетки (CD19, CD38, BCMA) [112].

Взаимодействие CAR-T и опухолевой клеток вызывают гибель опухолевой клетки. CAR-T терапия имеет высокий потенциал в борьбе с прогрессированием ММ, осложненным двойной рефрактерностью [113]. Однако, последствия применения этого препарата пока полностью не изучены и его применение может вызывать токсический эффект, связанный с лавинообразным выбросом цитокинов, который может привести к летальному исходу [114].

Тактика ведения пациентов на этапе индукции для людей моложе 65 лет и пожилых пациентов отличается. Для лечения пациентов с впервые диагностированной ММ моложе 65 лет без серьезной сопутствующей патологии в программу лечения включают высокодозную химиотерапию (ВДХТ) мелфаланом с последующей ауто-ТГСК. Таким пациентам в качестве индукционной терапии рекомендуется применять RVd, VCD или PAD. При недостаточном ответе на индукционную терапию бортезомиб-содержащими режимами (не достигнут по крайней мере частичный ответ после 4−6 циклов) рекомендуется применять 2-ю линию терапии одним из режимов, включающими иммуномодулирующие препараты (Рисунок 1.5).

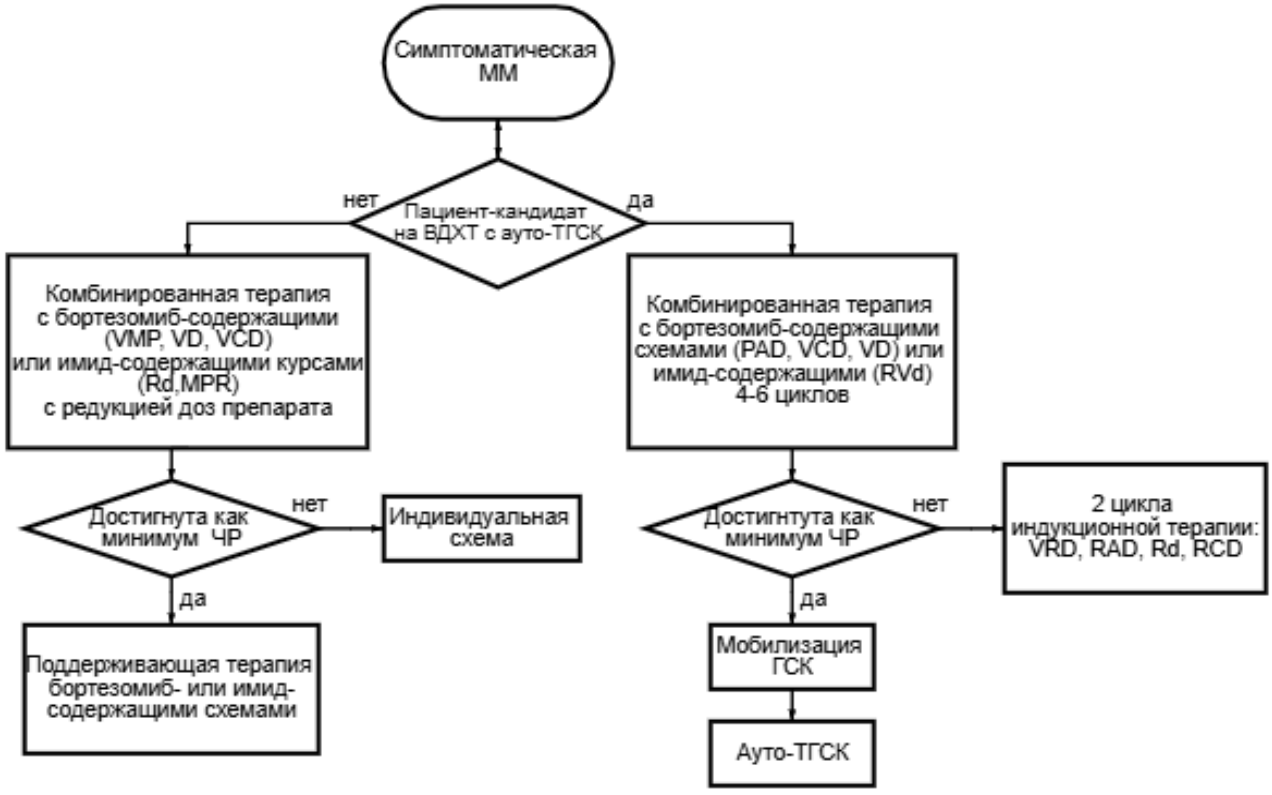



Рисунок 1.5 - Стратегии лечения пациентов с впервые выявленной ММ на этапе индукции согласно клиническим рекомендациям 2025 г.

Пациентам старше 65 лет или молодым лицам с клинически значимыми сопутствующими заболеваниями рекомендованы комбинации с включением бортезомиба – VCD, VMP (бортезомиб, мелфалан, преднизолон) или VD без этапа ВДХТ с ауто-ТГСК. В качестве альтернативной опции, при наличии противопоказаний к применению бортезомиба рекомендуется проведение терапии комбинациями с включением леналидомида - Rd (леналидомид и дексаметазон), MPR (мелфалан, преднизолон и леналидомид) [2].

## 1.5. Ответ на терапию бортезомиб-содержащими схемами у пациентов с множественной миеломой

Эффективность ответа на терапию оценивается на основе международных унифицированных критериев ответа Международной рабочей группы по ММ (IMWG, 2016), которые подразделяются на строгую полную ремиссию (сПР), полную ремиссию (ПР), очень хорошую частичную ремиссию (ОХЧР), частичную ремиссию (ЧР), стабилизацию заболевания (СЗ), прогрессию заболевания (ПЗ). Полные критерии IMWG, 2016 представлены на Рисунке А.1 в приложении. Анализ эффективности наиболее распространенных схем лечения показал, что режимы PAD и VCD позволяют получить глубокий ответ (ПР+ОХЧР) у пациентов с ММ с частотой от 34 до 70% [115, 116, 117]. Обе схемы сопоставимы по эффективности лечения. Однако, использование схемы PAD позволяет за наиболее короткое время достичь высокой частоты достижения общего ответа (ПР+ОХЧР+ЧР) у пациентов с ММ – 84,8% случаев, но сопровождается более выраженной нейро- и кардиотоксичностью. В связи с наличием серьезных побочных эффектов во время получения терапии по схеме PAD, более распространена схема VCD [117]. Схема с применением одновременно ингибитора протеасомы и иммуномодулирующим действием, RVd, становится оптимальной схемой в связи с наибольшей частотой достижения общего ответа (99%) и полного ответа в 42% на 100 день терапии [118]. В другом исследовании, авторы показали, что добавление в схему терапии моноклональное антитело анти-CD38+ позволяет достичь еще более высокой частоты полного ответа (87,9% против 71%) и МОБ-негативности, что увеличивает ВБП у пациентов с ММ [119].

При назначении одной схемы терапии для пациентов из одной категории риска, эффективность терапии не всегда можно прогнозировать. Анализ данных показал, что ответ на

индукционную терапию значительно варьирует среди пациентов одной стадии и группы риска. Так, у пациента, не относящегося к категории высокого риска есть вероятность встретить рефрактерность к терапии. В клиническом исследовании Sonneveld с соавт, проведенном на группе из 413 пациентов с впервые диагностированной ММ, получающих схему терапии PAD – ответ варьировал среди пациентов с одной стадией заболевания. По данным, приведенным в исследовании, пациенты первой стадии ММ по шкале ISS достигли в 41% случаев - ПР, 39% - ОХЧР, 12% -ЧР, менее ЧР -8%. Для пациентов в третьей стадии ММ в 32% случаев получена ПР, в 37% - ОХЧР, 17% -ЧР, менее ЧР - 14% (Рисунок 1.6). Распределение по частоте достижения ответа незначительно различается среди групп с разными стадиями заболевания [13].

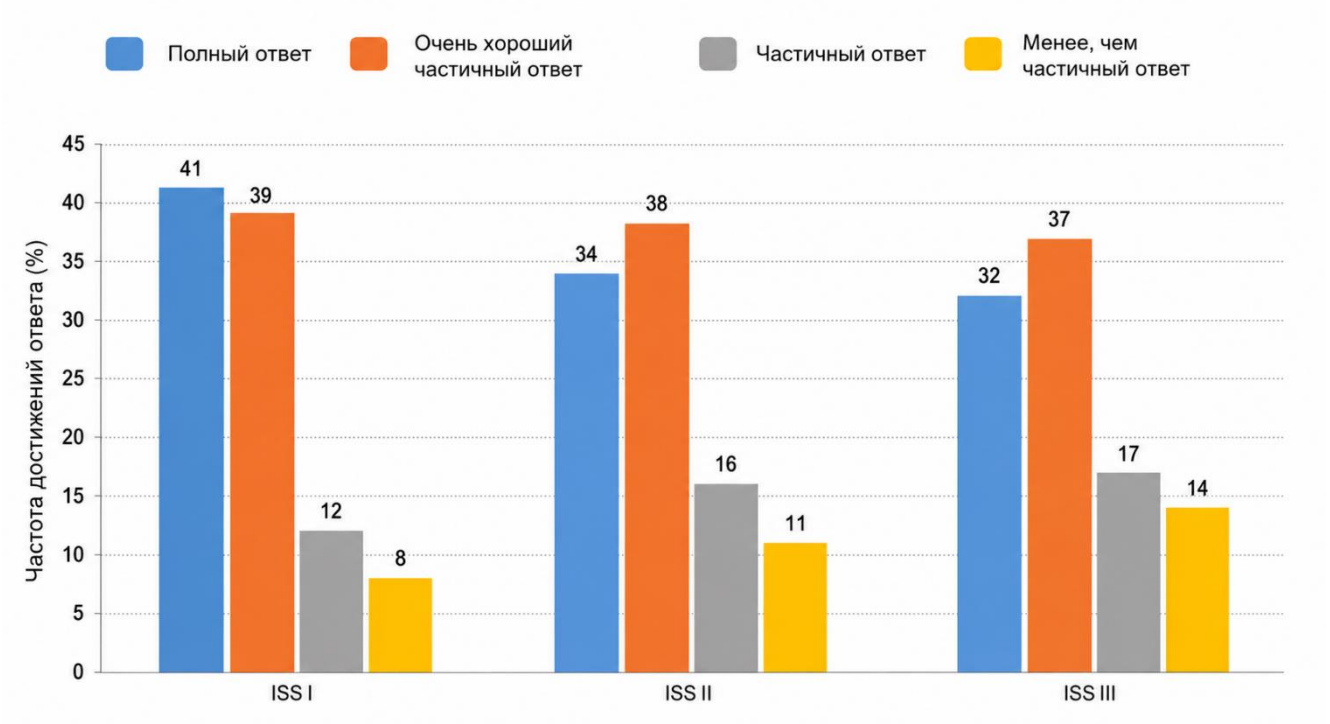



Рисунок 1.6 – Ответ на индукционную терапию бортезомиб-содержащими схемами (PAD) в различных группах риска по клинической шкале ISS. В исследование включены пациенты с впервые диагностированной ММ, кандидаты на ауто-ТГСК, n=413. Данные взяты из исследования Sonneveld et al., 2012, JCO [13].

В исследовании Voorhees с соавт., проведенном на группе из 97 пациентов с впервые диагностированной ММ, получавших схему лечения VRd, меньшая стадия по шкале ISS не коррелировала с высокой частотой достижения строгой ПР (Рисунок 1.7). В группе пациентов с третьей стадией по ISS частота достижения строгой ПР составила 53,8% и была выше, чем у пациентов с первой стадией болезни (22,9%). В цитогенетических группах высокого и

стандартного риска также частота достижения строгой полной ремиссии не отличалась и составила 32,5% и 30,8% соответственно [14].

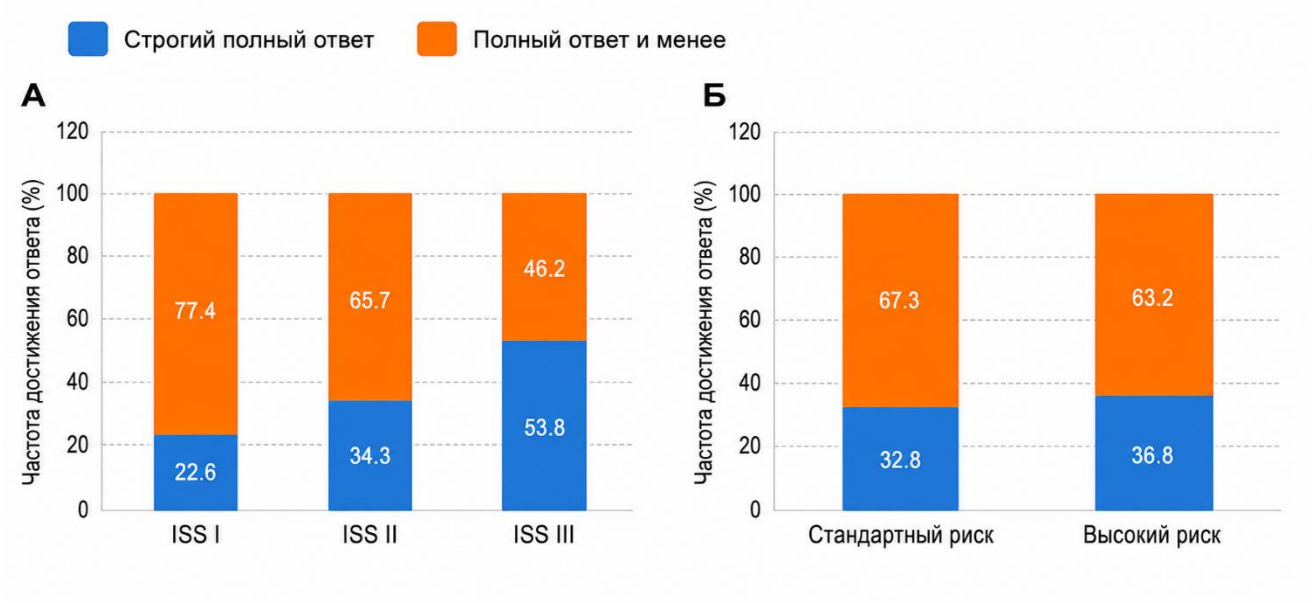



Рисунок 1.7 – Ответ на индукционную терапию бортезомиб-содержащими схемами (VRd) в различных группах риска по клинической шкале ISS (А) и по цитогенетической шкале (Б). В группу высокого риска по цитогенетической шкале вошли пациенты со следующими хромосомными аберрациями: del17p, t(4;14), t(14;16). В исследование включены пациенты с впервые диагностированной ММ, кандидаты на ауто-ТГСК, n=97. Данные взяты из исследования Voorhees et al., 2020, Blood [14].

Таким образом, можно видеть, что у пациентов из одной группы риска наблюдается заметная разница в ответе на одинаковую бортезомиб-содержащую схему лечения. Возможно, причина вариабельности ответа в том, что опухолевая популяция при ММ гетерогенна на молекулярном уровне, представляет собой сочетание субклонов, с крупными хромосомными аберрациями и мутациями (в генах *TP53, RAS, BRAF* и т.д.) с различным уровнем мутационной нагрузки. Эти особенности не учитываются в современной стратификации риска. Кроме того, уровни экспрессии, метаболические профили и эпигенетические модификации генов изменяют чувствительность к лекарственным препаратам. Современная система стадирования нуждается во введении дополнительных маркеров, имеющих значение для прогноза резистентности к той или иной схеме терапии.

## 1.6. Анализ молекулярных нарушений в опухолевых клетках при множественной миеломе

### 1.6.1. Хромосомные перестройки

Хромосомные перестройки обнаруживаются в опухолевых клетках у пациентов с ММ с частотой 30% при использовании традиционных методов исследования кариотипа, в то время как при использовании интерфазного FISH-исследования более, чем в 90% случаев [51]. Для ММ характерны как числовые цитогенетические аномалии (трисомии нечетных хромосом), которые встречаются в 50% случаев, так и структурные (полные или частичные хромосомные делеции и вставки, а также хромосомные транслокации) в другой половине случаев [120].

Первичные хромосомные транслокации с участием генов *IGH* затрагивают семь онкогенов: *CCND1* на 11q13 (участвует в 16% случаев); *NSD2*, часто с *FGFR3*, на 4p16 (у 15%); *MAF* на 16q23 (у 5%); *CCND3* на 6p21 (у 3%); *MAFB* на 20q11 (у 3%); *MAFA* на 8q24 (у <1%); и *CCND2* на 12p13 (у <1%) (Приложение.Таблица А.1). Чуть более 90% этих транслокаций затрагивают гены *IGH* на участке хромосомы 14q32; остальные затрагивают в основном локусы генов легкой цепи иммуноглобулина, чаще ген лямбда на 22q11.2 и редко - каппа на 2p11.2 или другие локусы, такие как *TENT5C* (FAM*46C*) или *CXCR4*. Гипердиплоидные подтипы ММ редко имеют одну из семи реккурентных транслокаций IGH, перечисленных выше [102].

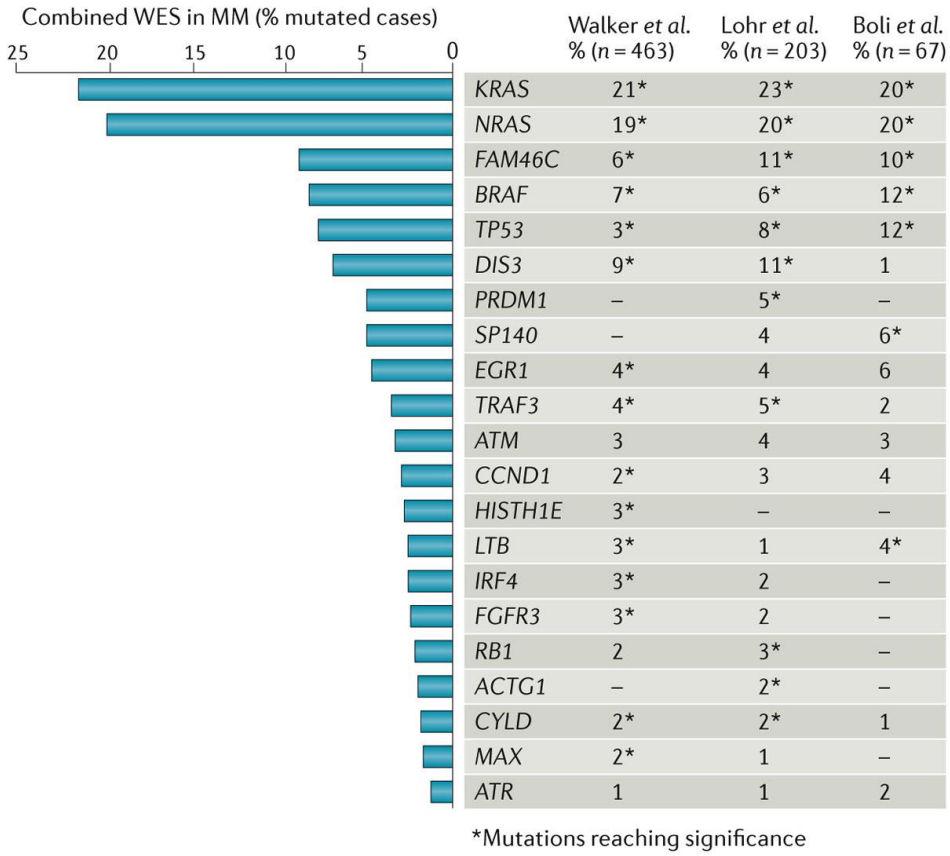
Часто встречающаяся транслокация t(4;14) ведет к дерегуляции двух потенциальных онкогенов, рецептора фактора роста фибробластов 3 (FGFR3) и белка ММ домена SET (MMSET). ММ с транслокацией t(4;14) имеет характерный профиль экспрессии генов и клинический статус с худшим ответом на терапию, устойчивостью к алкилирующим агентам, плохим прогнозом ОВ по сравнению с группой пациентов с другими транслокациями [121]. Транслокации t(14;16) и t(14;20) являются редкими хромосомными аберрациями при ММ. С точки зрения прогноза данные транслокации связаны с неблагоприятным исходом ММ [122]. Пациенты с наиболее частой транслокацией t(11;14) имеют особый фенотип. Эта транслокация приводит к увеличению экспрессии гена циклина D1, высоким уровнем экспрессии CD20 и низкой экспрессией маркера CD56. Прогностическое значение транслокации t(11;14) остается предметом дискуссий, поскольку в разных исследованиях ее роль описывается как нейтральная или как фактор благоприятного прогноза [123].

Вторичные цитогенетические аномалии, часто встречающиеся при ММ, включают делецию или моносомию хромосомы 17p (где расположен ген опухолевого супрессора TP53) в 10% случаев, увеличение числа копий 1q, присутствующее приблизительно у 40% пациентов; делецию 1p, обнаруживаемую примерно в 20% случаев. Для ММ характерна делеция хромосомы 13q (или моносомия 13), выявляемая с частотой около 50% случаев. Кроме того, транслокации локуса *MYC* также встречается примерно в 12% случаев ММ [102].

Пациенты с делецией 17p в опухолевых клетках имеют отдельный клинический фенотип с часто экстрамедуллярными образованиями и агрессивное течение заболевания, короткую ремиссию и меньшую ОВ [124]. Нарушения в обоих плечах 1 хромосомы, коротком и длинном, ассоциированы со сниженной выживаемостью. Таких пациентов можно выявить по профилю экспрессии генов, ассоциированному с высоким риском [125, 126]. Прогностическое значение делеции хромосомы 13 более спорно. Опубликованы работы, где показана строгая прогностическая значимость [127, 128], в то время как другие исследования демонстрируют небольшой эффект этой аберрации [129]. Результаты в значительной мере зависят от метода исследования. Часть пациентов с делецией хромосомы 13 единовременно могут быть носителями транслокации t(4;14), делеции 17p и др., этот эффект от другой прогностически значимой перестройки может быть причиной некоторых различий в результатах опубликованных исследований [25]. Наличие транслокации *MYC* в опухолевых клетках больных ММ ассоциировано с прогрессией ММ [130].

### 1.6.2. Точечные мутации

Для ММ характерны мутации в драйверных генах, влияющих на клеточные сигнальные пути [12, 23, 131]. Они затрагивают изменения в пути RAS/ERK (*KRAS, NRAS, FGFR3* и *BRAF*), активируют путь NF-κB (*TRAF3, TRAF2, BIRC2, BIRC3, CYLD, MAP3K14*), путь репарации ДНК (делеция 17p, *TP53* и *ATM* SNV) и другие сигнальные каскады, участвующие в регуляции клеточного цикла, выживаемости, экспрессии генов (*DIS3, FAM46C, PRDM1, SP140, RB1, EGR1*) (Рисунок 1.8) [120]. Точечные мутации, скорее всего, являются вторичными или поздними событиями, поскольку они нечасто наблюдаются при МГНГ и тлеющей миеломе [132, 133]. В данной работе подробно изучаются эффекты мутаций *NRAS/KRAS*, которые будут изложены в следующем разделе.




| | Walker *et al.* % (*n* = 463) | Lohr *et al.* % (*n* = 203) | Boli *et al.* % (*n* = 67) |
|---|---|---|---|
| *KRAS* | 21* | 23* | 20* |
| *NRAS* | 19* | 20* | 20* |
| *FAM46C* | 6* | 11* | 10* |
| *BRAF* | 7* | 6* | 12* |
| *TP53* | 3* | 8* | 12* |
| *DIS3* | 9* | 11* | 1 |
| *PRDM1* | – | 5* | – |
| *SP140* | – | 4 | 6* |
| *EGR1* | 4* | 4 | 6 |
| *TRAF3* | 4* | 5* | 2 |
| *ATM* | 3 | 4 | 3 |
| *CCND1* | 2* | 3 | 4 |
| *HISTH1E* | 3* | – | – |
| *LTB* | 3* | 1 | 4* |
| *IRF4* | 3* | 2 | – |
| *FGFR3* | 3* | 2 | – |
| *RB1* | 2 | 3* | – |
| *ACTG1* | – | 2* | – |
| *CYLD* | 2* | 2* | 1 |
| *MAX* | 2* | 1 | – |
| *ATR* | 1 | 1 | 2 |

*Mutations reaching significance

Рисунок 1.8 – Наиболее частые соматические мутации у пациентов с ММ. Рисунок взят из статьи Manier et al., Nat Rev Clin Oncol, 2017 [120].

### 1.6.3. Субклональная гетерогенность

Недавние исследования показывают, что ММ характеризуется сложным мутационным ландшафтом и субклональной генетической гетерогенностью [95, 132, 134, 135]. Считается, что прогрессирование заболевания может быть связано с конкуренцией между субклонами и размножением наиболее приспособленных из них. В геномном исследовании были проанализированы парные образцы МГНГ-ММ или тлеющей миеломы-ММ, полученные от одних и тех же пациентов на обеих стадиях МГНГ и тлеющей ММ и впоследствии, когда у них развилась симптоматическая ММ (Рисунок 1.9). С помощью полноэкзомного секвенирования было получено детальное описание геномной сложности и субклональной эволюции, лежащей в основе прогрессирования от МГНГ/тлеющей миеломы к ММ. Было показано, что уже МГНГ характеризуется наличием субклонов, которые в процессе эволюции заболевания изменяются в

размерах, и могут характеризоваться появлением новых мутаций. Авторы обнаружили, что, несмотря на накопление генетических мутаций в процессе прогрессирования заболевания, доминирующий клон, присутствующий на ранних стадиях (МГНГ/тлеющая миелома), обычно сохраняется и в дальнейшем. То есть, субклональная эволюция в основном характеризуется стабильностью основного клона, а не полным замещением новыми клонами. Хотя новые субклоны могут появляться и исчезать, оригинальный клон сохраняет доминирующее положение. Это указывает на то, что ранние генетические события, определяющие основной клон, имеют решающее значение для развития ММ, а прогрессирование заболевания характеризуется не только с конкуренцией и замещением клонов, но в большей степени связано с дальнейшей эволюцией внутри доминирующего клона [134, 135] .

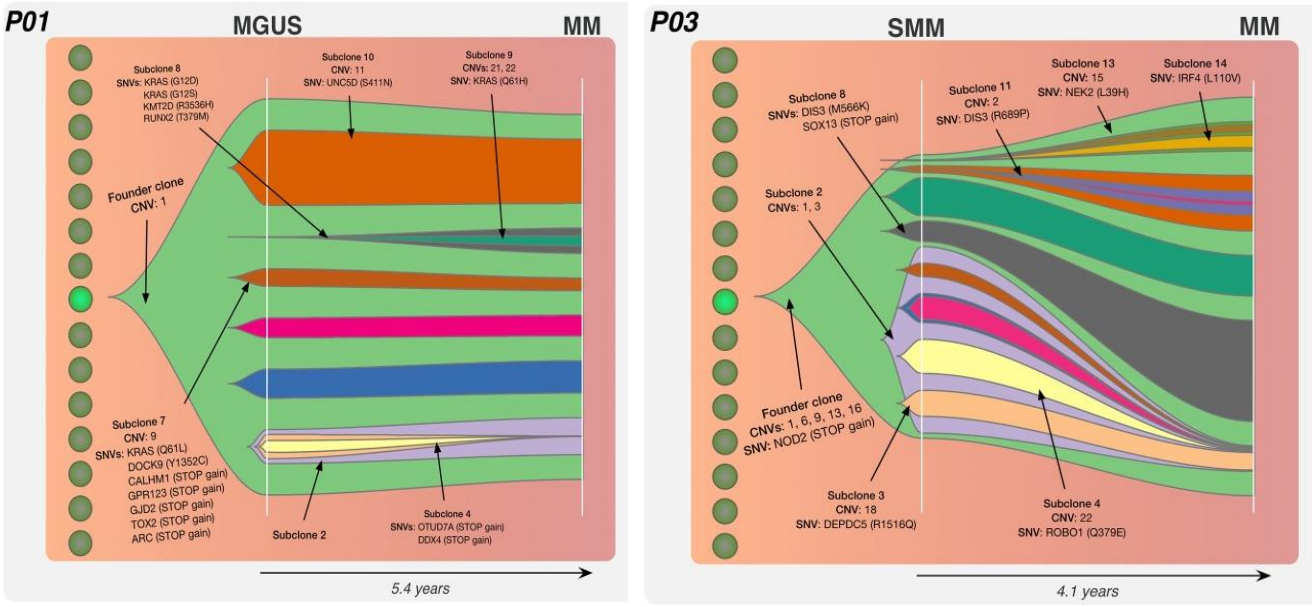



Рисунок 1.9 – Исследование субклональной эволюции на примерах двух пациентов МГНГ/ММ (PO1) и тлеющей миеломы/ММ (PO3). Рисунок взят из статьи Dutta et al., Leukemia, 2017 [134].

## 1.7. Мутации генов *KRAS* и *NRAS* в опухолевых клетках при множественной миеломе

### 1.7.1. Изоформы белков RAS, функциональная значимость и частота встречаемости мутаций в генах *NRAS* и *KRAS*

Мутации в генах семейства *RAS (NRAS* и *KRAS)* являются активирующими миссенс-заменами, которые влияют на свойства соответствующих белков. Мутированные белки RAS теряют ГТФ-азную активность, вследствие чего нарушается их нормальная регуляция цитокинами в передаче митоген-активирующего сигнала к ядру, что приводит к повышенной пролиферации клеток [136]. Несмотря на высокое сходство между белками KRAS и NRAS, для некоторых вариантах злокачественных опухолей характерна либо мутации в гене *NRAS*, либо – в *KRAS* [137, 138, 139]. Таким образом, несмотря на схожесть функций, мутации в генах *NRAS* и *KRAS* в большинстве случаев тканеспецифичны. Для ММ характерно наличие мутаций как в гене *KRAS,* так и в гене *NRAS.* В подавляющем большинстве случаев это взаимоисключающие мутации. Редкие случаи обнаружения одновременно двух мутации могут быть следствием субклональной гетерогенности опухоли, то есть наличия сразу двух субклонов в опухолевой популяции с разными мутациями в генах семейства *RAS* [12, 23, 26, 30, 120, 140].

Механизмы действия мутаций в генах *NRAS/KRAS* на клеточном уровне достаточно кропотливо изучались. Показано, что клеточные линии ММ, содержащие аминокислотные замены в 12 кодоне генов *KRAS* или *NRAS,* характеризуются стабильно высоким уровнем экспрессии соответствующего белка KRAS или NRAS и устойчивы к апоптозу, индуцированному доксорубицином [16]. Из литературных данных известно, что в результате появления мутации Gln61Arg в гене *NRAS* в клеточной линии ANBL6 повышается пролифера¬тивная активность клеток одновременно с супрессией апоптоза [17]. В исследованиях на мышах, которым вводили генно-инженерными методами ДНК-вектор, содержащий мутацию Gly12Asp в гене *KRAS*, показано, что животные умирали в возрасте 4 мес. от тяжелых миелопролиферативных расстройств. У мышей с мутацией Gly12Asp в гене *NRAS* к 6 мес. отмечается лимфопролиферация, выражающаяся в повышенном числе лимфоцитов в крови, периваскулярной инфильтрации лимфоцитами печени и легких, и только к возрасту 15 мес. развиваются различные фатальные гематологические опухоли как лимфоидной, так и миелоидной природы [19, 141]. Одновременная экспрессия белка NRAS с мутацией Gln61Arg и

белка Myc приводила к развитию агрессивной ММ у мышей, которая характеризовалась инфильтрацией костного мозга ПК, наличием моноклонального иммуноглобулина в сыворотке, анемии и тромбоцитопении [18] Таким образом, онкогенный потенциал мутаций в генах *NRAS/KRAS* был доказан в целой серии работ.

В исследованиях, посвященных изучению мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у пациентов с впервые диагностированной ММ, выявлена взаимосвязь мутаций генов семейства *RAS* с повышенным содержанием ПК в костном мозге, β2-микроглобулином в крови, остеолитическими повреждениями [58]. Геномные исследования больших когорт пациентов с МГНГ, тлеющей миеломы и ММ привели к изучению роли часто повторяющихся мутаций, из которых *KRAS* и *NRAS* оказались драйверами трансформации ММ [24, 120, 140]. Опубликованные данные указывают на увеличение частоты соматических мутаций в генах семейства *RAS* у пациентов с ММ по сравнению с больными МГНГ [142]. Плазмоклеточный лейкоз характеризуется повышенной частотой мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* по сравнению с ММ [143]. Несмотря на это, мутации в генах *KRAS* и *NRAS* не входят в прогностическую шкалу риска для ММ.

В опубликованных работах частота обнаружения мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у пациентов с впервые диагностированной ММ значительно варьирует и составляет от 6 до 52%. Анализ опубликованных данных показывает, что частота выявления мутаций генов *KRAS* и *NRAS* существенно зависит от метода выделения клеток, технологии детекции мутации и размера выборки больных (Таблица 1.1). Наиболее стабильные и сопоставимые результаты получены в исследованиях с крупными когортами (824–1933 пациентов): *KRAS* 24,3-28,4%, *NRAS* 20,1-23,3% [22, 25]. Средние выборки (200–300 пациентов) показывают значения того же порядка: *KRAS* 25%, *NRAS* 15% [26], в то время как малые выборки (30–60 пациентов) дают более широкий разброс и меньшую воспроизводимость: *KRAS* 18,6%, *NRAS* 12,9% [21]; 6-27% (оба гена) [20, 144]. При сопоставлении методик выделения клеток оказалось, что использовании CD138+ магнитной селекции (выделение опухолевых клеток) позволяет получить наиболее стабильные результаты: для гена *KRAS* ~24–28%, для гена *NRAS* ~15–23% [22, 25, 26]. Так, высокий уровень содержания опухолевых клеток уменьшает «размывание» мутационного сигнала от клеток без мутаций. Детекция мутаций в мононуклеарах костного мозга обладает более низкой чувствительностью: *KRAS* 18,6%, *NRAS* 12,9% [33]; 27% (по обоим генам) [20] и большим разбросом значений, так как результаты зависят от доли опухолевых ПК в образце. Сортировка клеток с использованием сложных панелей (CD19–, CD45–, CD38+, CD56+) позволяет получить

более чистую популяцию, но метод не стандартизованный и не обладает достаточной универсальностью (есть различные иммунофенотипические панели для выявления опухолевой популяции клеток при ММ) [24]. Методологический подход исследования последовательности гена также влияет на точность выявления нуклеотидных замен. Наиболее современный метод - высокопроизводительное секвенирование нового поколения (ВПС) позволяет обнаружить большее количество мутаций (в гене *KRAS* от 24% до 28%, в гене *NRAS* от 15% до 23%). Секвенирование по Сэнгеру характеризуется более низким порогом чувствительности (частота выявления мутаций для гена *KRAS* составляет 18,6%, для гена *NRAS* - 12,9%), аллель-специфичная ПЦР (АС-ПЦР) является очень чувствительной методикой, но ориентирована только на определенные виды нуклеотидных замен, что дает заниженную оценку встречаемости мутаций в опухоли. Более старые методики детекции мутаций, такие методы конформационного анализа (SSCP) и аллель-специфическая гибридизация с олигонуклеотидами показали себя как менее чувствительные.

В геномных исследованиях опухолевых клеток ММ было обнаружено, что мутации в генах *KRAS* и *NRAS* имеют субклональный характер [135]. С субклональностью связаны опередеенные сложности детекции мутаций в генах *KRAS* и *NRAS*: в том случае, если мутация присутсвует в небольшом количестве клеток клона, она может быть обнаружена только высокочувствительными методами детекции, такими как ВПС.

Таблица 1.1 – Частота выявления мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* в исследованиях опухолевых клеток пациентов с ММ.

| Публикация | Выборка (первичные пациенты) | Методы выделения клеток (КМ или CD138+) | Метод обнаружения мутаций | Частота мутаций |
|---|---|---|---|---|
| Maura, 2024 | 1933 | Разные (UAMS, CoMMpass, MGP) | ВПС | *KRAS* (24,3%), *NRAS* (20,1%) |
| Sudha, 2022 | 233 | Магнитная селекция КМ $CD138^{+}$ | ВПС | *KRAS* (25%), *NRAS* (15%) |
| Hoang, 2019 | 824 | Магнитная селекция КМ $CD138^{+}$ | ВПС | *KRAS* - 28,4%, *NRAS* -23,3% |
| Gebauer, 2015 | 60 | Мононуклеары КМ | Секвенирование по Сэнгеру | *KRAS* - 18,6%, *NRAS* -12,9% |

Продолжение Таблицы 1.1

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Rasmussen, 2005 | 58 | Сортированные клетки КМ CD19+CD45+CD38+CD56+ | АС-ПЦР | 31% (61*NRAS*, 12*KRAS*) |
| Ng, 2003 | 31 | КМ, CD138+(10), мононуклеары (21) | SSCP-анализ | 6% (61*NRAS*, 12*KRAS*) |
| Neri, 1989 | 43 | Мононуклеары КМ | Гибридизация с олигонуклеотидными зондами | 27% (61*NRAS*, 12*KRAS*) |

Таким образом, наиболее надёжные и сопоставимые данные получены в исследованиях с большими выборками и использованием ВПС, где частота мутаций *KRAS* и *NRAS* у пациентов с ММ стабильно находится в диапазоне 40–52%. Использование чистых опухолевых популяций плазматических клеток ($CD138^+$) обеспечивает более надёжное выявление мутаций по сравнению с анализом мононуклеаров костного мозга. Сильный разброс частоты выявление мутаций в генах *NRAS/KRAS* в ранних работах предположительно связан с малой выборкой пациентов и техническими ограничениями используемых методов.

### 1.7.2. Прогностическое значение мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* в опухолевых клетках у пациентов с множественной миеломой

Прогностическая значимость мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* при ММ оценивалась в серии работ, однако окончательных решений по этому вопросу к настоящему времени не существует [32–40]. Имеющиеся в литературе сведения о роли активирующих мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* в патогенезе ММ неоднозначны (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Влияние мутаций *KRAS/NRAS* в опухолевых клетках на прогноз ММ, рассматриваемое с учетом гетерогенности групп пациентов и терапевтических стратегий.

| **Статья** | **Количество пациентов** | **Тип пациентов** | **Терапия** | **Эффект мутации в генах семейства *RAS*** |
|---|---|---|---|---|
| Maura, 2024 | 1544 | первичные | Различные схемы с использованием бортезомиба, иммуномодуляторов, даратумумаба | Нейтральный: в составе прогностической панели, включающей 20 геномных детерминант течения заболевания, мутации в генах *KRAS/NRAS* не представлены |
| Perroud, 2023 | 78 | первичные | Бортезомиб, ревлимид, дексаметазон | Негативный: мутации *RAS* влияют на ответ ПР, ВБП, ОВ |
| Li, 2023 | 147 | первичные и рецидив/рефрактерные | Ингибиторы протеасомы и/или иммуномодуляторы | Негативный: мутации RAS/BRAF влияют на ответ ВБП, ОВ |
| Walker, 2019 | 783 | первичные | Бортезомиб и иммуномодуляторы | Нейтральный: мутации в генах *KRAS/NRAS* не относятся к установленным молекулярным предикторам исхода заболевания |
| Laganà, 2017 | 450 | первичные | Бортезомиб и иммуномодуляторы | Нейтральный: мутации *KRAS/NRAS* не входят в клинический модуль, ассоциированный с плохим прогнозом |
| Walker, 2015 | 463 | первичные | Бортезомиб и иммуномодуляторы | нейтральный |
| Mulligan, 2014 | 133 | пациенты в рецидиве | Бортезомиб | Негативный: *NRAS* влияет на ответ ПР и ВБП |

Продолжение Таблицы 1.2

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Chng, 2008 | 439 | первичные | Винкристин, кармустин, мелфалан, циклофосфамид, преднизолон | Негативный: *RAS* влияют на ВБП, ОВ. Мутации *KRAS*-бОльшее влияние |
| Liu,1996 | 346 | первичные | Винкристин, кармустин, мелфалан, циклофосфамид, преднизолон | Негативный: мутации *KRAS* влияют на ОВ |

В ряде работ мутации *RAS* не были ассоциированы с плохим прогнозом заболевания. [25, 131, 145]. В исследовании Laganà и соавт. определено 12 клинически важных модулей для ММ, среди которых только один, М9, ассоциирован с плохими исходами заболевания. Мутации в генах семейства *RAS* не вошли в состав этого прогностически неблагоприятного модуля. В этой работе выявлена ассоциация мутаций в гене *NRAS* с гипердиплоидным подтипом ММ, пациенты с данным генетическим профилем относятся к прогностически благоприятной группе [47]. В исследовании F. Maura и соавт. была разработана прогностическая модель, включающая 20 генетических признаков, ассоциированных с первичной рефрактерностью ММ и развитием ранних рецидивов заболевания [25]. В составе этой прогностической панели мутации в генах *KRAS/NRAS* не представлены. В этих исследованиях использовались комбинированные схемы лечения —с бортезомибом, иммуномодулирующими препаратами и анти-CD38 терапией (Даратумаб). Эти режимы обладают высокой эффективностью и, вероятно, нивелируют потенциально негативное влияние *RAS*-мутаций. В работе Walker и соавт. были установлены такие молекулярные и клинические предикторы исхода заболевания как возраст, стадия ISS, цитогенетические аберрации, мутации TP53 и др. Мутации в генах *KRAS/NRAS* не были отнесены к молекулярным предикторам исхода заболевания [145]. Нужно отметить, что в этих исследованиях были объединены разнородные выборки, отличающиеся по соматическому статусу пациентов, стадии заболевания, группе риска, возможности проведения трансплантации и т.д.

В других исследованиях мутации *RAS* демонстрировали негативный прогностический эффект, снижая вероятность ответа на терапию, ухудшая ВБП и ОВ [27, 29, 32, 58, 68]. Это особенно выражено в меньших выборках или у пациентов с рецидивом/рефрактерным течением,

где опухоль более агрессивна и влияние мутаций становится заметнее на фоне ослабленного иммунитета организма. На образцах аспиратов костного мозга пациентов с рецидивами ММ было показано, что мутация в гене *NRAS*, понижает чувствительность опухолевых клеток к бортезомибу [34]. В работе Y. Kim и соавт, выявлено, что наличие мутаций в указанных генах коррелирует с комплексным кариотипом и более коротким периодом ВБП [40]. В некоторых работах отмечено, что различия в ОВ и ВБП обусловлены в основном мутациями в гене *KRAS*, то есть *KRAS* имеет более выраженный негативный эффект, чем *NRAS* [37].

На основании представленных данных можно заключить, что прогностическая значимость мутаций RAS у пациентов с ММ вариабельна и зависит от схемы терапии и характеристик выборки. Современные бортезомиб-содержащие схемы лечения, особенно многокомпонентные с применением имид-препаратов и анти-CD38 антител, часто нивелируют эффект мутаций, что приводит к нейтральным результатам в крупных когортах. В условиях рецидива или при использовании менее эффективных терапевтических стратегий мутации в генах семейства *RAS* (особенно в гене *KRAS*) ассоциируются с неблагоприятным прогнозом.

### 1.7.3. Ассоциация мутаций в генах *KRAS/NRAS* с другими генетическими аберрациями.

Исследование на обширной выборке пациентов (более 1400 первичных больных с ММ), посвященное комплексному изучению спектра генетических нарушений, показало, что мутации в генах *NRAS/KRAS* представлены в различных цитогенетических подгруппах ММ. Наличие мутаций в генах *NRAS/KRAS* не ассоциировано с хромосомными перестройками из группы высокого риска (Рисунок 1.10).

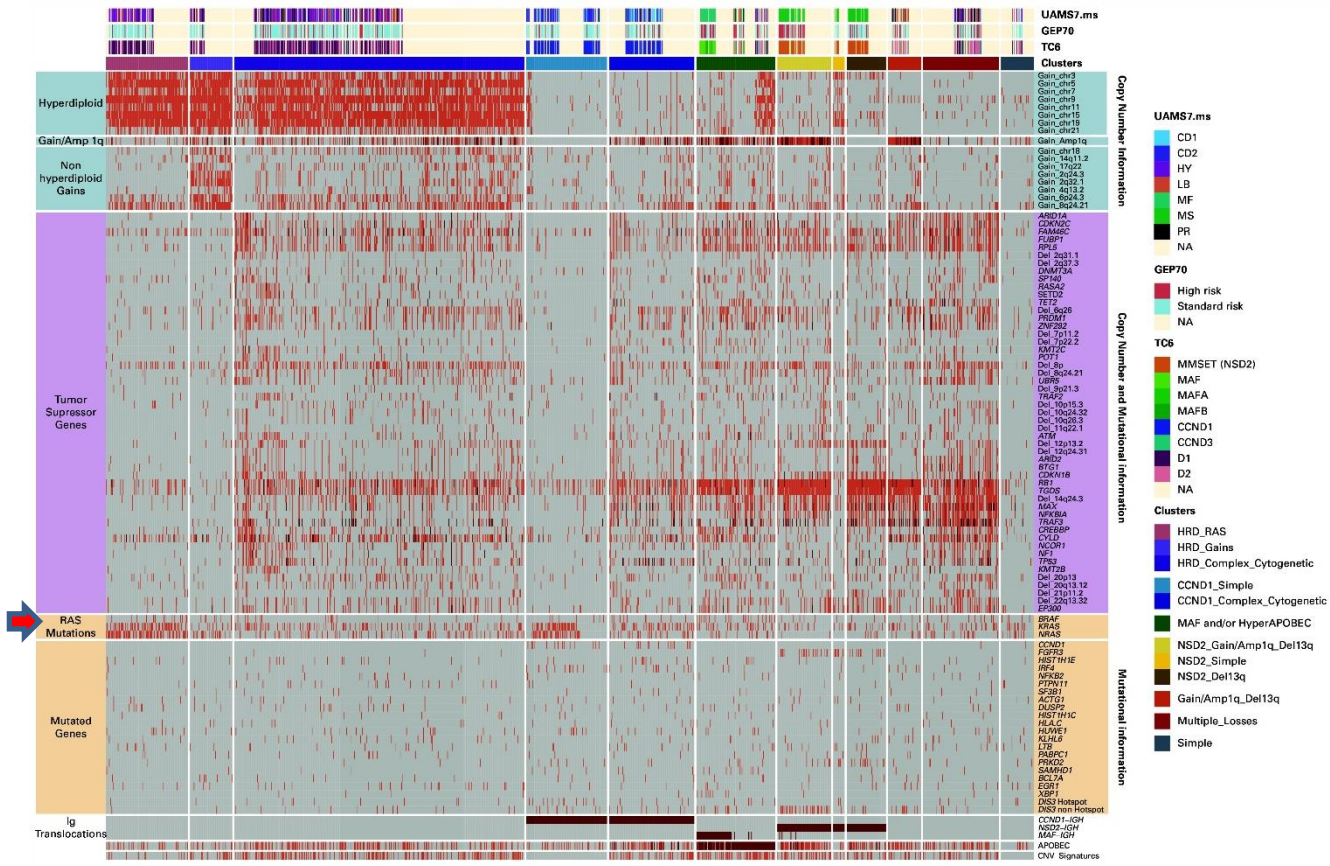



Рисунок 1.10 – Геномная классификация ММ. Красной стрелкой указаны мутации в генах семейства *RAS*. Рисунок взят из статьи Maura et al., Journal of Clinical Oncology, 2024 [25].

## 1.8. Профиль экспрессии генов в опухолевых клетках при множественной миеломе

Изучение экспрессии генов в ПК костного мозга доноров и пациентов с ММ позволило выделить профиль экспрессии генов (ПЭГ) опухолевых клеток, который существенно отличается от ПЭГ нормальных плазматических клеток [146]. Дальнейший анализ выявил значительную гетерогенность среди образцов ММ, что позволило создать молекулярную классификацию заболевания, основанную на ПЭГ (Рисунок 1.11) [9]. В работах по молекулярной классификации на основании кластеров, сформированных специфическими ПЭГ были выделены 7-10 подтипов заболевания, которые оказались ассоциированы с характерными для ММ хромосомными аберрациями с вовлечением генов *c-MAF* и *MAFB, CCND1* и *CCND3*, и *MMSET*, а также с

гиперплоидией (Рисунок 1.11). Общие транскриптомные сигнатуры наблюдались в случаях с активацией *c-MAF* и *MAFB* (кластер MF), и активацией *CCND1* и *CCND3*. Отдельный кластер сформировала группа пациентов с меньшими остеолитическими повреждениями. В подгруппе PR (от англ. "**pr**oliferation") была выявлена повышенная экспрессия многочисленных генов, связанных с клеточным циклом и пролиферацией (например, *CCNB2, CCNB1, MCM2, CDCA2, BUB1, CDC2, TYMS*), а также генов раково-тестикулярные антигенов (например, *MAGEA6, MAGEA3, GAGE1, GAGE4*). Подгруппа MMSET (MS) отличалась значительным увеличением уровня экспрессии генов, картированных на хромосоме 1q, а пациенты обеих групп (PR и MS) характеризовались плохим прогнозом по сравнению с другими когортами [9, 11].

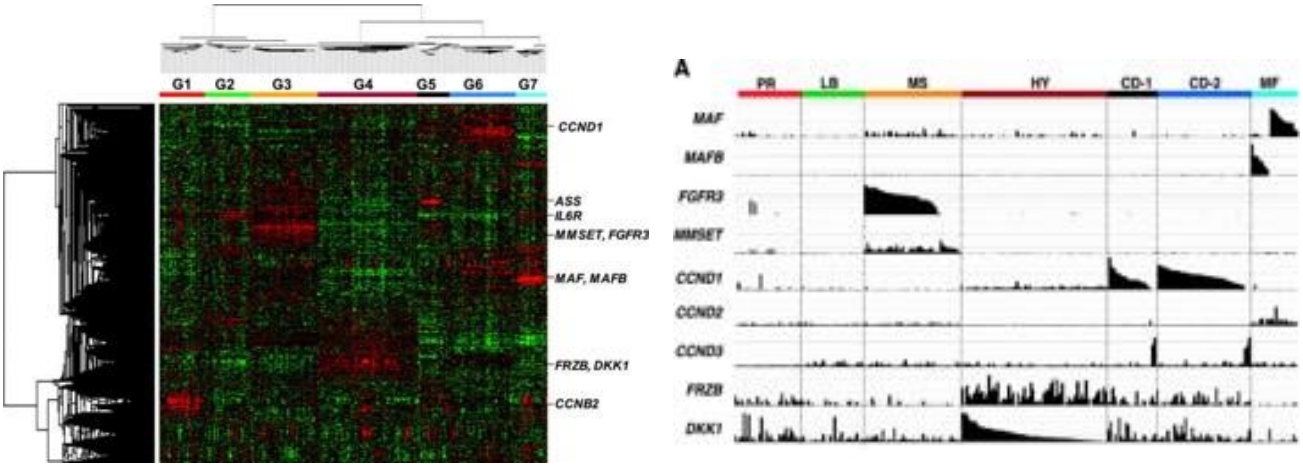



Рисунок 1.11 – Профили экспрессии генов пациентов с ММ формируют кластеры G1-G7 (слева), которые соответствуют подтипам ММ, выделенным на основании выявленной хромосомной перестройки (справа). Рисунок взят из статьи Zhan et al., Blood, 2006 [9].

В результате анализа профилей экспрессии генов была составлена еще одна молекулярная классификация ММ – TC (**T**ranslocation **C**yclin), в основу которой вошли транслокации и особенности экспрессии циклинов [7]. Согласно классификации TC, ММ разделена на 8 подгрупп, каждая из которых обладает своим профилем экспрессии генов. Критерием данной классификации служит уровень экспрессии циклинов D1, D2 или D3, и онкогенов, участвующих в одной из пяти повторяющихся транслокаций *IgH*: 11q13 (*CCND1*); 6p21 (*CCND3*); 4p16 (*MMSET* и обычно *FGFR3*); 16q23 (c-*MAF*); и 20q11 (*MAFB*). Эти группы можно различить по наличию транслокации *IgH* и экспрессии циклина D: опухоли с перестройками в локусах 11q13 (16%) и 6p21 (3%) экспрессируют высокие уровни либо циклина D1, либо циклина D3 в результате транслокации *IgH*. Опухоли D1 (34%) экспрессируют низкие или умеренные уровни циклина D1,

несмотря на отсутствие транслокации t(11;14); D1+D2 (6%) дополнительно экспрессируют циклин D2. Молекулярная подгруппа D2 (17%) представляют собой смесь опухолей, которые не попадают ни в одну из других групп и экспрессируют циклин D2; Одна группа (1%) не экспрессирует циклины D-типа. Подгруппа 4p16 (15%) экспрессируют высокие уровни циклина D2, а также *MMSET* (и в большинстве случаев *FGFR3*) в результате транслокации t(4;14); опухоли MAF (7%) экспрессируют самые высокие уровни циклина D2, а также высокие уровни либо c-MAF, либо MAFB, что согласуется с возможностью того, что оба фактора транскрипции maf повышают экспрессию циклина D2. Хотя это не установлено однозначно, есть предположение, что основой для отнесения опухолей к группам ТС являются, прежде всего, очень ранние, если не инициирующие, онкогенные события, которые являются общими для МГНГ и ММ, хотя группа D1+D2 может представлять собой исключение [7,8].

В одном из последних опубликованных исследований был проведен анализ ПЭГ для различных молекулярных подтипов ММ методом секвенирования отдельных клеток [147]. Результаты работы показали, что опухолевую популяцию клеток при ММ можно разделить на две специфические ветви в соответствии с ПЭГ. Некоторые из этих генов, *NDUFB8, NDUFA6, COX6C, COX5B* и *USMG5* являются потенциальными биомаркерами, ассоциированными с худшим прогнозом ММ. Авторы предполагают, что активность этих генов может влиять на иммунное микроокружение клеток ММ, а также на эффективность терапии и течение ММ [147]. С помощью сопоставления двух методик, РНК-секвенирования и анализа активности отдельных локусов ДНК (ATAC-секвенирование) было обнаружено, что повышенная доступность определенных участков хроматина в сочетании с определенным ПЭГ в опухолевых клетках позволяет выделить такие же генетические подгруппы, которые были определены ранее на основании рекуррентных транслокаций [8]. Согласно этой работе, генетические подгруппы определяет активность определенных энхансеров. Такие энхансеры осуществляют рекрутирование транскрипционных факторов, которые, хотя и не являются транскрипционно дерегулированными сами по себе, организуют аберрантные пути регуляции генов.

Можно заключить, что изучение ПЭГ и эпигенетических изменений в опухолевых клетках при ММ позволило значительно расширить понимание механизмов гетерогенности ММ на молекулярном уровне. Данные исследования представляет значительный интерес для клинической практики, так как отдельные транскриптомные подтипы ММ ассоциированы с клинико-биологическими характеристиками заболевания и прогнозом выживаемости пациентов [7, 28, 106, 148, 149, 150, 151].

Одновременно с молекулярной классификацией ММ, разрабатывались различные прогностические модели, основанные на профилях экспрессии генов, такие как HOVON-65/GMMG-HD4 (92 гена), IFM (15 генов), RS (19 генов), UAMS (70 генов) и их модификации (например, сокращенная версия UAMS70 из 17 генов) [148, 152, 153]. Сигнатуры продемонстрировали способность прогнозировать агрессивное течение, сниженные бессобытийную и общую выживаемость. Интересно, что значительная часть генов в этих сигнатурах (30% в UAMS70) локализована на длинном плече хромосомы 1. С использованием метода РНК-секвенирования были проанализированы данные 674 пациентов с впервые установленным диагнозом ММ и сопоставлены с их клиническими данными. На основании анализа ПЭГ был создан показатель риска LfM-HRS, включающий 267 генов, позволяющий разделить пациентов на 3 группы риска: высокого, стандартного и низкого, с сильно различающимися ВБП и ОВ. Валидация была проведена на когорте из 76 пациентов с впервые диагностированной ММ. Оценка риска на основе РНК-секвенирования продемонстрировала прогностическую ценность в двух независимых когортах пациентов с ММ. Пациенты с высоким риском характеризовались изменением экспрессии генов, белковые продукты которых вовлечены в биохимические пути, связанные с клеточной пролиферацией и эпигенетической регуляцией генов. Пациенты из группы высокого риска характеризовались худшим ответом на таргетную терапию [154]. Другие сигнатуры высокого риска ММ были связаны с биологическими механизмами, участвующими в прогрессировании ММ [150, 151, 155], с высоким индексом пролиферации, коррелирующим с плохим прогнозом [149]. Также были получены сигнатуры профилей экспрессии, предсказывающие ответ или резистентность к ингибиторам протеасомы [40, 54], мелфалану [156]. Таким образом, новые исследования, посвященные анализу ПЭГ опухолевых клеток, позволяют выделить группу пациентов высокого риска и открывают перспективы для персонализированного подбора терапии при ММ.

## 1.9. Сигнальные каскады, активированные в опухолевых клетках у пациентов с множественной миеломой

Хромосомные перестройки, точечные мутации, эпигенетические модификации приводят к существенным изменениям функционирования генов в опухолевых клетках. В результате этих

изменений происходит нарушение нормальной регуляции сигнальных каскадов опухолевых клеток и микроокружения. Выделяют 5 ключевых сигнальных путей, функционирование которых изменено в опухолевых клетках при ММ - RAS/ERK, PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT3, WNT, NF-κB, RANK/RANKL, - регулируют клеточный рост, дифференцировку, клеточный метаболизм, выживание, резистентность к апоптозу/аутофагии, адгезию, поддержание стволовых свойств опухолевых клеток, воспаление, структуру костной ткани [68] (Рисунок 1.12).

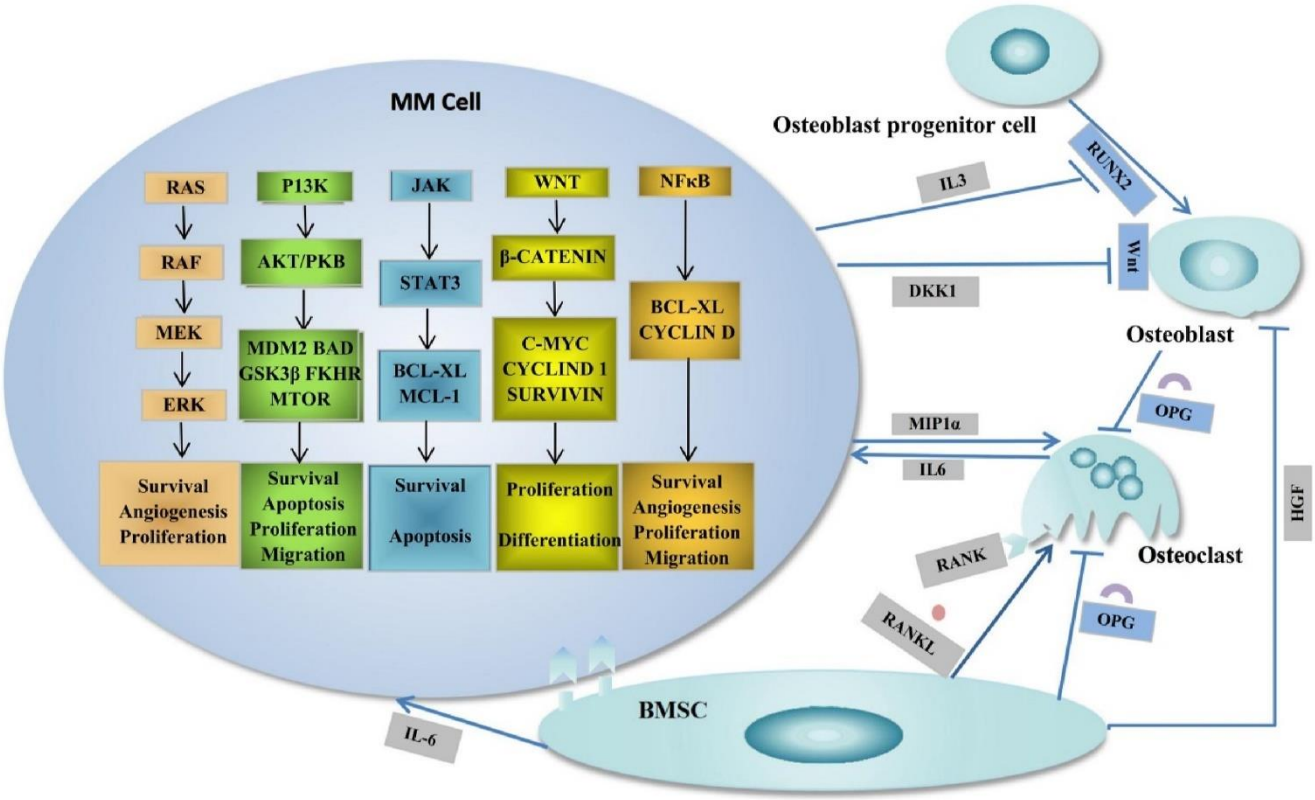



Рисунок 1.12 – Ключевые сигнальные пути, поддерживающие опухолевую популяцию клеток при ММ: RAS/ERK, PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT, WNT, NFkB, RANK/RANKL. Рисунок взят из статьи Lu et al., Molecular Biomedicine, 2024.

Сигнальный каскад RAS/ERK - один из митоген-активируемых протеинкиназных каскадов, который играет центральную роль в регуляции роста и выживания опухолевых клеток при ММ. Белки семейства RAS являются участниками этого каскада, их функционирование было описано выше. RAS/ERK регулируется сложной системой положительных и отрицательных обратных связей. Так, промежуточные звенья каскада MEK1, MEK2 могут изменять уровень своей активности в зависимости от активности ERK: при снижении количества протеина ERK уровень транскрипции *MEK1* возрастает, при активации ERK уровень MEK2 снижается. Повышенный

уровень транскрипции *MEK1* обнаруживается в опухолевых клетках ММ, в связи с чем существует таргетный препарат для ингибирования MEK1 - траметиниб. Пластичность регуляции сигнального пути RAS/ERK может объяснять умеренную эффективность ингибиторов MEK (например, траметиниба) [32, 157, 158, 159].

Практически во всех случаях конститутивная активация связана с трансформацией нормальной клетки в опухолевую. Активный RAS/ERK-каскад приводит к индукции экспрессии генов раннего ответа, кодирующие компоненты транскрипционного комплекса AP-1 [160]. В состав AP-1 могут входить протеины семейства *JUN* и *FOS*, играющих ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Сначала происходит фосфорилирование c-Jun белками ERK1/2, что приводит к увеличению транскрипционной активности c-Jun. Белки c-Jun также могут влиять на экспрессию генов семейства *FOS*. Однако, AP-1 может также формироваться из других белков, включая ATF (Activating Transcription Factor) и MAF (v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog), семейство CREB/ATF (CREB, CREM, ATF-1, CREB-1, CREB-2 (ATF-4), CREB-3, CREB-5, ATF-1 (TREB36), ATF-2 (CRE-BP1), ATF-3, ATF-5 (ATFX), ATF-6, ATF-7, B-ATF) и MAF (MAF, MAFA, MAFB, NRL). Активация AP-1 приводит также к изменению экспрессии генов, кодирующих белки-регуляторы клеточного цикла (например, циклин D1, циклин-зависимые киназы - p21 и p27), факторы роста и их рецепторы (VEGF, EGFR, FGFR); белки, регулирующие апоптоз (семейство Bcl-2, BIRC5), белки, регулирующие воспалительные реакции, (цитокины и рецепторы цитокинов, такие как IL-6, IL6R, TNF-alpha) и метастазирование опухоли (матриксные металлопротеиназы, MMPs). По литературным данным ERK может влиять на стабильность и активность белка Myc, важного регулятора клеточного цикла и апоптоза. Мишенями сигнального каскада RAS/ERK являются также гены семейства *MEF2* (Myocyte Enhancer Factor 2), которые кодируют семейство транскрипционных факторов, регулирующих дифференцировку и выживание клеток.

Сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR может активироваться под действием ростовых факторов и воспалительных цитокинов, а также при изменении энергетического баланса клетки. В этом молекулярном каскаде от активированных рецепторов IGF-1R, IL-6R и интегринов сигнал передается к киназе PI3K, которая фосфорилирует фосфатидилинозитол-3,4-бис-фосфат (PIP2) с образованием фосфатидилинозитол-3,4,5-трис-фосфата (PIP3). PIP3 способствует активации Akt при взаимодействии с комплексом mTORC2. После полной активации Akt может фосфорилировать негативный регулятор mTORC1, что блокирует действие Akt и способствует активности mTORC1 [107]. mTORC1 обеспечивает рост, метаболическую перестройку,

подавление апоптоза и устойчивость к стрессу ЭПР [107, 108]. Сигнальный каскад PI3K-AKT-mTOR может быть усилен активацией белков RAS.

Активация сигнального каскада JAK/STAT связана, прежде всего, с действием провоспалительных цитокинов, которые связывается с рецепторами на мембране опухолевых клеток. Это приводит к конформационным изменениям, которые активируют ассоциированные янус-киназы JAK1-3. Активированные JAK фосфорилируют сайт связывания транскрипционных факторов STAT, прежде всего STAT3, который после фосфорилирования димеризуется и транслоцируется в ядро клетки. В ядре STAT3 регулирует транскрипцию широкого спектра генов. Среди них — гены циклинов, антиапоптотических белков (BCL-XL, MCL-1), факторов клеточного цикла (c-Myc), а также молекул, обеспечивающих взаимодействие опухолевых клеток с костным микроокружением. Поддержание экспрессии антиапоптотических белков и факторов роста позволяет опухолевым клеткам при ММ противостоять действию химиотерапии и таргетных препаратов. Активация STAT3 способствует формированию иммуносупрессивного микроокружения, включая подавление активности цитотоксических Т-клеток и стимулирование регуляторных клеток, что облегчает уклонение опухолевой популяции от иммунного надзора. Активация STAT3 коррелирует с неблагоприятным прогнозом у пациентов с ММ [161].

Активация NF-κB-зависимого каскада происходит под действием молекул патогенов и воспалительных цитокинов (TNF, интерлейкина-1 и др.), канцерогенных веществ, развивается вследствие гипоксии или активации некоторых онкогенов, например, RAS [112]. Путь внутриклеточной сигнализации NF-κB является регуляторным механизмом воспалительного ответа и выживания клетки, который активируется через рецепторы семейства TNF (BAFF, APRIL), CD40, TLR, а также в результате соматических событий (мутации TRAF3, CYLD, NIK). [112]. TNF-зависимая активация каскада обусловлена передачей сигнала от рецептора TNF, TNF-R1 при которой посредством адапторных белков происходит активация комплекса киназ ингибиторов κB комплекса (IκB kinases, IKK), в результате чего комплекс IκB подвергается протеасомной деградации и приводит к высвобождению комплекса κB, который транслоцируется в ядро, где регулирует экспрессию генов цитокинов и ингибиторов апоптоза. Активация NF-κB частое событие на ранних этапах ММ.

Сигнальный каскад RANK/RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kB/ Receptor Activator of Nuclear Factor kB Ligand) играет важную роль в патогенезе ММ в контексте формирования остеолитических повреждений и ремоделировнаия костной ткани. Опухолевые клетки при ММ стимулируют повышение экспрессии RANKL (RANK Ligand) в клетках

микроокружения костного мозга – остеобластах, стромальных клетках, Т-лимфоцитах. RANKL связывается с RANK на поверхности предшественников остеокластов и приводит к активации этого каскада. Активация RANK-сигналинга приводит к включению RAS/ERK и NF-kB путей, поддерживающих жизнеспособность остеокластов, способствующих воспалительных реакциям и усиливают ремоделирование кости. Одновременно опухолевые клетки подавляют остеобласты, главным образом через гиперэкспрессию DKK-1 (ингибитор сигнального пути Wnt/β-catenin), что блокирует образование новой костной ткани [162, 163]. В результате развивается прогрессирующий остеолиз, поддерживаемый замкнутым циклом взаимодействий между опухолевыми клетками, стромой и продуктами костной деструкции.

Таким образом, как минимум 5 каскадов изменены при ММ, которые затрагивают опухолевую популяцию и микроокружение. Молекулярные каскады образуют сложную сеть со множеством точек пересечения и обратных связей. Их активация, обусловленная генетическими и эпигенетическими нарушениями, обеспечивает опухолевым клеткам метаболическую пластичность, устойчивость к растворимым факторам регуляции, формирование благоприятного микроокружения для прогрессии опухоли. Взаимодействие каскадов между собой объясняет ограниченную эффективность монотерапии: например, параллельная активация STAT3, PI3K, RAS/ERK и др. обеспечивает компенсаторные механизмы выживания. Поэтому в исследованиях наблюдается большой интерес к разработке таргетных препаратов для ингибирования сигнальных каскадов (Приложение. Таблица А.2), и применению этих препаратов в комбинированном режиме: протеасомные ингибиторы + IMiDs + анти-CD38/иммунные подходы; комбинации таргетных препаратов (MCL-1 ингибитор + BCL-2 ингибитор; MEK-ингибитор + BRAF-ингибитор при BRAF-мутациях), — с целью устранения резистентности клона и преодоления устойчивости к препарату.

## 1.10. Влияние цитокинов на развитие опухоли при множественной миеломе

Нарушения иммунной системы играют важную роль в процессе созревания и дифференцировки опухолевого клона при развитии ММ. В патогенезе принимают участие различные цитокины: IL-6, IL-1β, IL-11, TNF-α и др [100-102]. С одной стороны, опухолевые ПК способны самостоятельно продуцировать цитокины [45], с другой - рост опухолевого клона регулируется цитокинами стромы, которые условно можно разделить на индуцирующие (IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, IL-3) и ингибирующие пролиферацию опухолевых клеток (IL-2, IL-4) [103, 104]. Злокачественные клетки, взаимодействуя со стромальными клетками костного мозга, стимулируют секрецию цитокинов, которые снижают эффективность лекарственных препаратов и способствуют выживанию и росту опухолевых клеток [105, 106]. IL-6 - один из основных цитокинов, стимулирующих пролиферацию опухолевых плазматических клеток при ММ. IL-6, секретируемый стромальными клетками, а позже и самими опухолевыми клетками, связывается с IL-6R/gp130 на мембране опухолевых клеток, в результате происходит активация JAK1/JAK2, запускающее форфорилировнаие STAT3. Кроме того, IL-6 предотвращает дексаметазон-индуцированную гибель опухолевых клеток, его экспрессия повышается при прогрессировании ММ [80, 82] и снижается после достижения ремиссии. IL-6, являясь наряду с IL-1 и TNF-α, остеокластактивирующим фактором, играет важную роль в развитии остеолитических повреждений при ММ [83]. В ряде работ было показано, что снижение концентрации альбумина в сыворотке крови происходит в результате гиперэкспрессии цитокина интерлейкина-6 (IL-6) [164]. Интерлейкин-6 представляет собой цитокин плейотропного действия. Пролиферативная активность клеток ММ зависит от IL-6, выделяемого стромальными клетками и опухолевыми клетками [165]. Увеличение числа рецепторов IL-6 было найдено на опухолевых клетках при ММ с агрессивным течением. Экспрессия IL-6 опухолевыми клетками ассоциирована с агрессивным течением заболевания, высоким пролиферативным индексом и устойчивостью к лекарственным препаратам, индуцирующим апоптоз [166]. Повышение уровня IL-6 связано с остеодекструкцией - повышенной активностью и пролиферацией остеокластов, и понижением количества остебластов при ММ [167]. IL-6 индуцирует синтез белка острой фазы С-реактивным белком (СРБ) гепатоцитами [99].

# Заключение обзора литературы

ММ представляет собой биологически гетерогенное злокачественное заболевание, формирование и прогрессирование которого обусловлены многоуровневыми нарушениями регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, выживаемости и взаимодействия опухолевых ПК с микроокружением костного мозга. В основе патогенеза ММ лежит поэтапная аккумуляция генетических и транскрипционных изменений, возникающих на разных стадиях дифференцировки В-клеток и ПК, что приводит к формированию устойчивого опухолевого клона и его последующей субклональной эволюции. Ключевую роль в молекулярной архитектуре ММ играют первичные хромосомные перестройки с вовлечением локусов иммуноглобулинов, обеспечивающие дерегуляцию экспрессии онкогенов и создающие основу для клональной экспансии. Последующие вторичные генетические события, включая хромосомные делеции, амплификации и точечные мутации в драйверных генах, усиливают генетическую нестабильность опухоли и способствуют функциональной диверсификации субклонов. В результате опухолевая популяция при ММ представляет собой динамичную систему, в которой сосуществуют субклоны с различным пролиферативным потенциалом, метаболическим профилем и чувствительностью к терапии. Особое значение в биологии ММ имеют активирующие мутации в генах сигнальных каскадов, прежде всего пути RAS/ERK, который является одним из центральных регуляторов клеточного роста, выживания и адаптации к стрессовым воздействиям. Мутации в генах *KRAS* и *NRAS* относятся к наиболее частым соматическим мутациям при ММ и, как правило, носят субклональный характер, что отражает их роль в поздних этапах опухолевой эволюции. Активация RAS-зависимых сигнальных путей приводит к конститутивной передаче митогенных сигналов, снижению апоптотической чувствительности плазматических клеток и изменению транскрипционных программ, контролирующих клеточный цикл, метаболизм и взаимодействие с микроокружением костного мозга. Несмотря на убедительные экспериментальные данные о биологической значимости мутаций в генах *KRAS* и *NRAS*, их клиническое и прогностическое значение при ММ остаётся неоднозначным.

Современные бортезомиб-содержащие схемы терапии способны частично компенсировать негативные эффекты отдельных молекулярных нарушений, однако не устраняют биологическую неоднородность опухолевых клеток, что проявляется в вариабельности глубины и длительности ответа на лечение. В этом контексте особый интерес

представляет анализ профиля экспрессии генов опухолевых ПК, позволяющий выявить функционально активированные сигнальные каскады и транскрипционные профили, ассоциированные с агрессивным течением заболевания и резистентностью к терапии. Данные о молекулярных подтипах ММ, основанных на транскриптомных сигнатурах, подтверждают, что экспрессионные характеристики опухолевых клеток отражают как ранние онкогенные события, так и адаптивные изменения, возникающие в процессе опухолевой эволюции. Таким образом, литературные данные указывают на необходимость интегративного подхода к изучению биологии ММ, включающего одновременный анализ мутационного статуса ключевых сигнальных генов и профиля экспрессии генов опухолевых клеток. Однако, на сегодняшний день транкриптомный анализ представляет собой технически сложное и догоростоящее исследование, которое затруднительно реализовать в рутинной диагностической практике. В связи с этим, поиск ограниченного числа молекулярных предикторов ответа на бортезомиб-содержащую индукционную терапию, основанный на выявлении наиболее важных геномных и транскриптомных маркеров резистентности опухоли, является перспективным направлением, способным помочь врачам-клиницистам в выборе персонализированной стратегии лечения пациентов с ММ.

# Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 2.1. Характеристика больных

В исследование включены 105 больных с впервые выявленной ММ, до начала терапии, госпитализированные в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (НМИЦ гематологии) с января 2013 по ноябрь 2019 г. Для всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных в соответствии с требованиями действующего законодательства и локального этического комитета. Диагноз ММ устанавливали на основании критериев, разработанных International Myeloma Working Group (IMWG) в 2014 г. [129].

Пациентам, поступившим в центр, проводили комплексное обследование, направленное на верификацию диагноза и прецизионное стадирование ММ по классификациям Durie–Salmon [97] и Международной системе стадирования (International Staging System, ISS, R-ISS) [33]. Диагностический алгоритм включал:

• Лабораторную диагностику: развернутый клинический и биохимический анализы крови (с определением уровней креатинина, кальция, ЛДГ, альбумина и β2-микроглобулина).

• Иммунохимическое исследование: электрофорез белков сыворотки крови и суточной мочи с иммунофиксацией для выявления и количественного определения моноклонального компонента (М-белка), а также определение свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов.

• Морфологическое исследование: аспирация и трепанобиопсия костного мозга с последующим подсчетом миелограммы и гистологическим анализом для оценки инфильтрации плазматическими клетками.

• Цитогенетическое исследование: выполнение FISH-метода (флуоресцентная гибридизация in situ) для выявления прогностически значимых аберраций.

• Лучевую диагностику (оценку поражения костей): низкодозовую компьютерную томографию (КТ) всего тела, МРТ (для выявления очаговых изменений).

Контрольная группа состояла из 14 здоровых доноров КМ. В группе доноров соотношение женщин и мужчин было 1:1, возраст составил от 25 до 41 года, медиана 33 года.

Костный мозг больных был получен в отделении гематологии и химиотерапии парапротеинемических гемобластозов с блоком трансплантации костного мозга и

гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (зав. отделением к.м.н. Соловьев М.В.), отделении химиотерапии гематологических заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (зав. отделением к.м.н. Грибанова Е.О.).

Пол, возраст, клинико-лабораторные характеристики больных, вошедших в исследование, представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Демографические и клинико-лабораторные характеристики больных с ММ.

| Параметр | Всего пациентов (%) |
|---|---|
| **Пол** (мужской/женский) | 55 (52,4) / 50 (47,6) |
| **Медиана возраста** (диапазон) | 59 (28-83) |
| **Стадия по Durie-Salmon (**I/ II/ III/неиз.) | 9 (8,6) / 29 (27,6) / 58 (53,7) / 9 (8,6) |
| **Стадия по ISS** (I/ II/ III/неиз.) | 25 (23,8) / 21 (20) / 49 (46,7) / 10 (9,5) |
| **Альбумин, г/л** (≥ 35/ <35/неиз.) | 65 (61,9) / 30 (28,6) / 10 (9,5) |
| **β2-микроглобулин, мг/л** (<3,5/3,5-5,5/>5,5/неиз.) | 26 (24,8) / 20 (19,1) / 46 (43,8) / 13 (12,4) |
| **ПК в костном мозге, %** (≥ 10/ <10/неиз.) | 94 (89,5) / 8 (7,6) / 3 (2,9) |
| **Иммунохимический вариант парапротеина** (G/A/D/M/Bence-Jones/неиз.) | 57 (5,4) / 19 (18,1) / 1 (1,0) / 1 (1,0) / 23 (21,9) / 4 (3,8) |
| **Наличие плазмоцитом** (да/нет/неиз.) | 56 (53,3) / 29 (27,6) / 20 (19,0) |
| **Число остеодеструкций** (нет или единичные/множественные) | 18 (17,1) / 65 (61,9) / 22 (21,0) |
| **СРБ, мг/л** (≥6/<6/неиз.) | 35 (33,3) / 52 (49,5) / 18 (17,1) |
| **ЛДГ, ед/л** (>248/≤248/неиз.) | 85 (81,0) / 11 (10,5) / 9 (8,6) |
| **Креатинин, г/л** (>177/≤177/неиз.) | 20 (19,0) / 75 (71,4) / 10 (9,5) |
| **Гемоглобин, г/л** (<100/≥100/неиз.) | 40 (38,1) / 51 (48,6) / 14 (13,3) |
| **Цитогенетика** (выполняли/ не выполняли)<br>• t(4;14) (да/нет/нет данных)<br>• del17 (да/нет/нет данных)<br>• amp1q21(да/нет/нет данных)<br>• другие перестройки (да/нет/нет данных) | 87 (82,9)/18 (17,1)<br>• 13 (14,9) / 66 (75,9) / 8 (9,2)<br>• 11 (12,6) / 64 (73,6) / 12 (13,8)<br>• 12 (13,8) / 7 (8,1) / 68 (78,2)<br>• 67 (77,0) / 7 (8,1) / 13 (14,9) |

Для всех пациентов, 1 линия терапии (индукционный этап) начиналась с бортезомиб-содержащих трехкомпонентных схем лечения (PAD, бортезомиб + адриабластин + дексаметазон; VCD, бортезомиб + циклофосфан + дексаметазон). Ответ оценивался после 4-6 курсов, до того, как пациенту назначалась другая схема лечения при недостаточном ответе. Всего в исследование включен 91 пациент с ММ, у которых был известен ответ на индукционную терапию. Полный ответ (ПО) достигли 16 пациентов, 28 пациентов – очень хорошую частичную ремиссию (ОХЧР), 27 пациентов – ЧР, 5 больных – МО, 4 больных - СЗ, у 11 пациентов документирована прогрессия заболевания (ПЗ) после 6 курсов индукционной терапии. Ауто-ГГСК в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ получили 37 больных.

Лабораторный этап был реализован на базе ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова с привлечением подразделений:

на базе ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России: «Централизованная клинико-диагностическая лаборатория» (зав. к.м.н. Двирнык В.Н.); «Лаборатория генной инженерии» (зав. к.б.н. Пшеничникова О.С.); «Лаборатория иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга» (зав. д.м.н. Гальцева И.В.); «Лаборатория кариотипирования» (зав. к.м.н. Обухова Т.Н.); «Информационно-аналитический отдел» (руководитель к.т.н. Куликов С.М.);

на базе Лаборатории клинической и геномной биоинформатики Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (к.б.н. Сунцова М.В.).

Дизайн исследования представлен на рисунке 2.1.

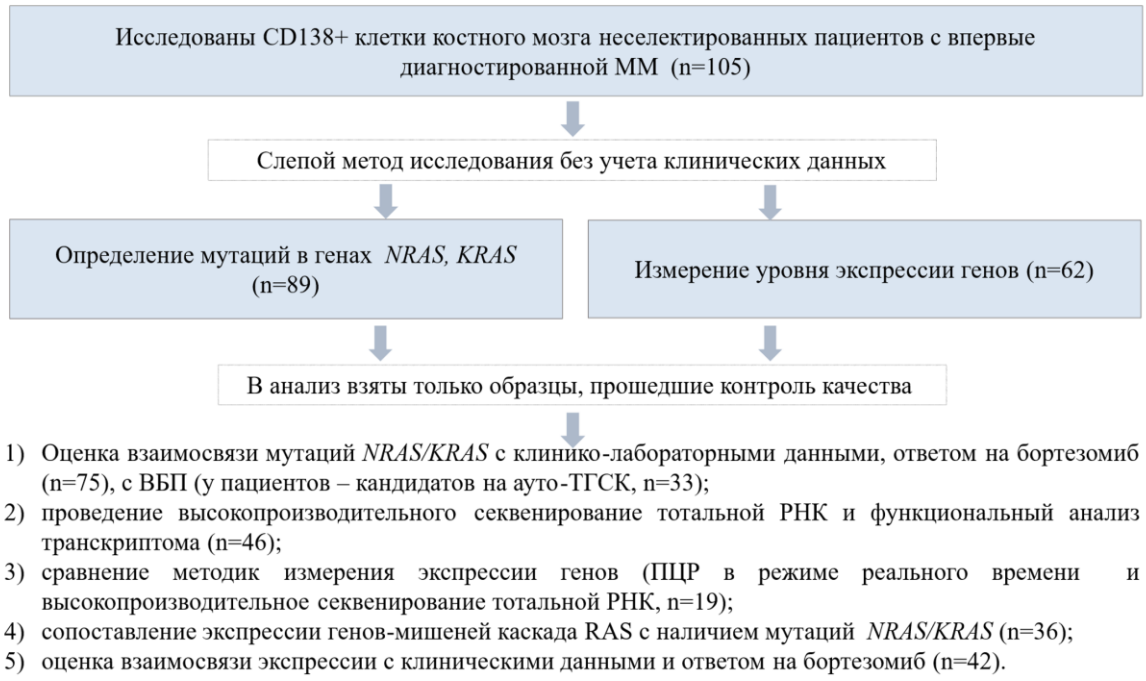



Рисунок 2.1 – Дизайн исследования.

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Выделение клеток и нуклеиновых кислот

#### Выделение мононуклеаров из костного мозга

Материалом для данного исследования служили плазматические клетки (ПК) с поверхностным маркером CD138+, выделенные из пунктата костного мозга (КМ) больных ММ. Для получения фракции ПК CD138+ пунктат КМ разводили в буфере Cell Wash (BD Biosciences, США) в соотношении 1:1. Полученный раствор КМ разделяли на фракции путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности. Для этого раствор КМ аккуратно наносили на раствор Lympholyte-H (Cedarlane, Канада) с плотностью 1,077 г/см3, заранее помещенный в пробирку объемом 15 мл. Далее проводили центрифугирование (30 минут, 20ºС, 500g); после чего отбирали мононуклеарное кольцо пипеткой Пастера. Выделенные мононуклеары отмывали в 10 мл буфера Cell Wash и осаждали в течение 10 минут центрифугированием при 300g. Осадок ресуспендировали в 1 мл буфера Cell Wash и пропускали

через фильтр с целью удаления крупных фрагментов КМ, фибрина, клеточных агрегатов из суспензии мононуклеаров [168]. Далее проводили подсчет клеток на анализаторе Sysmex KX-21N (Sysmex Corporation, Япония). Заготавливали аликвоту раствора с клетками, содержащую 10 млн. мононуклеаров (тотальная фракция), оставшиеся клетки использовали для выделения клеток с фенотипом CD138+.

Выделение CD138+ популяции клеток из мононуклеарной суспензии

Выделение CD138+ клеток из фракции мононуклеаров осуществляли согласно протоколу Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) с использованием магнитного сепаратора OctoMacs и микрогранул оксида железа, конъюгированных с антителами к CD138+(CD138 MicroBeads, human, Miltenyi Biotec GmbH, Германия) [169]. Для этого клеточную суспензию осаждали и осадок ресуспендировали в 80 мкл буфера Cell Wash. В буфер с клетками вносили 20 мкл раствора микрогранул, перемешивали и инкубировали 15 минут при 4ºС. После инкубации с антителами в образец добавляли 2 мл Cell Wash (Becton Dickinson, США), ресуспендировали и осаждали клетки центрифугированием на вортексе в течение 3 минут при 300 g. После удаления надосадочной жидкости, к клеткам добавляли 1 мл Cell Wash и снова ресуспендировали.

Для проведения сепарации MS колонку (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) устанавливали в штатив с магнитным полем и наносили на нее 0,5 мл буфера Cell Wash. После смачивания буфером через колонку пропускали суспензию клеток, проинкубированных с антителами на микрочастицах. Далее промывали MS колонку 3 раза 0,5 мл раствора Cell Wash, вымывая клетки, не связавшиеся с антителами на микрочастицах, в собирательную пробирку. Таким образом собиралась фракция клеток CD138-. Для того чтобы получить клетки, экспрессирующие CD138, переносили MS колонку в пробирку, вносили 1мл буфера Cell Wash и с помощью поршня выдавливали раствор с клетками из колонки в пробирку. После этого подсчет клеток на анализаторе Sysmex KX-21N. Для оценки чистоты сепарированных на колонке клеток, в суспензию добавляли антитела анти-CD138, меченными флуоресцентным красителем фикоэритрином (PE, сокращ. от Phicoeritrin). Полученную фракцию анализировали на проточном цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

## Выделение геномной ДНК

Мононуклеарные клетки или ПК осаждали при 300g в течение 5 минут. Супернатант сливали, остаток ресуспендировали. В каждую пробу добавляли по 1,25 мл лизирующего раствора следующего состава: 50 мМ Tris HCl (pH 8,0, Sigma-Aldrich, США), 2% SDS Na (Sigma-Aldrich, США), 2мМ ЭДТА (pH 8,0, Sigma-Aldrich, США), 5 мкл протеинкиназы К (20 ед/мл, Sigma-Aldrich, США). Лизат инкубировали при 65ºС 1 час или оставляли на ночь при 37ºС после чего добавляли равный объем фенола (pH 8,0 Sigma-Aldrich, США), перемешивали и центрифугировали (8000g, 10 мин). Супернанант переносили в чистую пробирку и добавляли равный объем смеси фенол: хлороформ (Sigma-Aldrich, США), перемешивали и центрифугировали (8000g, 10 мин), и снова собирали супернатант. Затем в каждую пробу добавляли два объема холодного 96% этанола и оставляли на ночь при -20ºС. На следующий день пробы откручивали при 12000g при 4ºС в течение 15 минут. Супернатант сливали, осадок однократно промывали 1 мл 70% этилового спирта, переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, центрифугировали при 12000g в течение 2 минут. Супернатант сливали, капельки спирта осаждали, затем отбирали досуха. Пробирки с образцами оставляли на 10 минут для того, чтобы остатки спирта испарились. В каждую пробу добавляли по 100 мкл буфера ТЕ (10 мМ Tris HCl (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА) и оставляли на некоторое время при комнатной температуре для того, чтобы ДНК растворилась. Пробы хранили при -20ºС.

## Выделение тотальной РНК

Выделение РНК из ПК проводили стандартным методом лизиса в денатурирующем буфере (ДБ) с последующей фенол-хлороформной экстракцией. В состав ДБ входили 25мМ цитрата натрия (Sigma-Aldrich, США), 0,5% N-лаурил саркозина (Sigma-Aldrich, США), 4М гуанидина изотиоцианата (ICN) и 0,1М ®-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США). Для проведения лизиса клетки осаждали, убирали супернатант. Осадок ресуспендировали в 1 мл ДБ и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Лизат в объеме 0,5 мл брали в работу для дальнейшего выделения РНК, остаток в объеме 0,5 мл сохраняли в качестве запасного материала при -70ºС. К лизату добавляли равный объем кислого фенола (pH 4,5), тщательно перемешивали на вортексе и добавляли 120 мкл хлороформа (Sigma-Aldrich, США) и снова перемешивали, затем инкубировали при 15 минут на льду. Пробы центрифугировали при 12000g 15 мин при 4ºС. Водную фазу аккуратно отбирали в новую пробирку, не задевая плотный средний слой, содержащий ДНК. Затем к раствору РНК добавляли 1/10 объема ацетата натрия (3М, pH

5,2) и 2,5 объема 96% ледяного этанола и убирали на ночь в морозильную камеру на -20ºС. На следующий день пробы центрифугировали при 12000g 15 мин при 4ºС, надосадочную жидкость убирали и добавляли 1 мл 70% этанола и центрифугировали 12000g 10 мин при 4ºС. Спирт отбирали пипеткой, пробирку оставляли открытой до полного испарения этанола, после чего осадок растворяли в 100 мкл воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (ДЭПК, Sigma-Aldrich, США).

Для образцов с низким содержанием ПК использовали модифицированный метод выделения РНК, основанный на применении тризола (TRIzol, Thermo Scientific, США). К клеточной суспензии объемом 0,25 мл добавляли 0,75 мл тризола, перемешивали и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. После этого в пробу добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали и инкубировали 2-3 минуты. После этого образцы центрифугировали при 12000g в течение 15 минут при 4ºС. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку, добавляли по 1 мкл гликогена (5 мг/мл) (Thermo Scientific, США), 1 мл (2 объема) 96% ледяного этанола, центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 минут при 40ºС. Затем РНК отмывали с помощью 70% этанола. Осадок РНК высушивали и растворяли в 60 мкл воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (ДЭПК, Sigma-Aldrich, США).

### 2.2.2. Секвенирование генов *KRAS* и *NRAS* по Сэнгеру

#### Подготовка образцов для секвенирования

Для подготовки амплификатов фрагментов генов *NRAS* и *KRAS* проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в смеси PCR Master Mix (2X) Thermo Scientific, США) в объеме 25 мкл. В реакционную смесь вносили 0,01–0,02 мкг геномной ДНК и 10 пкмоль каждого из праймеров (Синтол, Россия), нуклеотидные последовательности которых представлены в Таблице 2.2. Праймеры для ПЦР были подобраны к белок-кодирующей последовательности генов. Температурные условия: 92 °С — 1 мин., 60С — 1 мин., 72 °С — 1 мин., 35 циклов. В генах *KRAS* и *NRAS* секвенировали основной белок-кодирующий регион, представленный экзонами 2–4.

Таблица 2.2 – Характеристика олигонуклеотидов, использованных в ПЦР для секвенирования генов *NRAS/KRAS*.

| Прямой праймер | Последовательность | Обратный праймер | Последовательность |
|---|---|---|---|
| *RAS1D* | atgtggctcgccaattaacc | *RAS1R* | tgggtaaagatgatccgacaa |

Продолжение Таблицы 2.2

| | | | |
|---|---|---|---|
| *RAS1* | ccctttaccctccacaccccc | *RAS2* | ctcatttccccataaagattcag |
| *NRAS3x* | ttcaagcagtctgccctcct | *NRAS4* | aactgatgcaaactcttgcaca |
| *KRASD1* | gatacacgtctgcagtcaac | *KRASR1* | tcctgcaccagtaatatgcat |
| *KRASD2* | ccagactgtgtttctcccttg | *KRASR2* | ttactccactgctctaatccc |
| *KRAS3* | gacaaaagttgtggacaggtt | *KRAS4* | ggacactggattaagaagcaa |

Анализ полученных после проведения ПЦР продуктов проводили при помощи электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) или в 1% агарозном геле. Общий объем наносимой пробы составлял 6 мкл: 4 мкл реакционной смеси после ПЦР и 2 мкл краски, содержащей ксиленцианол и бромфеноловый синий в 50%-ном глицерине. В качестве маркера длин ПЦР-продуктов использовали Generuler 100 bp (Thermofisher Scientific, США). Визуализацию ампликонов проводили в УФ-свете после прокрашивания геля бромистым этидием. Для очистки ПЦР-продуктов, под УФ-светом из геля вырезали фрагменты, содержащие ампликоны нужной длины, и очищали на колонках “Wizard” (Promega, США). Эффективность очистки проверяли повторно на электрофорезе в 6% ПААГ или 1% агарозном геле.

Секвенирование по Сэнгеру и обнаружение мутаций в генах *NRAS*/*KRAS*

Секвенирование по Сэнгеру проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием реагентов BigDyeTM Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для получения последовательности генов секвенирование проводили с прямого и обратного праймеров (по 5 пмоль каждый), которые применялись для амплификации фрагментов генов *NRAS* и *KRAS.* Реакция секвенирования проводилась с помощью набора реактивов ABI PRISM® (Thermo Fisher Scientific, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК. Хроматограммы, полученные на генетическом анализаторе анализировали в программе Ugene или BioEdit, в качестве референсных последовательностей использовали RefSeq NG_007524 для гена *KRAS* и NG_007572 для гена *NRAS* базы данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Мутации считали выявленными, если высота пика, соответствующего мутантному нуклеотиду, составляла ≥ 10% в прямом и обратном прочтении.

### 2.2.3. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени

#### Определение качества и количества РНК

Для определения уровня деградации РНК во время выделения и хранения РНК проводили электрофорез РНК в агарозном геле. Для этого готовили 2% агарозный гель на буфере ТАЕ (0,04 М Трис, 0,02 М уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8.4). Проба для нанесения включала 5 мкл РНК, смешанную с 1 мкл красителя. Качество РНК оценивали по интенсивности свечения полос рибосомальной РНК. Контаминацию геномной ДНК оценивали по наличию/отсутствию полос соответствующего размера.

Для определения количества и качества РНК на спектрофотометре (Ultrospec 300, Pharmacia Biotech, Швеция) РНК разводили водой, исходя из объема имеющейся кюветы. На спектрофотометре определяли поглощение при 260, 280 нм. Количество РНК оценивали по значению А260. Чистоту образца оценивали по соотношению А260/А280.

#### Синтез комплементарной цепи ДНК на матрице РНК

Для определения генной экспрессии сначала проводили реакцию обратной транскрипции (ОТ) для построения комплементарной цепи ДНК (кДНК) к РНК. ОТ проводили по протоколу для M-MLV обратной транскриптазы (Promega, США). 5 мкл РНК и 1 мкл праймеров (смесь случайно синтезированных гексамеров олигонуклеотидов) смешивали в пробирке и нагревали в течении 5 минут при 65ºС. Затем быстро ставили в лед. Далее, в пробирку на льду добавляли смесь 2,5 мкл 10мМ dNTP, 1 мкл обратной транкриптазы M-MLV (200 Ед), 1 мкл РНАзина (25 Ед) и 5 мкл реакционного буфера (M-MLV 5X Reaction Buffer). Все компоненты тщательно перемешивали, затем инкубировали в течение часа на 37ºС. После окончания синтеза в реакционную смесь добавляли 25 мкл деионизованной воды. Образцы кДНК хранили на -20ºС.

#### Постановка ПЦР-РВ

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) проводилась на приборе ABI 7000 Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific, США) в 96-луночных плашках. Все реакции проводили в трипликатах, в каждой постановке обязательно ставился отрицательный контроль для каждого гена и каждого пациента. Все сравниваемые образцы находились в одной плашке. В состав ПЦР-смеси входили реактивы компании Promega: 5-кратный буфер (5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer, Promega, США), Taq-полимераза (GoTaq® G2 DNA Polymerase, Promega, США),

магния хлорид $MgCl_2$ 3,5 mM и дезоксинуклеотиды 0,2 mM каждого; зонды (Синтол, Россия). В реакцию брали 2 мкл смеси кДНК, ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл. Программа для проведения ПЦР была следующей: 95ºС – 10 мин, (95ºС – 20 с, 60ºС – 60 с) – 40 циклов, хранение до снятия проб при 4ºС.

Анализ полученных данных проводился во встроенной в прибор программе 7500 System SDS software, где определялся базовый и пороговый уровни, по которым высчитывался средний по трем повторам Ct – показатель, определяющий проекцию точки пересечения кривой флуоресценции и пороговой линии на ось с показателем количества циклов. Значение Ct обратно пропорционально количеству транскриптов в пробе. Эти показатели одновременно оценивались для исследуемого гена и гена «домашнего хозяйства». Ген домашнего хозяйства необходим для обеспечения базовых функций клетки и считается, что его экспрессия достаточно постоянна во всех клетках, опухолевых и здоровых. В качестве генов домашнего хозяйства использовали *HMBS*.

Количественную ПЦР проводили с использованием специфических праймеров и зондов для исследуемого гена и гена *HMBS*, выбранного в качестве гена «домашнего хозяйства» для нормализации экспрессии. Для нормализации экспрессии рассчитывали значение:

ΔCt = Ct (исследуемого гена) – Ct (*HMBS*)

Относительный уровень экспрессии исследуемого гена определяли методом сравнительного порогового цикла (ΔΔCt). В качестве калибратора использовали среднее значение ΔCt, рассчитанное для группы здоровых доноров. Для каждого образца вычисляли:

ΔΔCt = ΔCt (пациента) – ΔCtсред(доноры).

Относительное изменение экспрессии рассчитывали по формуле:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$

Полученные значения использовали для сравнения уровней экспрессии исследуемого гена между группами больных и здоровых доноров, группами больных с мутациями и без мутаций.

Таблица 2.3 – Характеристика олигонуклеотидов, использованных для проведения ПЦР-РВ.

| Олигонуклеотид | Расшифровка | Последовательность |
|---|---|---|
| *HMBSd* | Прямой праймер | catgtccctgcccagcatgaa |
| *HMBSr* | Обратный праймер | gctcctttgctcagcaacaa |
| *HMBSzd* | Зонд | ccaggctgatgcccaagttct |
| *MEK1D* | Прямой праймер | gccctccaacatcctagtca |

Продолжение Таблицы 2.3

| | | |
|---|---|---|
| *MEK1R* | Обратный праймер | gacagtcccatgctccagat |
| *MEK1P* | Зонд | acaaggtcctacatgtcgccagaaag |
| *MEK2D* | Прямой праймер | cgaggcaaacctggtggacct |
| *MEK2R* | Обратный праймер | ccgtagaagcccacgatgtac |
| *MEK2P* | Зонд | cagggaagctgatccaccttgagatca |
| *ERK1D* | Прямой праймер | tcccagtctctggcagttct |
| *ERK1R* | Обратный праймер | tcccagtctctggcagttct |
| *ERK1P* | Зонд | catctcattcaaaccccaccctagttt |
| *ERK2D* | Прямой праймер | ccagaccatgatcacacagg |
| *ERK2R* | Обратный праймер | ctggaaagatgggcctgtta |
| *ERK2P* | Зонд | tggtacagggctccagaaattatgttg |

### 2.2.4. Высокопроизводительное РНК-секвенирование

Качество РНК оценивалось по числу RIN (RNA Integrity Number) на анализаторе Agilent 2100 (Agilent Technologies, США). После проведения контроля качества образцы с высокой степенью деградации РНК (RIN<2) были исключены из анализа. Для измерения концентрации РНК использовали набор Qubit RNA Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, США). Для удаления рРНК и подготовки библиотеки применяли KAPA RNA Hyper with RiboErase (KAPA Biosystem) Kit (KAPA Biosystems, США). Для использования одной проточной ячейки образцы РНК от разных больных и доноров маркировались адаптерами. Концентрация матрицы в библиотеке оценивали с помощью Qubit dsDNA HS Assay kit (Life Technologies, США) и Agilent TapeStation (Agilent Technologies, США).

Секвенирование РНК было произведено на приборе Illumina HiSeq 3000 (Illumina, США), набором для одностороннего секвенирования с длиной фрагментов 50bp. Все образцы (62 образца пациентов и 11 образцов доноров) секвенировались параллельно в одном запуске. Демультиплексирование и конвертация данных, полученных от образцов в файлы FASTQ выполнены с использованием программы Illumina Bcl2fastq2 v 2.17 (Illumina, США). Контроль качества необработанных данных РНК-секвенирования проводили в программе FastQC (v. 0.11.8) с последующей агрегацией отчетов в MultiQC (v.1.26). Оценивали общее количество прочтений, длину прочтений, количество выровненных прочтений и уникально выровненных прочтений,

уровень амплификации образца, качество определения нуклеотидов, GC-состав и ряд других характеристик. Анализ качества определения нуклеотида проводился при помощи статистической функции Phred score. Прочтения с высоким качеством определения нуклеотидов имеют Phred quality score> 30, что соотвествует точности правильного определения нуклеотила 99,9% (1 неверный нуклеотид на 1000). Другая важная характеристика – количество неопределеных нуклеотидов на одну позицию «Per Base N Content» в образце. Суммарно таких нуклеотидов допускается менее 5%. Процент оснований гуанина и цитозина (GC) в геноме варьирует в зависимости от вида. Для экзомных участков содержание GC составляет около 49–51 %. Появление на графике двух пиков может свидетельствовать о контаминации образца чужеродной нуклеиновой кислотой. Для РНК-секвенирования % GC состава может варьировать в диапазоне 30-60%. Появление дополнительно пика в распределении GC также может указывать на очень высокую экспрессию какого-либо гена [170]. Пороговые значения согласно рекомендациям, в работе Sheng и соавт. [171] использовались в качестве критерия включения образцов в дальнейшй анализ экспрессии генов. Согласно проведенным исследованиям, для точной количественной оценки экспрессии генов средней распространенности требуется получить не менее 20 миллионов прочтений одного образца. Однако все более высокая глубина секвенирования образца может привести к избыточному количеству прочтений без улучшения качества данных в силу большой степени амплификации образца, большой уровень амплификации связан с избыточной количественной оценкой определенного транскрипта. Образцы с уровнем амплификации выше 35 были классифицированы как имеющие высокий уровень и были исключены из анализа после проведения контроля качества. Количество выровненных прочтений важно учитывать при оценке качества образца, оно должно составлять не менее 60% от общего количества прочтений. Также, важной оценкой качества РНК-секвенирования образца служит количество уникально выровденных прочтений на референсный транскриптом. Большой процент уникально сопоставленных прочтений обычно указывает на хорошее качество данных. Образцы с количеством уникально картированных прочтений на HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) гены менее 2,5 миллионов были помечены как образцы, которые могут не вполне корректно отражать биологические закономерности клеток [172]. Общая характеритиска критериев включения образца в анализ экспрессии генов представлена в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Сводная таблица с пороговыми значениями для метрик контроля качества образца.

| Метрика | Пороговое значение |
|---|---|
| Число прочтений, млн | >20 млн |
| Выровненные прочтения, % | >60 |
| Уникально выровненные прочтения, млн | >2,5 млн |
| Уровень амплификации, % | <50% |
| GC состав, % | 30-60 |
| Phred Score >30, % | >90% |
| Качество прочтения образца (количество однозначно определенных нуклеотидов) | >95% |

Файлы FASTQ обрабатывались в программе Salmon [173] в режиме квазикартирования для количественного определения транскриптов. В качестве референса использовали транскриптом Gencode v32. Для импорта результатов Salmon и агрегации экспрессии с уровня транскриптов до уровня генов использовали программу tximport [174, 175]. Идентификационные номера генов были конвертированы из базы данных Ensembl в символы генов HGNC с помощью библиотеки biomaRt [176]. Нормализация данных была проведена с использованием программного пакета DESeq2 (version 1.26.0) в среде R. Уровень экспрессии гена выражали в нормализованном значении числа прочтений этого гена [177].

### 2.2.5. Статистический анализ данных

Для анализа категориальных признаков формировали таблицы сопряжённости. Оценку различий между группами проводили с использованием точного теста Фишера. Количественные признаки предварительно анализировали на соответствие нормальному распределению. Для проверки нормальности распределения исследуемых выборок был использован критерий Шапиро-Уилка. Статистические отличия в группах оценивали при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок. В случае отклонения распределения от нормального использовали логарифмическое преобразование или применяли непараметрический критерий Манна–Уитни или тест Уилкоксона. Числовые значения представляли в виде среднего значения

и стандартного отклонения либо медианы и межквартильного интервала (МКИ). Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p$ <0,05.

Для оценки диагностической и прогностической значимости количественных показателей применяли ROC-анализ. Рассчитывали площадь под ROC-кривой (AUC) с 95% доверительным интервалом. Оптимальные пороговые значения определяли на основании максимального значения индекса Юдена.

Анализ выживаемости без прогрессии (ВБП) и общей выживаемости (ОВ) проводили методом Каплана–Майера. Временные интервалы рассчитывали от даты начала терапии до даты прогрессирования заболевания или смерти для ВБП и до даты смерти от любой причины для ОВ. Пациенты без зарегистрированного события на момент анализа считались цензурированными. Сравнение кривых выживаемости между группами выполняли с использованием лог-рангового теста. Результаты представляли в виде медиан выживаемости с 95% доверительными интервалами. Различия считали статистически значимыми при $p$ <0,05.

Для оценки влияния клинико-лабораторных и молекулярных факторов на показатели выживаемости использовали пропорциональную регрессионную модель рисков Кокса. Результаты представляли в виде отношений рисков (hazard ratio, HR) с 95% доверительными интервалами и соответствующими значениями $p$. Предположение о пропорциональности рисков проверяли с использованием стандартных диагностических методов. Различия считали статистически значимыми при $p$ <0,05.

Для поиска молекулярных предикторов ответа на индукционную терапию триплетами, содержащими бортезомиб использовали данные экспрессии генов, полученные методом РНК-секвенирования. Для построения прогностической модели применяли метод случайного леса (Random Forest). Алгоритм был реализован на Python 3 с использованием пакета RandomForestClassifier. Исходную выборку случайным образом разделяли на обучающую (80%) и тестовую (20%) подвыборки. Обучение модели проводили на обучающей выборке, оценку качества классификации — на тестовой выборке. Модель случайного леса включала 30 деревьев решений с максимальной глубиной дерева 7. В качестве входных признаков использовали уровни экспрессии генов, в качестве целевой переменной — клинический ответ на терапию бортезомибом. Значимость отдельных генов оценивали на основе показателей важности признаков, рассчитанных в модели случайного леса. Гены с наибольшим вкладом в классификацию рассматривали как потенциальные молекулярные предикторы ответа на терапию.

# Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 3.1. Встречаемость мутаций в генах семейства *RAS* и комплексная оценка клинического значения этих мутаций у пациентов с множественной миеломой

### 3.1.1. Количественные и качественные характеристики мутаций в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках костного мозга у больных множественной миеломой

Секвенирование по Сэнгеру генов семейства *RAS* (*KRAS* и *NRAS*) в CD138+ клетках КМ было проведено 89 пациентам с впервые диагностированной ММ до начала лечения. Мутации в генах семейства *RAS* были найдены у 20 пациентов в гене *NRAS* и у 17 пациентов - в гене *KRAS*, с общим числом 40 мутаций (по 20 в каждом гене). На основании анализа было обнаружено, что 37 (42%) больных несли миссенс-мутации, при этом 92%, 34/37 больных имели по одной мутации; у 8% больных детектировано по два мутационных события. В одном случае мутация была обнаружена в обеих генах, *NRAS* и *KRAS*, а в двух случаях — две мутации в гене *KRAS*. Секвенирование генов *NRAS/KRAS* показало, что большинство мутаций были локализованы (87,5%) в кодонах 12, 13 и 61 (Рисунок 3.1). Выявлено, что преобладающее число мутаций гена *NRAS* расположены *в* кодоне 61 (n=15), что составило 75 % от общего числа мутаций в этом гене. При исследовании гена *KRAS* оказалось, что большая часть мутаций была в кодонах 61, 12 и 13, но их распределение оказалось более равномерным, чем в гене *NRAS*. Кроме того, в отличие от гена *NRAS*, мутации в гене *KRAS* также затрагивали экзон 4 (кодоны 104 и 146), как показано на Рисунке 3.1. Всего в генах семейства *RAS* было обнаружено 19 вариантов мутаций, все относились к виду миссенс-мутаций (Приложение. Таблица Б.3.1).

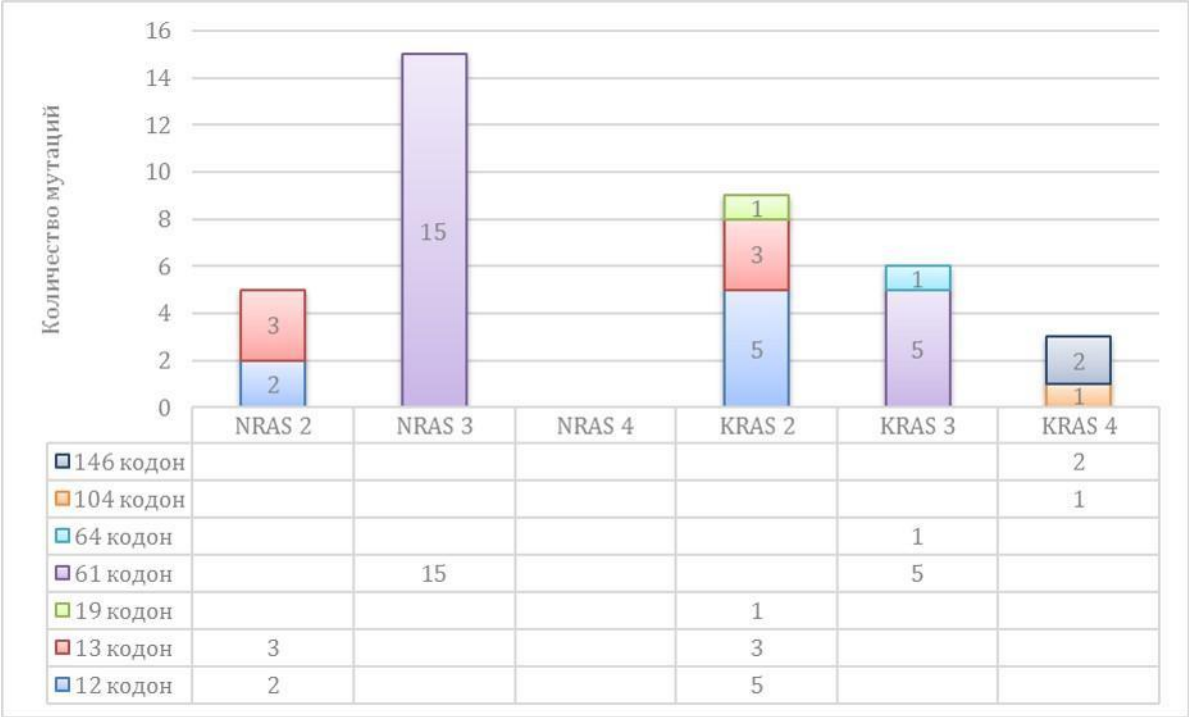



Рисунок 3.1 – Количество и позиции мутаций в кодонах генов *NRAS* и *KRAS*. Столбцы обозначают экзоны генов *NRAS* и *KRAS*: *NRAS* 2/3/4 — экзоны 2, 3 и 4; *KRAS* 2/3/4 — экзоны 2, 3 и 4. Столбцы окрашены в различные цвета. Каждый цвет соответствует определенному кодону. Например, в экзоне 2 гена *NRAS* выявлено 2 мутации в кодоне 12 и 3 — в кодоне 13.

В отличие от герминальных мутаций, которые обнаруживаются во всех клетках индивидуума, соматические мутации возникают непосредственно в процессе развития опухоли и являются характерной особенностью неопластических клеток. Экспрессия белка синдекан-1 (CD138) является уникальным маркером для плазматических клеток в КМ, поэтому используется в лабораторной практике для обогащения образца опухолевыми клетками пациента с ММ. В данном исследовании мы предположили, что мутации в генах *NRAS* и *KRAS* имеют соматический характер. С целью подтверждения этой гипотезы было выполнено параллельное секвенирование по Сенгеру локусов генов семейства *RAS* из ДНК CD138+ клеток и CD138- клеток, полученных из одного и того же образца КМ. На Рисунке 3.2 представлены два фрагмента хроматограмм, полученные в результате параллельного секвенирования образцов ДНК из CD138+ (плазматических) и CD138- (неплазматических) клеток КМ. На верхней хроматограмме, в позиции, соответствующей третьему нуклеотиду кодона 61 гена *KRAS*, видны два пика пониженной интенсивности. Эти два пика соответствуют аденину (зеленый) и тимину (красный). Таким образом, из рисунка видно, что в клетках CD138+ в третьей позиции 61 кодона в гене *KRAS* выявляется аденин и тимин одновременно. Следовательно, в части CD138+клеткок у пациента ММ211 в 61 кодоне гена *KRAS* детектируется мутация. Аналогичный анализ результатов

секвенирования того же фрагмента ДНК, полученной из клеток CD138- костного мозга этого же пациента, позволяет сделать вывод об отсутствии мутации в гене *KRAS* CD138- клеток.

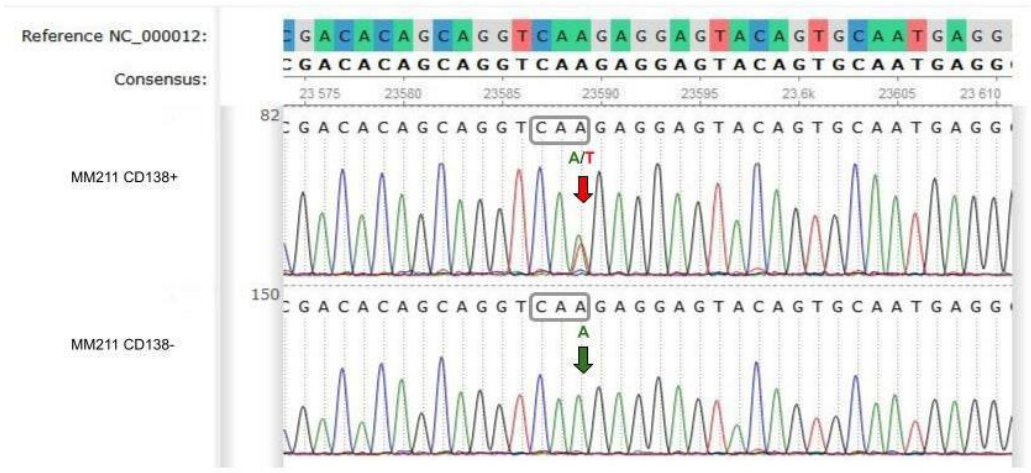



Рисунок 3.2 – Результат параллельного секвенирования гене *KRAS* в клетках CD138+ и CD138- пациента MM211 в. Верхняя хроматограмма - сиквенс CD138+ клеток, нижняя хроматограмма – сиквенс CD138-. 61 кодон гена *KRAS* «CAA» выделен серой рамкой. Красная стрелка на верхней хроматограмме указывает на замену нуклеотида в ДНК CD138+ клеток (выявляется мутация), зеленая стрелка на нижней хроматограмме показывает на то же положение в ДНК CD138- клеток.

Данное исследование было выполнено 8 пациентам для подтверждения соматического характера мутации. Параллельное секвенирование гена *NRAS* в клетках CD138+ и CD138- костного мозга было сделано для 7 пациентов, исследование гена *KRAS* проведено для одного пациента. У 6 пациентов не было выявлено мутаций в клетках, полученных из фракции CD138- . У двух пациентов в клетках CD138- были отмечены минорные пики, указывающие на наличие мутантного аллеля. Однако, наблюдаемые минорные пики были выражены значительно меньше, чем те, которые характеризуют аллели дикого типа. Возможно, при сепарации CD138+ клеток на магнитных колонках небольшое количество клеток смывается с колонки и контаминируют фракцию CD138-, это присутствие обнаруживается в процессе секвенирования, что приводит к выявлению минорного мутантного пика на хроматограмме образца CD138-. Таким образом, можно предположить, что мутации, обнаруженные в генах *NRAS* и *KRAS* характерны только для CD138+ клеток КМ у пациентов с ММ, имеют соматическую природу и являются характеристикой опухолевых клеток.

Для оценки функциональной значимости мутаций, детектированных в генах *NRAS*/*KRAS* у больных ММ использовали три биоинформатические предсказательные программы MutationTaster, Polyphen2, FATHMM-XF, а также современные рекомендации по интерпретации мутаций ClinGen/CGC/VICC [178].

Оценка онкогенности выявленных мутаций в генах *NRAS/KRAS* с применением актуальных критериев ClinGen/CGC/VICC позволила классифицировать их как варианты с высоким (7 баллов и более) уровнем онкогенного потенциала.

Анализ мутаций в генах *NRAS* и *KRAS* с использованием Polyphen2 выявил различный уровень патогенности среди мутаций, причем результаты использования обоих алгоритмов HumDiv и HumVar показывают относительно схожие результаты. По результатам анализа в гене *NRAS* наиболее опасной оказалась мутация Gly13Arg, эту мутацию можно отнести к «вероятно повреждающим». Следующей по значимости в рейтинге находится мутация в гене *NRAS* Gln61Leu, оценка риска которой отличается в алгоритмах HumDiv (0,925) и HumVar (0,688), хотя в обоих случаях она относится к категории «возможно повреждающая». Мутации в гене *NRAS* Gly12Ala и Gln61Lys с высоким рейтингом 0,848 и 0,861 («возможно повреждающая») в алгоритме HumDiv, оцениваются как менее опасные в HumVar; мутации Gln61His, Gln61Arg оцениваются обоими алгоритмами как одинаково, как «неповреждающие» (Таблица А.3.2).

Мутации Gly12Val, Gly12Ala, Leu19Phe, Tyr64Asn, Lys104Arg, Ala146Pro, Ala146Val в гене *KRAS* по оценке алгоритма HumDiv отличались наиболее высоким рейтингом - более 0,909 из 1. Из этого списка, мутация Gly12Ala по оценке HumVar относится к классу «возможно повреждающая» с рейтингом 0,773, остальные мутаций согласно модели HumVar также имеют наиболее высокий рейтинг. Можно отметить, что в нашем анализе алгоритм HumDiv вычислял для мутации более высокий рейтинг, чем HumVar. Для дальнейшего анализа обнаруженных генетических изменений мы выбрали алгоритм HumDiv, который рекомендован разработчиками для анализа аллелей, потенциально вовлеченных в комплексный фенотип. По результатам прогноза в гене *NRAS* наиболее опасной оказалась мутация Gly13Arg со значением 0,999 по шкале риска, в гене *KRAS* - шесть мутаций Gly12Val, Leu19Phe, Tyr64Asn, Lys104Arg, Ala146Pro, Ala146Val со значениями более 0,99 (Таблица А.3.2).

Программа FATHMM-XF обладает высокой точностью в вычислении драйверных онкогенных мутаций и поэтому была выбрана в качестве третьего независимого биоинформатического подхода для выявления функциональных различий в мутациях генов *NRAS* и *KRAS*. Анализ уровня патогенности мутаций, проведенный с использованием биоинформатической программы FATHMM-XF, показал, что все выявленные мутации являются онкогенными (Таблица 3.1). По результатам проведенного анализа мутации были распределены на две группы: «Онкогенная» (oncogenic) и «Онкогенная, высокая достоверность» (oncogenic, high confidence). Мутации, входящие в группу «Онкогенная, высокая достоверность», имеют

рейтинг более 0,9 в программы FATHMM-XF. Для мутаций в гене *NRAS* была выявлена одна наиболее онкогенная мутация Gln61Lys, для гена *KRAS* – 9 мутаций: Gly12Val, Gly12Asp, Gly12Ala, Gly13Asp, Gln61Arg, Tyr64Asn, Lys104Arg, Ala146Pro, Ala146Val.

В программе MutationTaster для анализа миссенс-мутаций использовали алгоритм «simple_aae», чувствительность которого составляет 0,879±0,007, специфичность составляет 0,893±0,04, точность (частное от числа правильно предсказанных мутаций, выявленных программой, поделенное на общее число мутаций) 0,886±0,004. С помощью данного алгоритма, мы обнаружили, что все мутации, выявленные у пациентов с ММ, могут быть причиной развития заболевания с вероятностью более 0,99 (Таблица 3.1). Таким образом, анализ мутаций с помощью программы MutationTaster классифицирует все детектированные нуклеотидные замены как мутации высокого риска, и не позволяет выявить отличий по онкогенности среди исследуемых мутаций.

Таблица 3.1 – Оценка прогностического значения мутаций в генах *NRAS* и *KRAS* с помощью биоинформатических предсказательных программ MutationTaster, PolyPhen2 и FATHMM-XF.

| Ген | Мутация | Вероятность по PolyPhen2 | Заключение PolyPhen2 | Вероятность по FATHMM-XF | Заключение FATHMM-XF | Вероятность по Mutation Taster | Заключение Mutation Taster |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *NRAS* | Gly12Ala | 0,848 | Возможно повреждающая | 0,84 | Онкогенная | 1 | Патогенная |
| | Gly12Asp | 0,488 | Возможно повреждающая | 0,86 | Онкогенная | 1 | Патогенная |
| | Gly13Asp | 0,434 | Неповреждающая | 0,86 | Онкогенная | 1 | Патогенная |
| | Gly13Arg | 0,999 | Вероятно повреждающая | 0,84 | Онкогенная | 1 | Патогенная |
| | Gln61Leu | 0,925 | Возможно повреждающая | 0,87 | Онкогенная | 1 | Патогенная |
| | Gln61Lys | 0,861 | Возможно повреждающая | 0,93 | Онкогенная (высокая достоверность) | 0,99 | Патогенная |
| | Gln61His | 0,124 | Неповреждающая | 0,75 | Онкогенная | 1 | Патогенная |
| | Gln61Arg | 0,085 | Неповреждающая | 0,88 | Онкогенная | 0,99 | Патогенная |
| *KRAS* | Gly12Val | 0,999 | Вероятно повреждающая | 0,92 | Онкогенная (высокая достоверность) | 1 | Патогенная |
| | Gly12Asp | 0,517 | Возможно повреждающая | 0,91 | Онкогенная (высокая достоверность) | 1 | Патогенная |
| | Gly12Ala | 0,956 | Возможно повреждающая | 0,92 | Онкогенная (высокая достоверность) | 1 | Патогенная |
| | Gly13Asp | 0,803 | Возможно повреждающая | 0,91 | Онкогенная (высокая достоверность) | 1 | Патогенная |

Продолжение Таблицы 3.1

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Leu19Phe | 1 | Вероятно повреждающая | 0,78 | Онкогенная | 1 | Патогенная |
| | Gln61Arg | 0,009 | Неповреждающая | 0,91 | Онкогенная (высокая достоверность) | 1 | Патогенная |
| | Gln61His | 0,033 | Неповреждающая | 0,81 | Онкогенная | 0,99 | Патогенная |
| | Tyr64Asn | 1 | Вероятно повреждающая | 0,91 | Онкогенная (высокая достоверность) | 1 | Патогенная |
| | Lys104Arg | 0,999 | Вероятно повреждающая | 0,91 | Онкогенная (высокая достоверность) | 0,99 | Патогенная |
| | Ala146Pro | 1 | Вероятно повреждающая | 0,97 | Онкогенная (высокая достоверность) | 0,99 | Патогенная |
| | Ala146Val | 0,998 | Вероятно повреждающая | 0,94 | Онкогенная (высокая достоверность) | 0,99 | Патогенная |

Результаты биоинформатического анализа свидетельствуют о том, что все выявленные генетические варианты обладают онкогенным потенциалом, подтвержденным как минимум двумя независимыми предикторами (FATHMM-XF и Mutation Taster). Большинство исследованных мутаций были классифицированы как повреждающие и онкогенные по данным всех трех программ; исключение составили замены Gly12Asp, Gln61His, Gln61Arg в гене *NRAS* и Gln61Arg, Gln61His в гене *KRAS*. На основании интегральной оценки шкал MutationTaster, Polyphen2 и FATHMM-XF была сформирована группа мутаций «высокого риска», характеризующаяся наибольшим суммарным баллом патогенности. В данную категорию вошли четыре варианта в гене *NRAS* (Gly12Ala, Gly13Arg, Gln61Leu, Gln61Lys) и восемь вариантов в гене *KRAS* (Gly12Val, Gly12Ala, Gly13Asp, Leu19Phe, Tyr64Asn, Lys104Arg, Ala146Pro, Ala146Val).

### 3.1.2. Взаимосвязь мутаций в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках и эффективности ответа на терапию триплетными схемами PAD/VCD больных с ММ

Анализ значимости мутаций в генах *NRAS/KRAS* проводился путем разделения пациентов на генетические группы в зависимости от типа выявленной мутации. Критерием сравнения между группами являлась глубина ответа на лечение.

Для оценки первичного противоопухолевого ответа после 6 курсов индукционной терапии (PAD/VCD) пациентов разделили на две группы. В первую группу ("достигшие глубокого ответа") вошли пациенты, достигшие полной ремиссии (ПР) или очень хорошей частичной ремиссии (ОХЧР) в соответствии с критериями IMWG (2016). Остальные пациенты, чей ответ был ниже ОХЧР, составили вторую группу ("не достигшие глубокого ответа").

Оценка глубины ответа на бортезомиб-содержащие курсы была проведена у 75 пациентов. Среди них 33 пациента оказались с мутацией в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках КМ, а без мутации – 42 больных. Для оценки функциональной значимости мутаций на эффективность терапии бортезомиб - содержащими препаратами был проведен частотный однофакторный анализ взаимосвязи наличия мутаций и глубины ответа на терапию к моменту окончания 6 курса химиотерапии. В группе пациентов с мутациями доля ответивших на курсы пациентов составила 11 человек (n=33, 33,3 %), в группе пациентов без мутаций 27 пациентов (n=42, 64%) (p=0.008, ОШ = 3.5 (ДИ95% 1,32-9,08)). Анализ показал, что у пациентов с впервые диагностированной ММ частота достижения глубокого ответа (ПР+ОХЧР) в группе без мутаций в генах *RAS* в два раза превышала аналогичный показатель в группе с наличием данных генетических нарушений (Рисунок 3.3). Таким образом, анализ выявил статистически значимую связь между наличием мутаций в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых плазматических клетках у пациентов с впервые диагностированной ММ и эффективностью индукционной терапии, включающей схемы PAD или VCD.

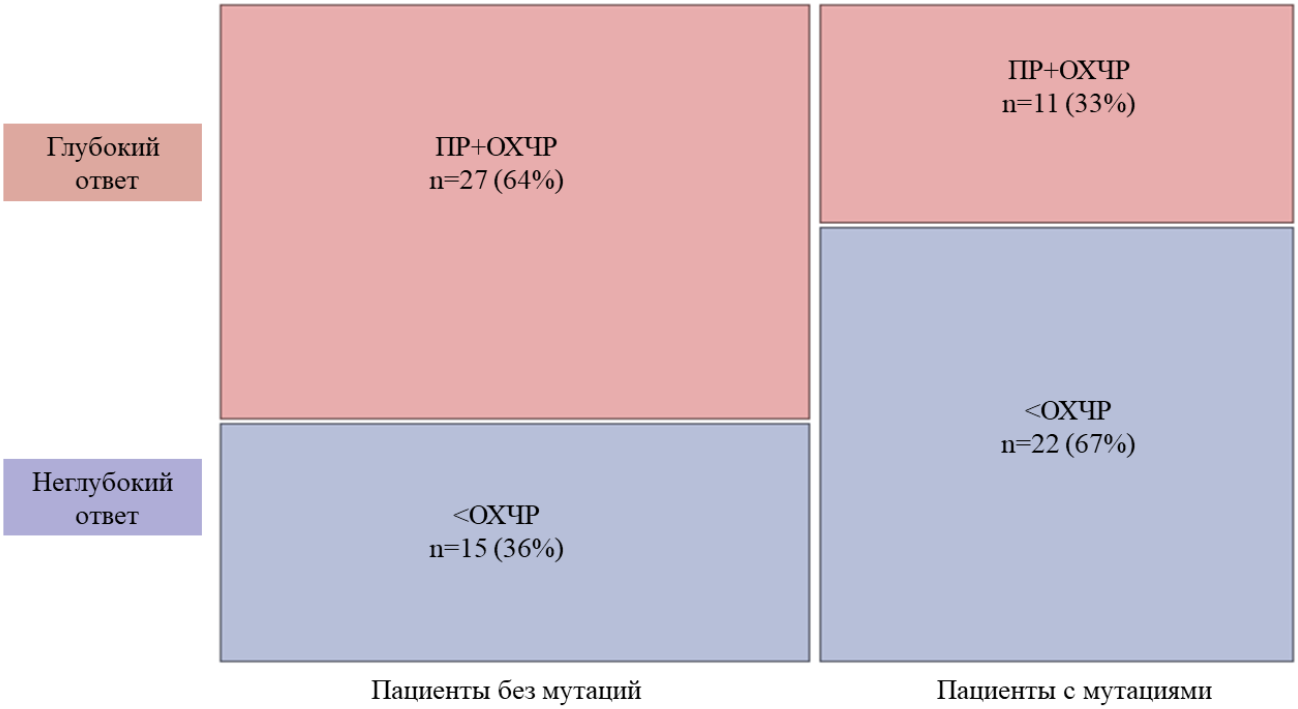



Рисунок 3.3 – Частота достижения глубокого противоопухолевого ответа (ПР + ОХЧР) у пациентов после 6 циклов индукционной терапии по трехкомпонентным схемам, включающим бортезомиб, в группах с наличием или отсутствием мутаций в генах семейства *RAS*. ОХЧР — очень хорошая частичная ремиссия; ПР — полная ремиссия. Зеленый цвет – доля пациентов, достигших ОХЧР+ПР, розовый цвет – доля пациентов, достигших только ответа менее, чем ОХЧР.

Пациентов, имеющих мутацию «высокого риска» на основании анализа *in silico* сопоставляли с группой пациентов с мутацией стандартного риска или без мутации. Группу «высокого риска» составили пациенты, у которых была обнаружена одна из следующих мутаций: в гене *NRAS* (Gly12Ala, Gly13Arg, Gln61Leu, Gln61Lys) и в гене *KRAS* (Gly12Val, Gly12Ala, Gly13Asp, Leu19Phe, Tyr64Asn, Lys104Arg, Ala146Pro, Ala146Val). В группу стандартного риска вошли пациенты с любой другой мутацией в генах *NRAS/KRAS* или без мутации. Всего в исследовании приняло участие 75 больных, 1 пациент был носителем одновременно 2 мутаций из разных групп риска и был исключен из анализа. После разделения пациентов на группы, группа «высокого риска» составила 16 человек, «стандартная» - 58 человек. Не было обнаружено статистически достоверных различий в глубине ответа на этапе индукционной терапии среди выделенных групп (Рисунок Б.3.1). В группе высокого риска доля ответивших пациентов составила 43,8 % (n=7), в стандартной - 51,7 % (n=30) (p =0.39, ОШ= 0,4522 (ДИ95% 0,45-4,2)).

Для оценки самостоятельного влияния мутаций в гене *KRAS* на глубину ответа на терапию был проведен анализ связи между наличием мутаций исключительно в гене *KRAS* и достижением глубокого ответа на терапию. Анализ данных показал наличие резистентности к лечению бортезомиб - содержащими схемами у больных с выявленной мутацией в гене *KRAS*: в группе больных с мутациями (n=15) 2 человека достигли ПР или ОЧХР (13,3%), в контрольной группе пациентов без мутаций в генах *KRAS/NRAS* (n=41) ответ на бортезомиб составил 63,41 % (p=0,0009, ОШ=11,27, (ДИ95% 2,23-56,8)). Таким образом, было выявлено, что у пациентов с впервые диагностированной ММ частота достижения глубокого ответа (ПР+ОХЧР) в группе без мутаций в генах семейства *RAS* более, чем в 4 раза превышала аналогичный показатель в группе с мутацией в гене *KRAS* (Рисунок 3.4).

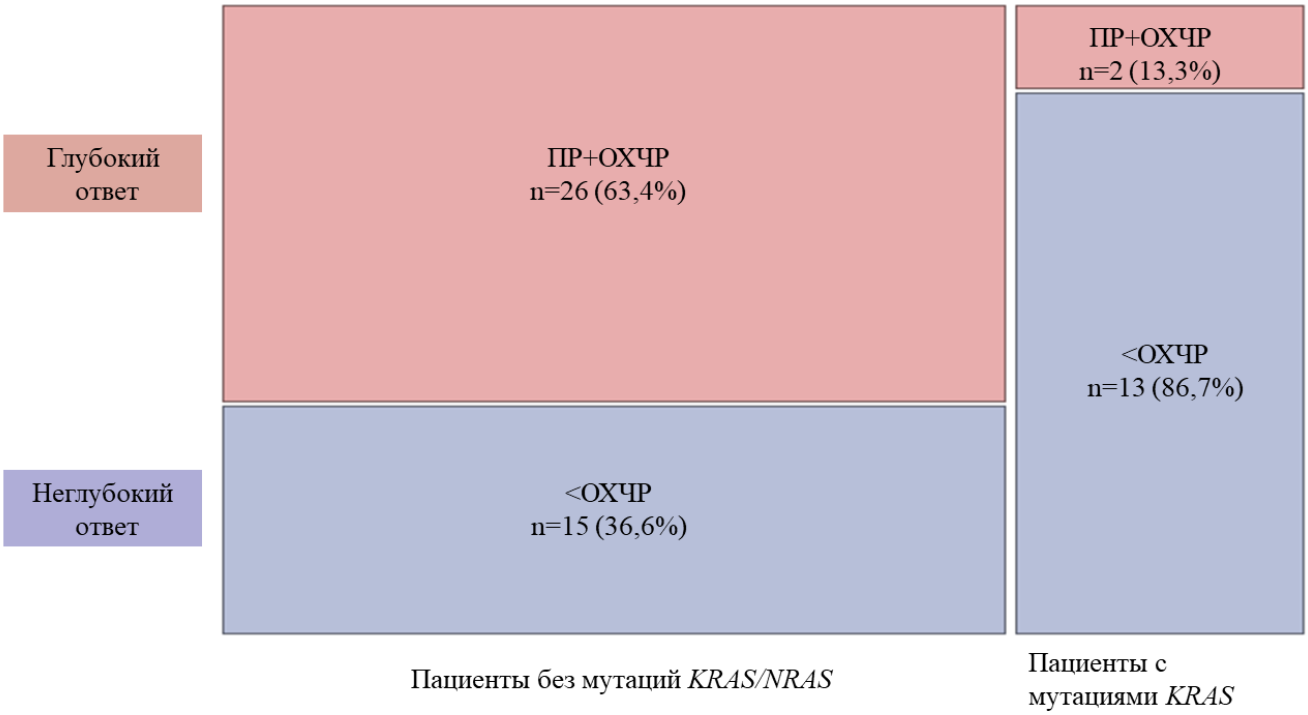



Рисунок 3.4 – Частота достижения глубокого противоопухолевого ответа (ПР + ОХЧР) у пациентов после 6 циклов индукционной терапии по трехкомпонентным схемам, включающим бортезомиб, в группах с наличием или отсутствием мутаций в гене *KRAS*. ОХЧР — очень хорошая частичная ремиссия; ПР — полная ремиссия.

В результате проведенного анализа статистически значимых различий в глубине ответа на индукционную терапию у пациентов с мутацией в гене *NRAS* по сравнению с контрольной группой выявлено не было. Пациенты в группе с мутацией *NRAS* (n=17) достигли глубокого ответа в 47,1% (n=8), а пациенты в контрольной группе без мутаций в генах *KRAS/NRAS* в 63,4%

(n=26) (Рисунок 3.5). Таким образом, определяется тенденция к сниженной глубине противоопухолевого ответа у пациентов-носителей мутации в гене *NRAS* (p=0,25, ОШ=1,95, (ДИ95% 0,62-6,13)). Возможно, такой результат объясняется назначением триплетов PAD и/или VCD, содержащих дексаметазон. Ранее было показано, что дексаметазон, в монорежиме нивелирует влияние мутаций в гене *NRAS* у больных ММ.

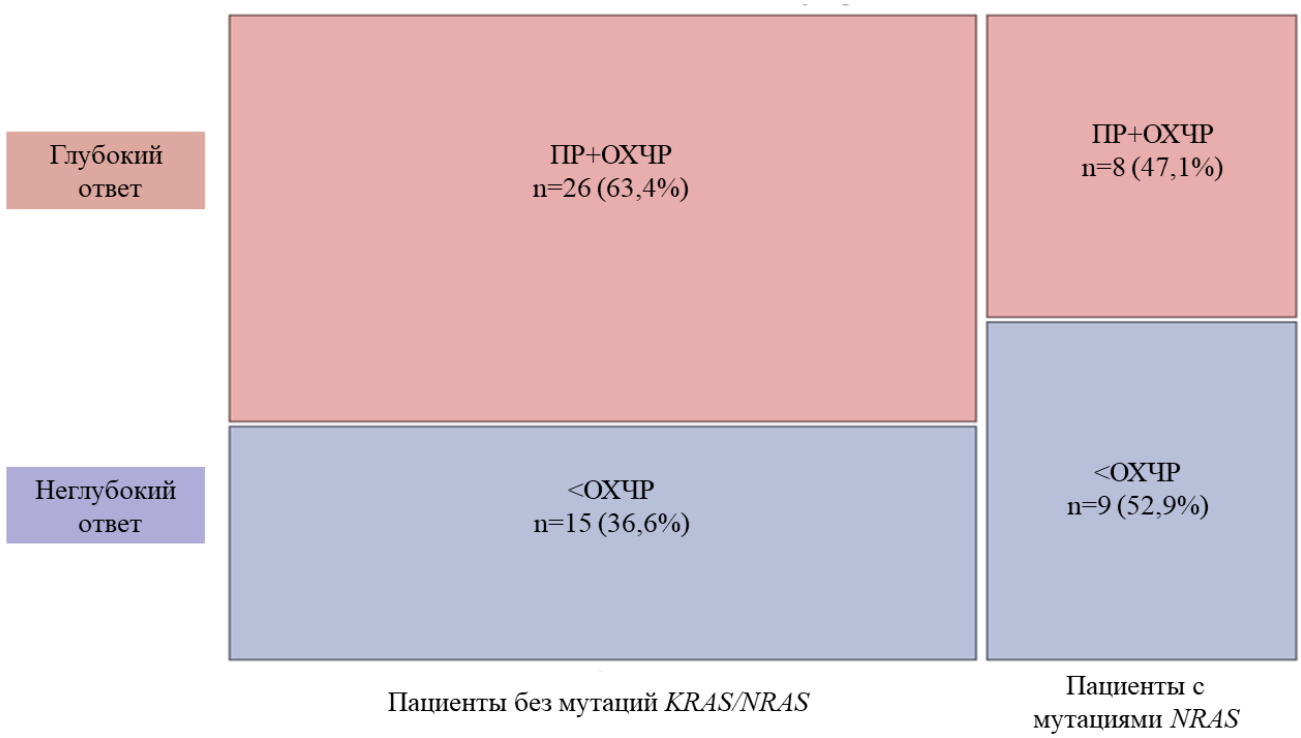



Рисунок 3.5 – Частота достижения глубокого противоопухолевого ответа (ПР + ОХЧР) у пациентов после 6 циклов индукционной терапии по трехкомпонентным схемам, включающим бортезомиб, в группах с наличием или отсутствием мутаций в гене *NRAS*. ОХЧР — очень хорошая частичная ремиссия; ПР — полная ремиссия.

В данном протоколе лечения применялся иммуномодулятор леналидомид, если ингибитор протеасом не являлся эффективным противоопухолевым средством. Было выявлено, что переход с бортезомиба на леналидомид чаще оказывается необходимым пациентам с мутацией в генах *NRAS/KRAS* (ОШ= 2,5 (ДИ95% 0,90-8,04), хотя пороговый уровень значимости не был достигнут (p>0,05). В то же время сравнение групп пациентов с мутациями в генах *KRAS* и без мутаций в этом гене показал, что смена терапии статистически значимо чаще назначалась пациентам с мутацией (p= 0,005, ОШ= 3,11 (ДИ95% 2,14-28,66)). Это объясняется отбором в группу пациентов, частично резистентных или полностью резистентных к бортезомибу.

Проведённый анализ показал, что наличие мутаций в генах семейства *RAS* ассоциировано со снижением эффективности индукционной терапии у пациентов с впервые диагностированной

ММ. Показано, что у больных с мутациями в генах *NRAS/KRAS* частота достижения глубокого противоопухолевого ответа (ПР и ОХЧР) после индукционной терапии по схемам PAD/VCD статистически значимо ниже по сравнению с пациентами без указанных генетических нарушений. Негативное влияние на терапевтический ответ преимущественно обусловлено мутациями в гене *KRAS*, связанными с резистентностью к бортезомиб-содержащим схемам и более частой сменой терапии, тогда как мутации в гене *NRAS* самостоятельного статистически значимого влияния на глубину ответа не оказывали. Биоинформатический анализ (MutationTaster, PolyPhen2, FATHMM-XF) подтвердил онкогенный потенциал всех выявленных мутаций и позволил выделить *in silico* группу высокого риска, однако клинически значимых различий в эффективности терапии между группами высокого и стандартного риска выявлено не было.

### 3.1.3. Анализ ОВ и ВБП в зависимости от типа мутации в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках у пациентов с ММ, получивших ауто-ТГСК

Для долгосрочных нблюдений (ВБП и ОВ) пациенты были разделены на группы в зависимости от проведения ауто-ТГСК. Среди пациентов, не получивших ауто-ТГСК, статистически значимых различий в ВБП и ОВ между группами с наличием и отсутствием мутаций в генах *KRAS/NRAS* выявлено не было ($p>0,05$).

В другую группу вошли 33 пациента, получивших ауто-ТГСК. Из них, у 14 были обнаружены мутации в генах *NRAS/KRAS,* 19 больных не были носителями мутации на момент диагностики.

При анализе ОВ в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в генах семейства RAS статистически значимых различий в группах пациентов обнаружено не было ($p>0,05$). Среднее время выживания и его стандартная ошибка были недооценены, поскольку наибольшее наблюдаемое значение было цензурировано, и оценка была ограничена временем наибольшего события.

Через 20 месяцев наблюдения выживаемость без прогрессии (ВБП) в группе пациентов с выявленными мутациями составила 59%, в то время как в группе без мутаций этот показатель достиг 94,7%. К 40 месяцам наблюдения показатели ВБП снизились до 30,4% и 62%

соответственно (Рисунок 3.6). Различия в выживаемости между группами, были статистически значимыми (p=0,05).

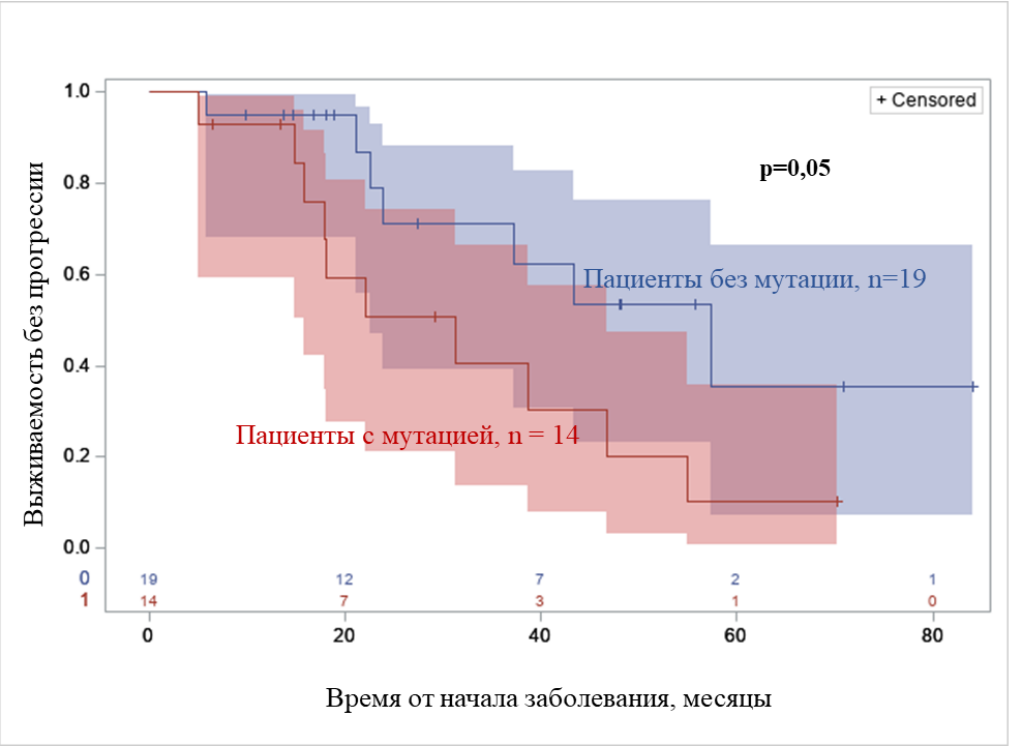



Рисунок 3.6 – Выживаемость без прогрессирования (ВБП) у больных, получивших ауто-ТГСК в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в генах *NRAS/KRAS*. Вертикальная ось – доля пациентов без рецидива/прогрессии заболевания. Красная линия – пациенты с мутацией в генах *NRAS/KRAS*, синяя линия – пациенты без мутации в генах *NRAS/KRAS*.

Группа пациентов с мутацией высокого риска, выделенных на основе предсказательных программ, составила 8 человек, а контрольная группа – 25 больных. Медиана выживаемости без прогрессии составила 18 месяцев для пациентов с мутацией высокого риска, и 43 месяца для пациентов без такой мутации (Рисунок 3.7). Однако, достоверных различий в вероятности прогрессии ММ у пациентов с мутаций высокого риска по сравнению с пациентами без мутаций высокого риска обнаружено не было (p=0,11).

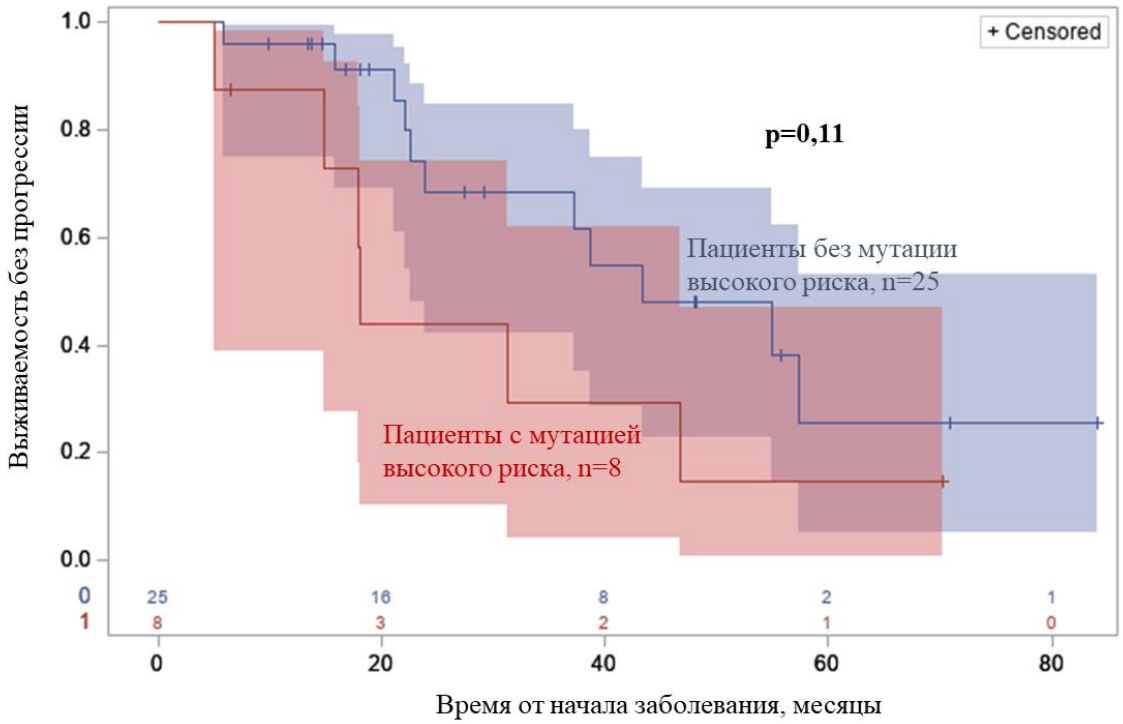



Рисунок 3.7. – Выживаемость без прогрессирования (ВБП) у больных, получивших ауто-ТГСК в зависимости от наличия или отсутствия мутаций высокого риска. Вертикальная ось – доля пациентов без рецидива/прогрессии заболевания. Красная линия – ВБП пациентов с мутацией высокого риска, синяя линия – без мутации в генах *NRAS/KRAS*.

Наличие мутации в гене *KRAS* соотносилось с худшей ВБП (p=0,03), медиана выживаемости составила 18 месяцев у лиц с мутацией и 57,4 месяца у пациентов без мутаций в генах *KRAS/NRAS* (Рисунок 3.8). Через 2 года от начала заболевнаия ВБП в группе с мутациями составила 20 %, в группе без мутаций - 75%. Таким образом, сопоставление ВБП в различных генетических группах пациентов, перенесших ауто-ТГСК, показало наличие достоверно более низкой ВБП у группы больных ММ с мутацией в гене *KRAS*.

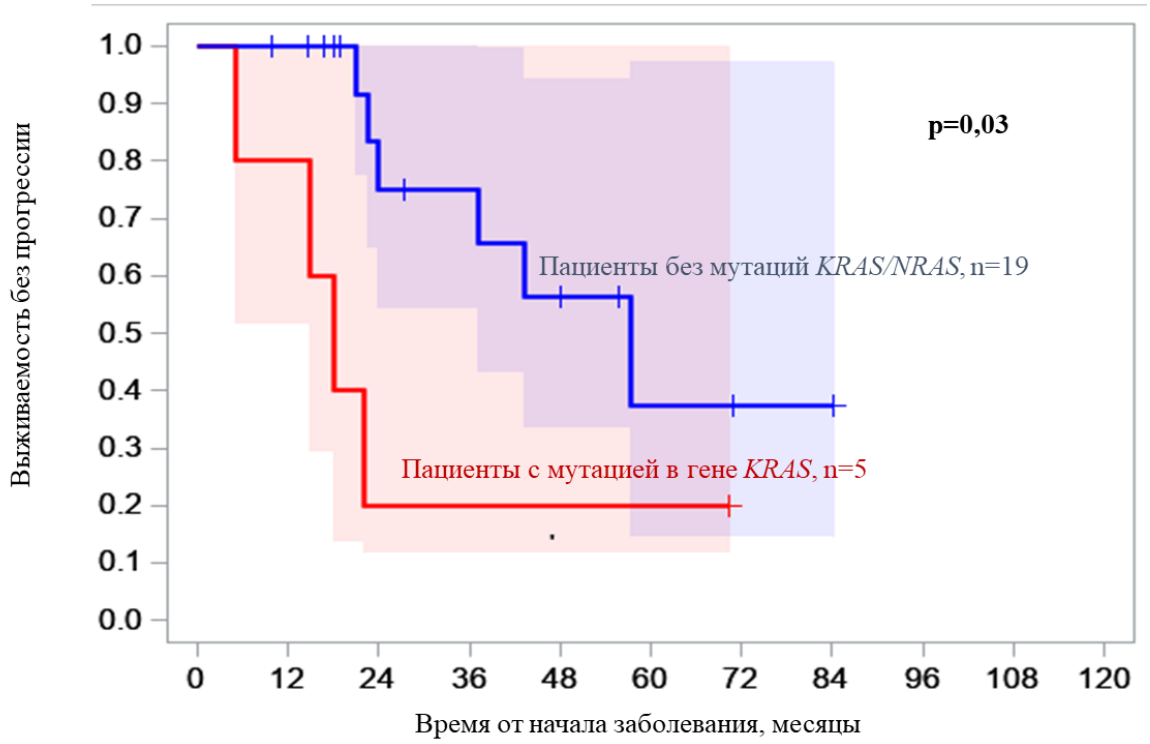



Рисунок 3.8 – Выживаемость без прогрессирования (ВБП) у больных, получивших ауто-ТГСК в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в гене *KRAS*. Вертикальная ось – доля пациентов без рецидива/прогрессии заболевания. Красная линия – пациенты с мутацией в гене *KRAS*, синяя линия – пациенты без мутации в гене *KRAS*.

Анализ кривых выживаемости не обнаружил статистически значимых отличий у группы пациентов с мутацией в гене *NRAS* по сравнению с группой пациентов с без мутаций в генах *KRAS/NRAS* (p=0,12). В группе пациентов с мутациями в гене *NRAS*, медиана ВБП составила 38,8 месяца, и 57,4 месяца у пациентов без мутаций в генах *KRAS/NRAS* (Рисунок 3.9). К 24 месяцам ВБП в группе с мутациями в гене *NRAS* составила 83 %, в группе без мутаций 75 %; к 36 месяцам от начала лечения - 63% и 75 % соответственно.

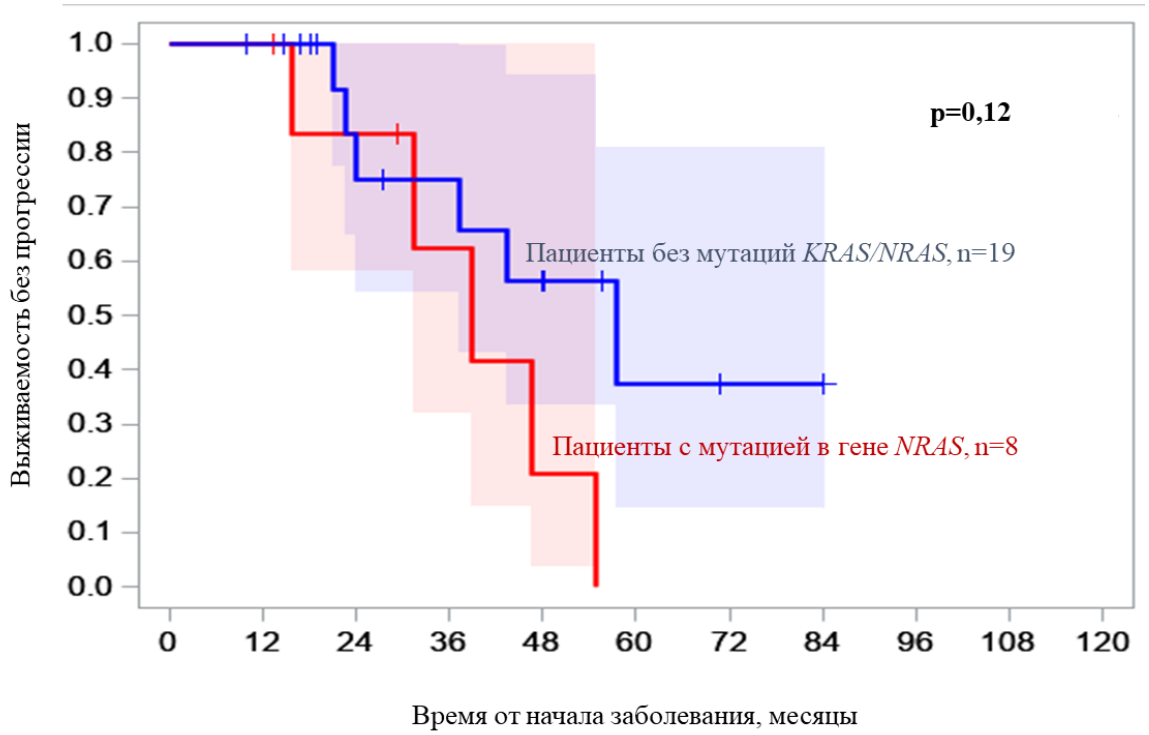



Рисунок 3.9. – Выживаемость без прогрессирования (ВБП) у больных, получивших ауто-ТГСК в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в гене *NRAS*. Вертикальная ось – доля пациентов без рецидива/прогрессии заболевания. Красная линия – пациенты с мутацией в гене *NRAS*, синяя линия – пациенты без мутации в гене *NRAS*.

Проведённый анализ ОВ и ВБП у пациентов с впервые диагностированной ММ, перенесших ауто-ТГСК, показал, что наличие мутаций в генах семейства *RAS* ассоциировано с неблагоприятным прогнозом, выражающимся в снижении показателей ВБП по сравнению с пациентами без данных генетических нарушений. Наиболее выраженное отрицательное влияние на ВБП было выявлено при наличии мутаций в гене *KRAS*, которые достоверно ассоциировались с более ранним развитием прогрессии заболевания и значительным снижением медианы ВБП. Мутации в гене *NRAS* не оказывали самостоятельного статистически значимого влияния на ВБП. Стратификация мутаций на основании биоинформатических предсказательных программ и выделение группы мутаций «высокого риска» не позволили выявить достоверных различий в ВБП, что указывает на ограниченную прогностическую ценность *in silico*-классификации для оценки ВБП в данной когорте пациентов.

### 3.1.4. Взаимосвязь клинико-лабораторных показателей и мутаций в генах *NRAS/KRAS* у пациентов с множественной миеломой

С целью оценки взаимосвязи клинико-лабораторных характеристик с наличием мутаций в генах *NRAS/KRAS* у пациентов с ММ был проведён сравнительный анализ клинических проявлений и лабораторных показателей в зависимости от мутационного статуса. Все пациенты были разделены на две группы: с наличием мутаций в генах *NRAS/KRAS* и без выявленных мутаций. В рамках анализа оценивались количество очагов деструкции костной ткани, частота встречаемости костных и экстрамедуллярных плазмоцитом, а также основные лабораторные показатели, отражающие опухолевую нагрузку и общее состояние пациентов: биохимические показатели в сыворотке крови (β2-микроглобулин, ЛДГ, альбумин, креатинин, гемоглобин), иммунохимические (тип и количество моноклонального иммуноглобулина), морфологические (% содержание ПК в костном мозге). В Таблице 3.3 представлены результаты сравнительного анализа клинических и лабораторных характеристик групп пациентов с мутациями и без данных мутаций.

Таблица 3.3 – Характеристика клинико-лабораторных параметров у пациентов в группах с наличием/отсутствием мутаций в генах *NRAS/KRAS*. Расчет отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ) не проводился для непрерывных количественных величин; в соответствующих графах таблицы проставлен прочерк (–).

| Параметры | Пациенты с мутацией в генах *NRAS/KRAS* | Пациенты без мутации в генах *NRAS/KRAS* | ОШ [95% ДИ] | *p* |
|---|---|---|---|---|
| Наличие костных плазмоцитом | 26/31 (83, 9%) | 29/47 (61, 7%) | 3,23 [1,05-9,53] | 0,04 |
| Наличие экстрамедуллярных плазмоцитом | 0/31 (0%) | 3/47 (6,25%) | 0,2 [0,01-4,06] | 0,43 |
| Наличие множественных остеодеструкций | 30/31 (96,8%) | 34/47 (72,3%) | 11,5 [1,4-93,8] | 0,006 |

Продолжение Таблицы 3.3

| | Медиана [МКИ] | | | |
|---|---|---|---|---|
| IgG, МЕ/мл | 299 [73,5-491,5] | 143 [81,3-526,0] | - | 0,91 |
| IgA, МЕ/мл | 43 [16,5-258] | 53 [26-282,5] | - | 0,88 |
| IgM, МЕ/мл | 34 [25,5-53,5] | 37 [33,3-54,5] | - | 0,35 |
| ПК в костном мозге, % | 30,8 [12,6-50,3] | 20 [11,1-31,9] | - | 0,39 |
| М-градиент, г/л | 26,9 [14,3-44,7] | 23,9 [6,2-44,0] | - | 0,5 |
| В2-микроглобулин, мг/л | 5,9 [3,3-12,6] | 5,4 [2,8-6,8] | - | 0,58 |
| ЛДГ, Е/л | 355,5 [262,3-455,5] | 340 [288-377] | - | 0,9 |
| Альбумин, г/л | 36,5 [29,8-39,1] | 39,1 [34,9-42,7] | - | 0,04 |
| Креатинин, мкмоль/л | 101,7 [82,3-164,0] | 73,5 [59,6-89,4] | - | 0,02 |
| Гемоглобин, г/л | 107 [86-123] | 109,5 [94-127] | - | 0,59 |

По результатам анализа было установлено, что у пациентов с мутациями в генах *NRAS/KRAS* статистически значимо чаще выявлялись костные плазмоцитомы по сравнению с группой без мутаций (83,9% и 61,7% соответственно; p=0,04). Шанс наличия костных плазмоцитом у пациентов с мутациями в 3,23 раза выше, чем у пациентов без этих мутаций. Кроме того, в группе пациентов с мутациями в генах *NRAS/KRAS* достоверно чаще регистрировались множественные очаги остеодеструкции (96,8% против 72,3%; p=0,006), при этом вероятность их выявления была выше в 11,5 раз (95% ДИ: 1,4–93,8). Анализ лабораторных показателей показал, что медианные значения процента ПК в костном мозге, уровней М-градиента, β2-микроглобулина, ЛДГ и гемоглобина не имели статистически значимых различий между сравниваемыми группами (p>0,05). В то же время уровень альбумина был статистически значимо ниже у пациентов с мутациями в генах *NRAS/KRAS* по сравнению с пациентами без мутаций (медиана 36,5 г/л против 39,1 г/л; p=0,04). Также в группе с мутациями отмечался более высокий уровень креатинина (медиана 101,7 мкмоль/л против 73,5 мкмоль/л; p=0,02).

В рамках дополнительного анализа была проведена оценка клинико-лабораторных характеристик пациентов с выявленными мутациями отдельно в гене *KRAS* и в гене *NRAS*. Значения клинико-лабораторных показателей у пациентов с мутацией одного гена сопоставлялись со значениями в группе без мутаций в генах *KRAS/NRAS*. Результаты сравнительного анализа представлены в Таблицах 3.4 и 3.5. Сравнительный анализ клинических и лабораторных параметров показал, что костные плазмоцитомы чаще выявлялись у пациентов с мутацией в гене *KRAS* по сравнению с пациентами без мутаций в генах *KRAS/NRAS* (86,7% против

66,7%), однако различия не достигали статистической значимости (ОШ = 4,03; 95% ДИ 0,81–20,0; p = 0,07), что указывает на выраженную тенденцию. Экстрамедуллярные плазмоцитомы в группе пациентов с мутацией в гене *KRAS* не выявлялись, тогда как в группе без мутаций они были зарегистрированы у 3 пациентов. Различия между группами не были статистически значимыми (p = 0,44). Множественные остеодеструкции наблюдались у большинства пациентов обеих групп, чаще — при наличии мутации в гене *KRAS* (93,3% против 72,3%), таким образом выявлена тенденция к более выраженному остеодеструктивному процессу при наличии мутации в опухоли в гене *KRAS* (ОШ = 3,8; 95% ДИ 0,63–22,8; p = 0,09). Уровни иммуноглобулинов IgG, IgA и IgM между группами статистически значимо не различались (p = 0,22; p = 0,93; p = 0,52 соответственно). Процент плазматических клеток в костном мозге был сопоставим в обеих группах (p = 0,74). В то же время медиана М-градиента была статистически значимо выше у пациентов с мутацией *KRAS* по сравнению с пациентами без мутаций (42,9 [14,8–64,4] г/л против 23,9 [7–40,7] г/л; p = 0,04), что может свидетельствовать увеличенном объеме опухолевой популяции клеток у данной категории пациентов. Уровни β2-микроглобулина и ЛДГ не различались между группами (p = 0,75 и p = 0,63 соответственно). Медиана уровня альбумина была статистически значимо ниже у пациентов с мутацией в гене *KRAS* (32 [25–37,2] г/л) по сравнению с пациентами без мутаций (39 [34,9–42,5] г/л; p = 0,007), что может отражать более неблагоприятный биологический профиль заболевания. Уровень креатинина статистически значимо был повышен в группе пациентов с мутацией *KRAS* (p = 0,04). Значимых различий по уровню гемоглобина также выявлено не было (p = 0,66).

Таблица 3.4 – Характеристика клинико-лабораторных параметров у пациентов в группах с наличием/отсутствием мутаций в генах *KRAS*. Расчет отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ) не проводился для непрерывных количественных величин; в соответствующих графах таблицы проставлен прочерк (–).

| Параметры | Пациенты с мутацией в генах *KRAS* | Пациенты без мутации в генах *KRAS/NRAS* | ОШ [95% ДИ] | *p* |
|---|---|---|---|---|
| Наличие костных плазмоцитом | 13/15 (86, 7%) | 29/47 (61, 7%) | 4,03 [0,81-20,0] | 0,07 |
| Наличие экстрамедуллярных плазмоцитом | 0/15 (0%) | 3/47 (6, 3%) | 0,41 [0,02-8,39] | 0,44 |
| Наличие множественных остеодеструкций | 14/15 (93, 3%) | 34/47 (72, 3%) | 3,8 [0,63-22, 8] | 0,09 |
| | Медиана [МКИ] | | | |
| IgG, МЕ/мл | 392 [85-686] | 143 [77-495] | - | 0,38 |
| IgA, МЕ/мл | 43 [18-215] | 53 [18-225,5] | - | 0,89 |
| IgM, МЕ/мл | 34 [26-47] | 37 [24-57,5] | - | 0,40 |
| ПК в костном мозге, % | 33 [9,6-49] | 20 [13,2-44] | - | 0,91 |
| М-градиент, г/л | 42,9 [14,8-64,4] | 23,9[7-40,7] | - | 0,04 |
| В2-микроглобулин, мг/л | 5,4 [3,1-13,4] | 5,6 [3-11,4] | - | 0,69 |
| ЛДГ, Е/л | 367 [270,8-460,3] | 340 [290,5-402,5] | - | 0,55 |
| Альбумин, г/л | 32 [25-37,2] | 39 [34,9-42,5] | - | 0,007 |
| Креатинин, мкмоль/л | 105,2 [86-127] | 73,5 [66-147,5] | - | 0,04 |
| Гемоглобин, г/л | 95[79,5-126] | 109,5 [86,3-122] | - | 0,66 |

При сравнительном анализе клинических и лабораторных показателей у групп пациентов с мутацией в гене *NRAS* и без мутаций в генах *KRAS/NRAS* (Таблица 3.5), было обнаружено, что костные плазмоцитомы выявлялись несколько чаще у пациентов с мутацией в гене *NRAS* по сравнению с пациентами без мутаций (80% против 61,7%), однако различия не достигали статистической значимости (ОШ = 2,06; 95% ДИ 0,53–8,07; p = 0,18). Экстрамедуллярные плазмоцитомы в группе пациентов с мутацией в гене *NRAS* не выявлены. У всех пациентов с мутацией в гене *NRAS* (100%) выявлялись множественные остеодеструктивные изменения, тогда как в группе без мутации в гене *NRAS* данный признак отмечался у 72,3% пациентов. Различия достигли статистической значимости (ОШ = 12,13; 95% ДИ 1,02-217,6; p = 0,02)., что указывает на выраженную ассоциацию этих мутаций с более значительным поражением костной ткани.

Статистически значимых различий между группами по иммунологическим и лабораторным показателям выявлено не было. Процент плазматических клеток в костном мозге имел тенденцию к более высоким значениям у пациентов с мутацией в гене *NRAS*, однако различия не достигли статистической значимости (p = 0,19). Медианы М-градиента, β2-микроглобулина и ЛДГ между группами были сопоставимыми (p = 0,53; p = 0,62; p = 0,72 соответственно). Уровни альбумина, креатинина и гемоглобина также не различались между пациентами с мутацией в гене *NRAS* и без неё (p = 0,52; p = 0,14; p = 0,68 соответственно).

Таблица 3.5 – Характеристика клинико-лабораторных параметров у пациентов в группах с наличием/отсутствием мутаций в генах *NRAS*. Расчет отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ) не проводился для непрерывных количественных величин; в соответствующих графах таблицы проставлен прочерк (–).

| Параметры | Пациенты с мутацией в генах *NRAS* | Пациенты без мутации в генах *KRAS/NRAS* | ОШ [95% ДИ] | *p* |
|---|---|---|---|---|
| Наличие костных плазмоцитом | 12/15 (80%) | 29/47 (61, 7%) | 2,06 [0,53-8,07] | 0,18 |
| Наличие экстрамедуллярных плазмоцитом | 0/15 (0%) | 3/47 (6, 3%) | 0,41 [0,02-8,39] | 0,44 |
| Наличие множественных остеодеструкций | 15/15 (100%) | 34/47 (72, 3%) | 12,13 [1,02-217,6] | 0,02 |
| | Медиана [МКИ] | | | |
| IgG, МЕ/мл | 228 [59,5-379] | 143 [85,8-505,8] | - | 0,31 |
| IgA, МЕ/мл | 45 [16-362,5] | 53 [34,5-483] | - | 0,92 |
| IgM, МЕ/мл | 34 [16,5-57,5] | 37 [31-70,3] | - | 0,53 |
| ПК в костном мозге, % | 28 [14-54] | 20 [11-33,4] | - | 0,19 |
| М-градиент, г/л | 23,8 [5,4-36,6] | 23,9 [11,6-43,8] | - | 0,53 |
| В2-микроглобулин, мг/л | 7 [4,8-12] | 5,4 [3-16,4] | - | 0,62 |
| ЛДГ, Е/л | 336[262,3-430,8] | 340 [298,5-428,3] | - | 0,72 |
| Альбумин, г/л | 39 [36,1-40,7] | 39,1 [36,4-42,1] | - | 0,52 |
| Креатинин, мкмоль/л | 95,5 [76,8-175,5] | 73,5 [64,8-95,1] | - | 0,14 |
| Гемоглобин, г/л | 107 [90,5-117,5] | 109 [78-121,3] | - | 0,68 |

Результаты анализа клинико-лабораторных характеристик пациентов с выявленными мутациями из группы высокого риска *in silico* приведены в Таблице Б.3.3 в приложении. Анализ показал, что клинические проявления, такие как костные плазмоцитомы чаще выявлялись у

пациентов группы высокого риска с мутациями по сравнению с пациентами без мутаций (86,7% против 66,7%), однако различия не достигали статистической значимости (ОШ = 3,25; 95% ДИ 0,67–15,75; p = 0,13), что указывает на наличие тенденции. Множественные остеодеструкции регистрировались у всех пациентов с мутациями (100%) и у 77,8% пациентов без мутаций. Несмотря на более высокую частоту данного признака в группе с мутациями, различия не достигали статистической значимости (p = 0,13). По лабораторным показателям различий в группах пациентов с мутацией и без мутации обнаружено не было.

Таким образом, у пациентов с мутациями в генах семейства *RAS* чаще выявлялись поражения костной ткани, включая костные плазмоцитомы и остеодеструкции, а также были изменены лабораторные показатели: снижен альбумин и повышен креатинин. Мутации в генах *KRAS* ассоциированы с этими лабораторными показателями, в отличие от мутаций в генах *NRAS*. Анализ клинико-лабораторных показателей пациентов из группы высокого риска, выделенной на основании предсказательных программ, не выявил статистически значимых отличий от остальных пациентов, что говорит о недостаточной чувствительности данных программ.

### 3.1.5. Сочетание мутаций в генах *NRAS/KRAS* с цитогенетическими аберрациями высокого риска.

Выявленный неблагоприятный эффект мутаций в генах *NRAS/KRAS* (разделы 3.1.2-3.1.4) может быть связан с тем, что мутация в опухоли ассоциирована с другими генетическим аберрациями, связанными с плохим прогнозом. Для проверки этой гипотезы мы проанализировали частоту встречаемости сочетанных генетических аберраций: мутаций в генах *NRAS/KRAS* и цитогенетических аномалий высокого риска (Таблица 3.6). Статистически значимых ассоциаций выявлено не было, что указывает на то, что в исследуемой выборке мутации в генах *NRAS/KRAS* не встречались одновременно с цитогенетическими аберрациями высокого риска по системе стадирования R2-ISS.

Таблица 3.6 – Ассоциация мутаций в генах *NRAS/KRAS* с цитогенетическими аберрациями высокого риска по R2-ISS.

| Выявленные цитогенетические аберрации | Пациенты с мутацией в генах *KRAS/NRAS* | Пациенты без мутации в генах *KRAS/NRAS* | ОШ [95% ДИ] | *p* |
|---|---|---|---|---|
| t(4;14) | 5/26 (19,2%) | 3/28 (10, 7%) | 1,9 [0,43-8,09] | 0,46 |
| del17p | 0/26 (0%) | 0/28 (0%) | 1,1 [0,02-56,27] | >0,99 |
| amp1q21 | 5/26 (19,2%) | 5/28 (17,9%) | 1,1 [0,29-4,14] | >0,99 |
| Любая аберрация высокого риска | 8/26 (30,8%) | 7/28 (25%) | 1,3 [0,43-4,36] | 0,76 |

## 3.2. Анализ экспрессии генов в опухолевых клетках больных с множественной миеломой

В целях обеспечения достоверности оценки транскриптомных профилей был проведен контроль качества и анализ информативности данных РНК-секвенирования (раздел 3.2.1), сопоставимости результатов количественной оценки экспрессии генов методами ПЦР-РВ и РНК-секвенирования.

### 3.2.1. Контроль качества и анализ информативности данных РНК-секвенирования

РНК-секвенирование было выполнено 62 пациентам с ММ и 11 донорам. РНК- секвенирование представляет собой надежный и высоко автоматизированный метод измерения экспрессии множества генов. Однако, для широкого использования этих данных необходимо удостовериться, что измерения характеризуют биологические свойства опухолевых клеток, а не технические особенности проведения эксперимента. Качество образца является важным фактором, определяющим достоверность транскриптомных данных полученных в результате многоэтапного процесса РНК-секвенирования. Основные сложности, связанные с особенностями данного анализа, заключались в следующем: обеспечение достаточным

количеством опухолевых клеток из аспирата костного мозга больного; получение препаратов с высоким процентом опухолевых ПК; предотвращение деградации РНК в процессе пробоподготовки; и обеспечение надлежащего качества проведения РНК-секвенирования.

Результаты оценки представленности CD138+ клеток, уровень целостности РНК, и основные метрики, отражающие качество проведения РНК-секвенирования представлены в Таблице 3.4. Уровень обогащения CD138+ клетками образцов был высоким (медиана составила 94%) (Приложение.Таблица Б.3.4). Другой характеристикой наличия опухолевых клеток в образце являлось наличие доминирующей экспрессии только одного гена иммуноглобулинов, этот признак используется в качестве дополнительного критерия контроля качества данных РНК-секвенирования при лимфоидных новообразованиях с секрецией парапротеина [179]. Для контроля качества данных РНК-секвенирования, мы проанализировали экспрессию генов иммуноглобулинов: в 59 из 62 образцов пациентов мы могли выделить доминирующую экспрессию одного гена иммуноглобулина, что составило 95,2%. Медиана значения RIN составила 3,9, образцы с низким значением RIN были исключены из исследования. Медианное число прочтений составило 35,2 млн на образец, что обеспечивает достаточную глубину покрытия для надежного анализа дифференциальной экспрессии генов. Медианное значение уникально сопоставленных прочтений составило 10,23 млн, что соответствует высоким стандартам качества экспериментов с использованием метода РНК-секвенирования. Уровень амплификации составил 4,71%, что значительно ниже порогового значения 50%. Для всех образцов более 90% оснований имели значение качества ≥ Q30 и 93,1% прочтений имели более 95% однозначно определенных нуклеотидов, что свидетельствует о высокой точности секвенирования (Таблица 3.7 и Приложение.Таблица Б.3.5).

Таблица 3.7 – Количественные характеристики образцов пациентов и доноров, которым было выполнено РНК-секвенирование.

| Количественные характеристики образцов | Значения | Образцы, Прошедшие контроль качества по данной метрике |
|---|---|---|
| | Медиана [МКИ] | n, % |
| CD138+ клеток, % | 94 [82,8-96] | 46/52 (88,5%) |
| Индекс RIN | 3,9 [3,2-5,2] | 2/72 (97,2%) |
| Число прочтений, млн | 35,17 [31,54-8,41] | 71/72 (98, б%) |
| Выровненные прочтения, % | 89,1 [67,16-95,52] | 55/72 (76,4%) |
| Уникально выровненные прочтения, млн | 10,23 [6,34-12,39] | 65/72 (90,3%) |
| Уровень амплификации, % | 4,71 [2,36-11,45] | 68/72 (94,4%) |
| GC состав, % | 52,965 [50,06-55,04] | 3/72 (4,2%) |
| Phred Score >30, >90% | не применимо | 72/72(100%) |
| Качество прочтения образца, >95% | не применимо | 67/71 (93, 1%) |
| Моноклональная экспрессия Ig | не применимо | 59/62 (95, 2%) |

Помимо количественной метрики контроля качества, для интегративного анализа данных экспрессии генов была применена иерархическая кластеризация с использованием метода Уорда (Ward); в качестве метрики расстояния использовали евклидово расстояние (Рисунок 3.10). Согласно литературным данным, профили экспрессии генов существенно различаются между нормальными и опухолевыми ПК при ММ. В соответствии с этим, за исключением одного образца, образцы доноров формировали компактный кластер на дендрограмме и четко отделялись от образцов пациентов с ММ.

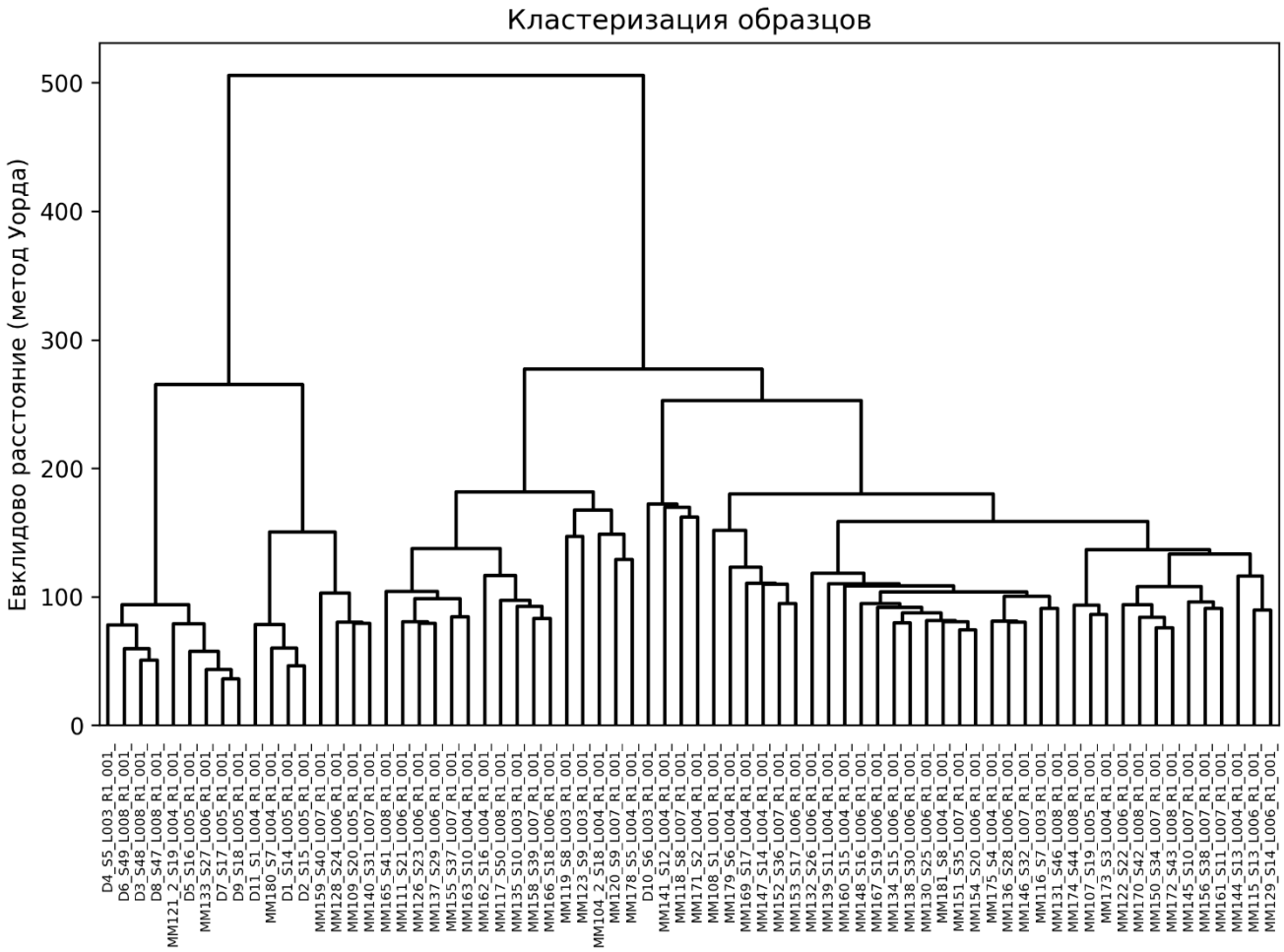



Рисунок 3.10 – Кластерный анализ образцов опухолевых клеток доноров и пациентов на основании данных транскриптома. D-образцы доноров, ММ -образцы пациентов с ММ.

Нами были использованы другие метода визуализации (Рисунок 3.11). Метод главных компонент (PCA, principal component analysis) и методы многомерного шкалирования используются для уменьшения размерности данных РНК-секвенирования и визуализации данных в 2-3 мерном пространстве. Для вычисления главных компонент и отображения в плоскости первых двух главных компонент использованы образцы доноров (синие) и пациентов (оранжевые). Перед выполнением анализа данные были нормализованы и подвергнуты логарифмической трансформации для обеспечения сопоставимости образцов. В анализ было взято 2000 генов с наибольшей вариабельностью экспрессии. Результаты PCA представлены на графике, где каждая точка соответствует образцу, координаты по горизонтали и вертикали соответствуют значениям первых двух главных компонент, а расстояния между точками отражают степени схожести в экспрессии генов. Это позволило

выявить группы образцов пациентов, которые формировали отдельный кластер и доноров, которые располагались менее компактно, но были отделены от пациентов.

На основании анализа качественных и количественных характеристик прочтений (FASTQC) и визуализации данных, полученных в результате РНК-секвенирования образцов пациентов и доноров, была проведена комплексная оценка качества образцов на всех этапах процессирования материала (Рисунки Б.3.2, Б.3.3, Б.3.4 в приложении). Были исключены образцы пациентов, которые пересекаются с группой доноров и имеют содержание плазматических клеток менее 30% (MM121, MM133, MM180), три образца доноров, которые расположены ближе к образцам пациентов, имеют невысокий уровень обогащения CD138+ клеткам (D4, D6, D8) и образец донора, который расположен наиболее удаленно от других (D10). На рисунке 3.11 исключенные образцы представлены стрелками. Также из анализа были исключены образцы пациентов, которые расположены менее скученно и ближе к образцам доноров, которые ранее были маркированы MM104, MM108, MM118, MM119, MM120, MM123, MM128, MM140, MM141, MM145, MM159, MM171. Таким образом, с помощью метода главных компонент, было получено подтверждение в правильности оценки образцов предыдущими методиками и позволило выделить образцы высокого качества, которые отражают биологические особенности образцов ПК пациентов и доноров.

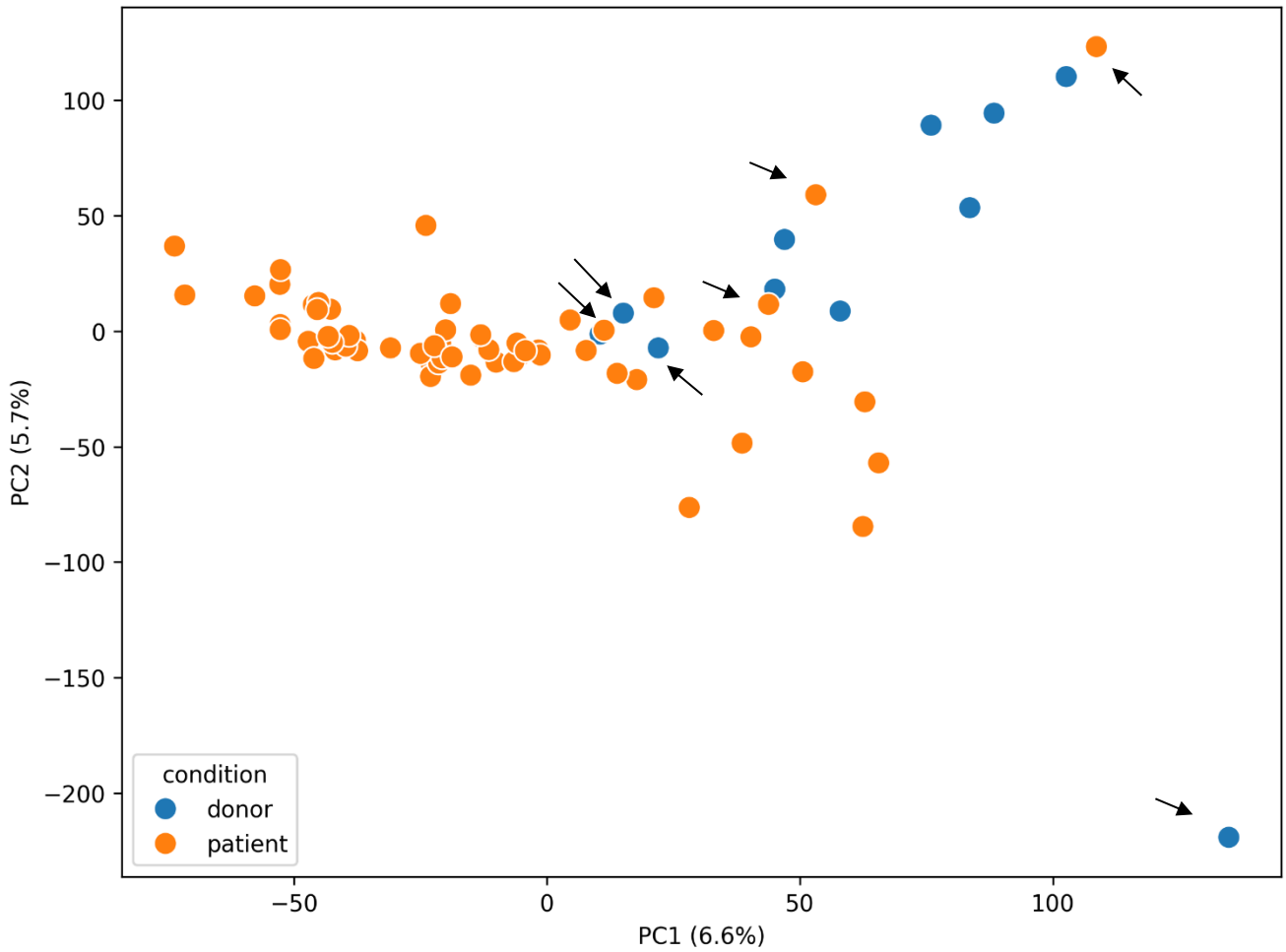



Рисунок 3.11 – Анализ распределения образцов с использованием метода главных компонент. Образцы ПК доноров – синие точки, образцы ПК пациентов – красные точки. PC1, PC2 – значения первых двух главных компонент. Стрелками указаны исключенные образцы MM121, MM133, MM180, D4, D6, D8, D10.

На основании данных о содержании ПК в образце, уровне целостности РНК, метрик контроля качества FASTQC, и интегративного кластерного анализа оценки качества данных после секвенирования были выбраны наиболее информативные образцы: в статистический и функциональный анализы взяты 46 образцов пациентов и 7 образцов доноров, для которых данные транскриптомного анализа отражают биологические закономерности, и не являются результатом технических проблем процессирования материала (Таблица Б.3.6).

### 3.2.2. Сравнительный анализ методов количественной оценки экспрессии генов: полимеразной цепной реакции в реальном времени и РНК-секвенирования

Для достоверной интерпретации данных транскриптомного исследования на первом этапе были сопоставлены результаты, полученные методами ПЦР-РВ и РНК-секвенирования. При этом, надо отметить невозможность напрямую сравнить значения экспрессии генов, полученных методами ПЦР-РВ и РНК-секвенирования из-за различной технологии подсчета. При подсчете данных ПЦР-РВ проводится нормализация на экспрессию одного референсного гена, РНК-секвенировании - нормализация на усредненные значения экспрессии множества референсных генов - метод DeSeq2). Для оценки методов ПЦР-РВ и РНК-секвенирования оценили различия в уровне экспрессии генов сигнального каскада RAS/ERK в группах пациентов и доноров для обоих методов. Сравнение уровней экспрессии генов *BRAF, MEK1, MEK2, ERK1, ERK2* проводилось между образцами опухолевых клеток при ММ и нормальных ПК доноров. Анализ выполнили на 14 образцах пациентов и 5 образцах доноров.

Уровни экспрессии в группах пациентов и доноров (Медиана [МКИ]) представлены в Таблице 3.8. Экспрессию киназ в группах пациентов и доноров проанализировали с использованием критерия Уилкиксона, $p < 0,05$ (Рисунок 3.12).

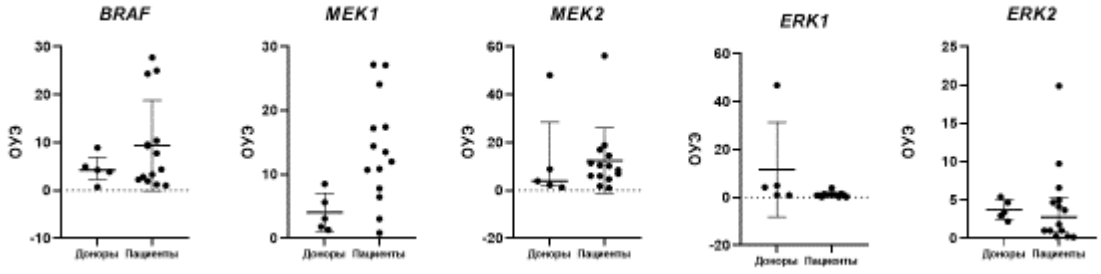



Рисунок 3.12 – Относительный уровень экспрессии генов *BRAF, MEK1, MEK2, ERK1, ERK2* протеинкиназного каскада в ПК 14 пациентов (ММ) и 5 доноров (D), измеренный с помощью ПЦР-РВ. Точка на графике - отдельный образец, горизонтальные линии – медиана и квартили (25%,75%).

Статистически значимые различия получены для гена *MEK1* (p=0,02). *MEK1* экспрессируется более интенсивно, а ген *ERK1* характеризовался тенденцией к пониженной экспрессией в опухолевых клетках по сравнению с нормальными ПК.

В ПЦР-РВ за основу расчета уровня экспрессии брали разницу пороговых значений циклов (ΔCt) между целевыми генами и геном домашнего хозяйства *HMBS*. Общепринятым является использование нескольких генов домашнего хозяйства для более точной нормализации, однако ограниченность количества РНК в клинических образцах не позволила нам применить этот подход ко всей выборке. При проверке 10 образцов мы обнаружили, что *HMBS* не всегда стабильно экспрессируется в плазматических клетках: в двух случаях экспрессия *HMBS* значительно отличалась от средней геометрической экспрессии четырех других референсных генов (Таблица Б. 3.8). Поэтому данные РНК-секвенирования для обеспечения сопоставимости с результатами ПЦР-РВ, были дополнительно нормализованы относительно уровня экспрессии *HMBS*. Результаты анализа экспрессии генов в группах пациентов и доноров представлены в Таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Сопоставление результатов, полученных методом ПЦР-РВ и РНК-секвенированием. Изменение экспрессии гена в опухолевых клетках пациентов с ММ по отношению к нормальным ПК доноров.

| ПЦР-РВ | | | | РНК-секвенирование | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Доноры | Пациенты | | | Доноры | Пациенты | |
| Гены | Медиана [МКИ], ОУЭ | | *p* | Гены | Медиана [МКИ], ОУЭ | | *p* |
| *BRAF* | 4,3 [2,3-6,9] | 6,1 [2,2-13,9] | 0,5 | *BRAF* | 1,2 [0,7-1,35] | 3,9 [2,9-4,9] | 0,0014 |
| *MEK1* | 3,1 [1,6-7,1] | 12,8 [7,5-19,1] | 0,02 | *MEK1* | 0,6 [0,5-0,9] | 1,8 [1,5-2,4] | 0,0009 |
| *MEK2* | 3,9 [1,8-28,5] | 9,4 [5,7-15,1] | 0,39 | *MEK2* | 1,1 [0,8-1,9] | 4,4 [4,0-5,2] | 0,0003 |
| *ERK1* | 4,3 [1-25,9] | 1 [0,6-1,3] | 0,08 | *ERK1* | 1,9 [1,1-2,4] | 1,8 [1,1-2,4] | 0,95 |
| *ERK2* | 3,4 [2,6-5,0] | 2,8 [0,8-5,4] | 0,62 | *ERK2* | 0,5 [0,4-0,6] | 0,8 [0,6-1,2] | 0,03 |

РНК-секвенирование показало статистически значимое увеличение экспрессии *BRAF*, *MEK1*, *MEK2* и *ERK2* (Рисунок 3.13).

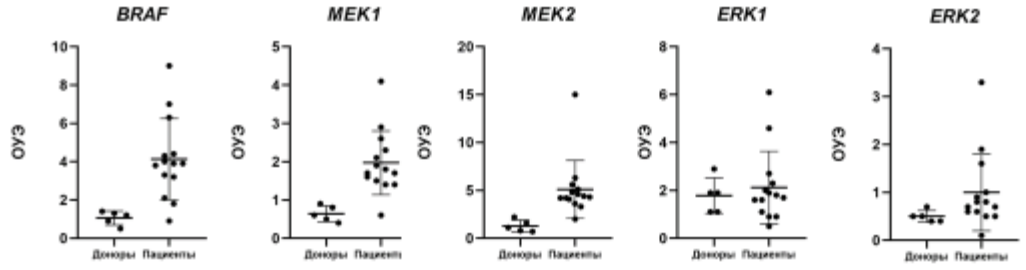



Рисунок 3.13 – Относительный уровень экспрессии генов *BRAF*, *MEK1*, *MEK2*, *ERK1*, *ERK2* протеинкиназного каскада в ПК 14 пациентов (ММ) и 5 доноров (D), измеренный с помощью РНК-секвенирования. ОУЭ – отношение уровней экспрессии гена интереса к *HMBS*. Точка на графике - отдельный образец, горизонтальные линии – медиана и МКИ.

Изменения в экспрессии генов BRAF, MEK1, MEK2 у пациентов с ММ и доноров были сопоставимы для методов ПЦР-РВ и РНК-секвенирования. При этом метод РНК-секвенирования позволил выявить более выраженные различия в экспрессии генов (p = 0,0014 *BRAF*, p=0,0009 *MEK1*, p=0,0003 *MEK2*), в отличие от ПЦР-РВ (p = 0,05 *BRAF*, p=0,02; *MEK1*, p=0,39 *MEK2*). Для генов *ERK1* и *ERK2* результаты результаты ПЦР-РВ и РНК-секвенирования были плохо сопоставимы, в связи с низким уровнем экспрессии и незначительными различиями в экспрессии между пациентами и донорами, также ограниченным объемом выборки (Таблица 3.8). Таким образом, была показана сопоставимость результатов ПЦР-РВ и РНК-секвенирования, для генов, имеющих высокий уровень экспрессии. Далее в анализе использовались данные РНК-секвенирования.

### 3.2.3. Изучение экспрессии генов – мишеней сигнальных каскадов RAS/ERK в опухолевых клетках при ММ в зависимости от наличия мутации в генах *NRAS/KRAS*

На следующем этапе проводился поиск генов-мишеней сигнального каскада RAS/ERK в опухолевых клетках при ММ. С целью идентификации генов, изменяющих уровень экспрессии при мутациях в генах *NRAS/KRAS,* были отобраны транскрипционные факторы и их нижележащие мишени, ассоциированные, по литературным данным, с передачей сигналов по RAS-опосредованным путям. В анализ включено 66 генов, которые по литературным данным регулируются сигналами, передающимися через протеинкиназный каскад (Таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Эффекторные гены каскадов RAS и их функциональные группы.

| **Функциональная группа** | **Исследуемые гены** |
|---|---|
| Ранний ответ на митогенные стимулы | *c-JUN, JUNB, JUND, c-FOS, FOSB, Fra-1, Fra-2, CREB, CREM, ATF-1, CREB-1, CREB-2 (ATF-4), CREB-3, CREB-5, ATF-2 (CRE-BP1), ATF-3, ATF-5 (ATFX), ATF-6, ATF-7, B-ATF, MAF, MAFA, MAFB, NRL* |
| Клеточная пролиферация | *CCND1, p21, p27, c-MYC, VEGF, EGFR, FGFR1* |
| Апоптоз | *BCL2, BCL2L1, BCL2L2, MCL1, BAX, BCL2A1, BAK1, BOK, BCL2L10, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L14, BCL2L15, BNIP2, BCLXL, BIRC5* |
| Воспаление | *IL-6, IL6R, TNF-alpha* |
| Метастазирование | *MMP2, MMP8, MMP9, MMP11, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP19, MMP21, MMP23B, MMP25* |
| Дифференцировка и выживаемость | *MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D* |

В анализ вошло 19 пациентов с мутациями в генах *NRAS/KRAS* и 17 пациентов без мутаций, для всех пациентов был выполнен транскриптомный анализ. В результате проведенного анализа было обнаружено 5 генов (*CREM, NRL, IL-6, MMP14, MEB2B*) экспрессия которых статистически значимо отличается в образцах опухолевых клеток с мутацией *NRAS/KRAS* по сравнению с контрольными образцами (Рисунок 3.14, Таблица 3.10). Экспрессия была выше в опухолевых образцах с мутациями в генах семейства RAS у всех пяти генов. Кроме того, в образцах с мутациями уровень экспрессии генов *CCND1, MEF2D, MAFA* был повышен, однако, различия не достигли уровня статистической значимости. В то же время уровень транскрипции *MYC* была ниже в клетках с мутацией *NRAS/KRAS* по сравнению с опухолевыми клетками без мутации (Таблица Б.3.9 в приложении).

Таблица 3.10 – Сопоставление уровней экспрессии генов в группе пациентов с мутациями в генах *NRAS/KRAS* и без мутаций.

| Ген | Пациенты без мутации в генах *NRAS/KRAS* | Пациенты с мутацией в генах *NRAS/KRAS* | Уровень значимости, p |
|---|---|---|---|
| | Медиана [МКИ], количество прочтений гена | | |
| *CREM* | 89,0 [68,7-113,4] | 117,4 [104,7-154,7] | 0,03 |
| *NRL* | 11,1 [8,4-19,4] | 28,2 [13,0-44,4] | 0,03 |
| *IL6* | 1,4 [0-3,5] | 6,6 [1,0-88,4] | 0,024 |
| *MEF2B* | 144,4 [67,9-307,6] | 620,5 [152,7-955,3] | 0,04 |
| *MMP14* | 14,7 [3,5-34,5] | 21,8 [16-51,9] | 0,002 |

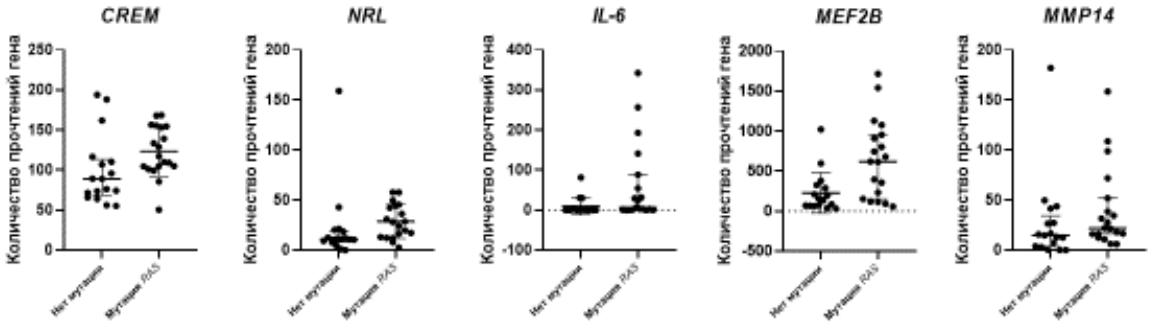



Рисунок 3.14 – Уровень транскрипционной активности генов- мишеней протеинкиназного каскада в опухолевых клетках с мутацией в генах *RAS* (*NRAS/KRAS),* и без мутации. Показаны только гены со статистически значимыми различиями (p <0,05): *CREM, IL-6, NRL, MMP14, MEF2B.* Точка на графике – значение экспрессии в одном образце, горизонтальные линии – медиана и МКИ.

CREM (cAMP Responsive Element Modulator): регулятор транскрипции, подавляющий CRE-зависимую транскрипцию. При ММ, в отличие от активаторов CREB, CREM может действовать как фактор выживания в условиях стресса ЭР (эндоплазматического ретикулума). Способствует резистентности к ингибиторам протеасом.

NRL (Neural Retina Leucine Zipper): фактор транскрипции, важный для развития фоторецепторов в сетчатке. Его роль при ММ не изучена, но, как и другие факторы транскрипции, он потенциально может влиять на пролиферацию и дифференцировку опухолевых клеток. Требует дополнительных исследований.

IL-6 (Interleukin-6): цитокин, стимулирующий рост и выживание клеток ММ. Ключевой фактор выживания при ММ. Активирует каскады JAK/STAT и RAS/ERK, способствуя пролиферации, подавлению апоптоза и резистентности к лекарствам. Также стимулирует ангиогенез.

MMP14 (Matrix Metalloproteinase 14): металлопротеиназа, разрушающая внеклеточный матрикс. При ММ способствует инвазии и метастазированию опухолевых клеток, а также ремоделированию костной ткани, приводящему к литическим поражениям.

MEF2B (Myocyte Enhancer Factor 2B): фактор транскрипции, участвующий в дифференцировке и выживании клеток. При ММ может быть гиперактивен, способствуя пролиферации, выживанию и лекарственной устойчивости. Регулирует экспрессию генов, участвующих в клеточном цикле и подавлении апоптоза.

Сопряженная активация генов *CREM, NRL, IL6, MMP14, MEF2B* обеспечивает индукцию пролиферации и неоангиогенеза (*IL-6, MEF2B*) и формирование механизмов выживания в условиях протеотоксического стресса (*CREM*) и обеспечения инвазивного потенциала опухоли (*MMP14*). Следовательно, гиперэкспрессия этих молекул в клетках с мутациями в генах *NRAS/KRAS* формирует специфический транскриптомный профиль, который может объяснять более агрессивное течение ММ.

### 3.2.4. Взаимосвязь уровня экспрессии генов-эффекторов *IL-6, CREM, NRL, MMP14, MEF2B* с ответом на терапию и течением заболевания.

Экспрессия генов *IL-6, CREM, NRL, MMP14, MEF2B* оказалась повышена в опухолевых клетках при ММ, несущих мутацию в генах *NRAS/KRAS*. Для оценки патогенетических механизмов, возникающих при активирующих мутациях *NRAS/KRAS* в клетках ММ и дальнейшего анализа прогностической значимости этих генов у пациентов с ММ, экспрессии выделенных генов были проанализирована в опухолевых клетках пациентов с глубоким (n=19) и неглубоким (n=23) ответом на терапию (Рисунок 3.15). Анализ показал, что уровень экспрессии гена *NRL* ниже у пациентов, хорошо отвечающих на терапию (ПР+ОХЧР), по сравнению с теми, кто не достиг глубокого ответа (медиана 12,1 для ответивших против 28,15 для неответивших, p=0,02). В Таблице 3.11 приведены медианы и результаты обсчетов с помощью критерия Манна–Уитни для экспрессии генов *CREM, NRL, IL-6, MMP14 и MEF2B*.

Таблица 3.11 – Оценка транскрипционной активности генов- мишеней протеинкиназного каскада у пациентов с глубоким (ПР+ОХЧР) и неглубоким (<ОЧХР) ответом на индукционную терапию.

| Ген | Пациенты, достигшие ПР+ОХЧР | Пациенты, достигшие <ОХЧР | Уровень значимости, p |
|---|---|---|---|
| | Медиана [МКИ], количество прочтений гена | | |
| *CREM* | 110,2 [89,3-156,7] | 104,8 [72,7-159,3] | 0,20 |
| *NRL* | 12,1 [4,2-20,2] | 28,1 [12,0-45,4] | 0,02 |
| *IL6* | 1,6 [1,0-81,4] | 2,6 [1,0-31.7] | 1,00 |
| *MMP14* | 16,6 [7,6-31,5] | 27,5 [10,8-54,3] | 0,24 |
| *MEF2B* | 232,3 [74,0-620,5] | 356,7 [120,8-144,0] | 0,58 |

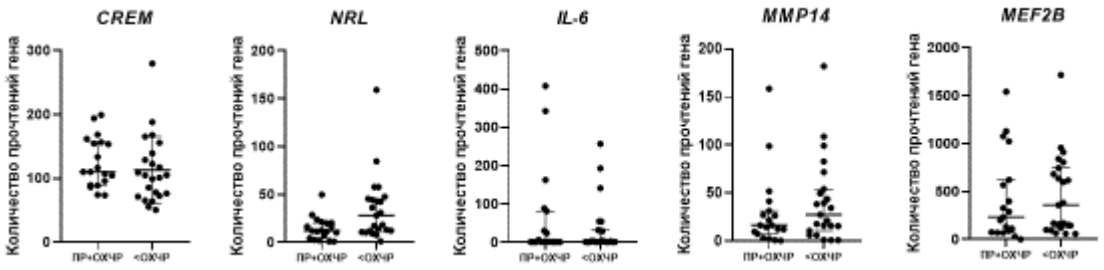



Рисунок 3.15 – Уровень транскрипционной активности генов- мишеней протеинкиназного каскада у пациентов с глубоким ответом на терапию (ПР+ОХЧР) и неглубоким (<ОЧХР). Каждый символ обозначает один образец и одного пациента. Горизонтальные линии – медиана и МКИ.

Пороговое значение для каждого гена, использованное для стратификации пациентов («низкая» и «высокая» экспрессия), было определено на основании ROC-анализа. Согласно данному анализу, пороговое значение для гена *IL-6* составило *1,2, CREM – 2,14, NRL – 1,52, MMP14 – 2,11, MEF2B- 2,38,* что соответствует верхним границам диапазонов экспрессий у доноров (Приложение, Таблица Б.3.10, Таблица Б.3.11). Значения экспрессии приведены в логарифмированном виде.

В анализ ВБП и ОВ были включены 44 пациента с ММ. Группы пациентов сравнивались по уровню экспрессии исследуемых генов (ниже или равно определенному выше пороговому

значению, выше порогового значения). Статистическая значимость оценок выживаемости и относительные риски неблагоприятного исхода из модели Кокса приведены в Таблице 3.12.

Таблица 3.12 – Оценка ОВ и ВБП в зависимости от экспрессии *генов IL-6, CREM, NRL, MMP14, MEF2B.*

| Общая выживаемость | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ген | Уровень значимости *p*, log-rank | Модель Кокса | | | |
| | | Относительный риск | 95%ДИ (нижняя граница) | 95%ДИ (верхняя граница) | Уровень значимости *p* |
| *CREM* | 0,15 | 2,44 | 0,70 | 8,44 | 0,16 |
| *NRL* | 0,54 | 0,62 | 0,13 | 2,93 | 0,55 |
| *IL6* | 0,05 | 3,18 | 0,90 | 11,30 | 0,07 |
| *MMP14* | 0,50 | 2,02 | 0,25 | 16,24 | 0,51 |
| *MEF2B* | 0,31 | 0,50 | 0,13 | 1,94 | 0,32 |
| Выживаемость без прогрессирования | | | | | |
| Ген | Уровень значимости *p*, log-rank | Модель Кокса | | | |
| | | Относительный риск | 95%ДИ (нижняя граница) | 95%ДИ (верхняя граница) | Уровень значимости *p* |
| *CREM* | 0,01 | 2,62 | 1,12 | 6,09 | 0,03 |
| *NRL* | 0,58 | 1,29 | 0,53 | 3,15 | 0,58 |
| *IL6* | 0,25 | 1,61 | 0,71 | 3,69 | 0,26 |
| *MMP14* | 0,75 | 1,40 | 0,19 | 10,46 | 0,75 |
| *MEF2B* | 0,93 | 1,04 | 0,46 | 2,35 | 0,93 |

Результаты показали, что повышенная экспрессия *IL-6* может быть неблагоприятным фактором для ОВ (Рисунок 3.16). При анализе выживаемости методом Каплана–Майера установлено, что пациенты с низким уровнем экспрессии гена IL-6 (<1.2) имели достоверно лучшую выживаемость по сравнению с группой с высокой экспрессией (≥1.2) (p=0.05). В регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса при увеличении экспрессии *IL-6* выявлена тенденция к повышению вероятности неблагоприятного исхода (ОР=3.18, 95% ДИ: 0.9–11.3; p=0.07).

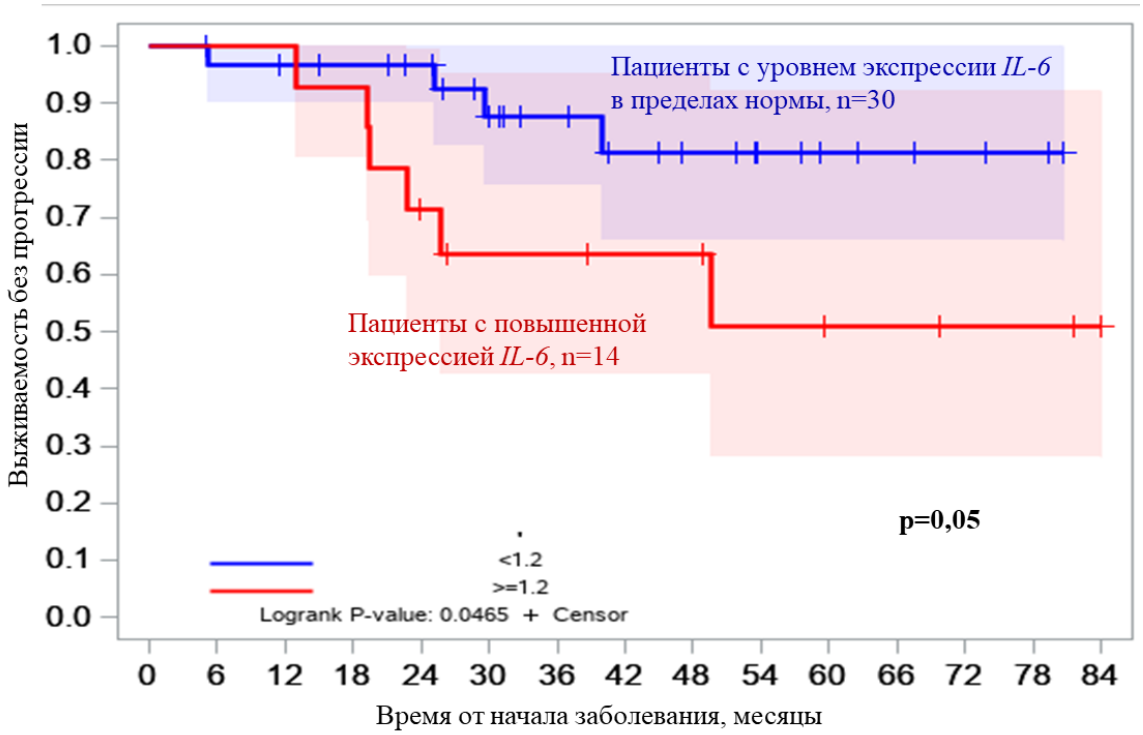



Рисунок 3.16 – Общая выживаемость (ОВ) у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии в гене *IL-6*. Вертикальная ось – доля выживших больных. Красная линия – пациенты с повышенной экспрессией гена *IL-6*. Синяя линия – пациенты с нормальной экспрессией гена *IL-6*.

Анализ ОВ и ВБП пациентов в группах пациентов с высокой и низкой экспрессией гена *CREM* в опухолевых клетках, показал, что увеличение активности гена *CREM* ассоциировано с сокращением ВБП (Рисунок 3.17). Анализ пропорциональных рисков Кокса подтвердил статистически значимую ассоциацию экспрессии *CREM* с ухудшением ВБП (ОР = 2.62, 95% ДИ: 1.12–6.09, p = 0.026).

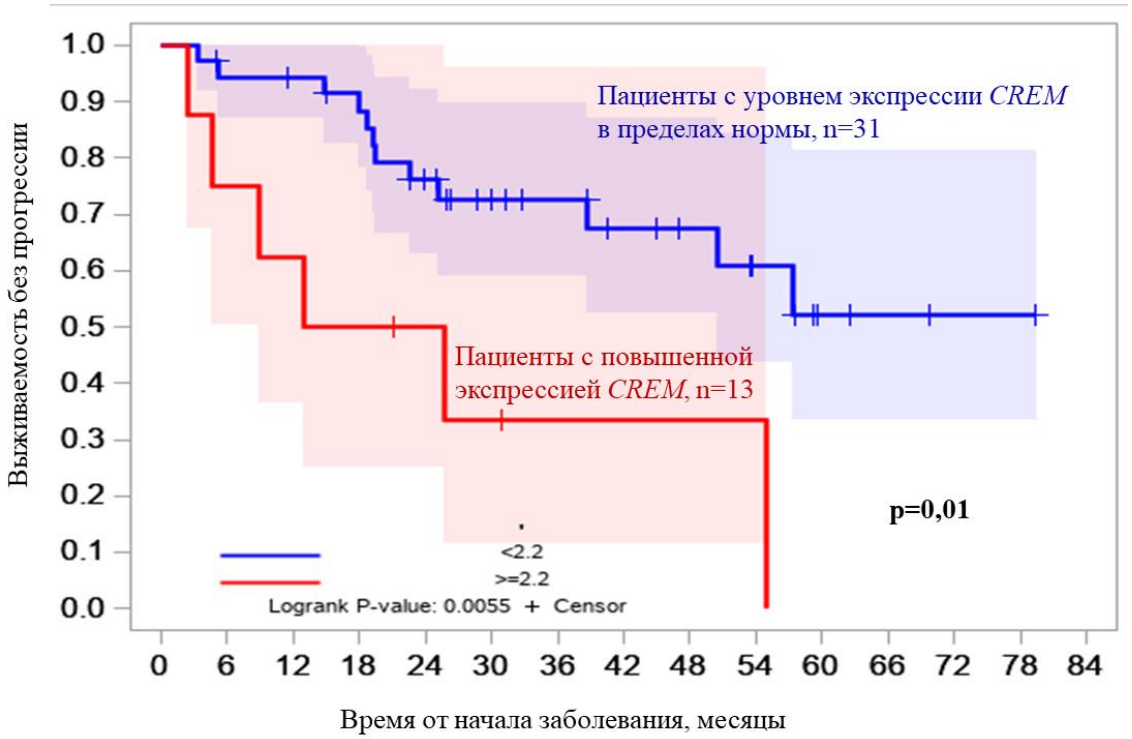



Рисунок 3.17 – Выживаемость без прогрессирования (ВБП) у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии в гене *CREM*. Вертикальная ось – доля пациентов без рецидива/прогрессии заболевания. Красная линия – пациенты с повышенной экспрессией гена *CREM*. Синяя линия – пациенты с нормальной экспрессией *CREM*.

По результатам нашего исследования повышение уровня экспрессии генов *IL-6, CREM* было ассоциировано с наличием мутаций в онкогенах *KRAS/NRAS*, а также с течением ММ. Остальные исследованные гены (*NRL, MMP14, MEF2B*) не продемонстрировали статистически значимого влияния на течение ММ. Полученные данные указывают, что высокая экспрессия *IL-6* может рассматриваться как неблагоприятный прогностический фактор, ассоциированный с общей выживаемостью и, вероятно связанный с провоспалительными эффектами данного цитокина, активацией сигнальных путей и индукцией неоангиогенеза, что способствует прогрессированию опухолевого процесса. Это согласуется с данными, опубликованными ранее: активированные мутацией RAS белки индуцируют ряд внутриклеточных сигнальных каскадов (JAK/STAT3, RAS/ERK, PI3K/AKT), которые могут усиливать транскрипцию провоспалительных цитокинов за счет различных механизмов. Высокая экспрессия *CREM* может быть связана с активацией механизмов клеточного ответа на стресс и повышенной устойчивостью опухолевых клеток к апоптозу, что проявляется в снижении ВБП. Таким образом, обнаруженная ассоциация — более высокий уровень *IL-6, CREM* при мутациях в генах

*KRAS/NRAS* представляет ранее неизученный механизм, посредством которого мутации в этих генах приводят к неблагоприятным событиям для пациентов с ММ.

## 3.3. Поиск экспрессионных маркеров ответа на бортезомиб-содержащую терапию с помощью транскриптомного анализа

В предыдущей части работы была проанализирована взаимосвязь мутаций в генах *NRAS/KRAS* с глубиной ответа на индукционную терапию, а также выявлены нижележащие мишени каскада RAS/ERK в опухолевых клетках с мутацией в генах *NRAS/KRAS* у пациентов с ММ. Однако, мутации в генах *NRAS/KRAS* являются одним из множества генетических нарушений в опухолевых клетках ММ. Поскольку нашей задачей стал поиск предикторов ответа на терапию, в котором мы не ограничились исследованием нарушений, ассоциированных с RAS белками. В данной части работы мы расширили поиск - использовали весь массив транскриптомных данных для поиска наиболее важных изменений в экспрессии генов, влияющих на эффективность индукционной терапии бортезомиб-содержащими триплетными схемами PAD/VCD.

### 3.3.1. Выявление генов, экспрессия которых влияет на эффективность терапии, методом машинного обучения «случайный лес»

Для идентификации молекулярных различий в опухолевых клетках у пациентов с впервые диагностированной ММ, которые влияют на глубину ответа терапией схемами PAD/VCD на индукционном этапе, был проведен анализ транскриптомных данных опухолевых клеток с использованием методов машинного обучения в задаче классификации с применением модели «случайного леса» (Random Forest). Решалась задача классификации пациентов на 2 группы: достигших глубокого ответа на терапию (ПР+ОХЧР) и недостигших глубокого ответа (ЧР и меньше) в пространстве признаков – экспрессий генов. Основным результатом анализа являлся список признаков, ранжированных по степени информативной значимости в прогнозе глубины ответа на терапию.

Обучающая выборка составила 80% (33 пациента), тестовая выборка – 20% (9 пациентов) соответственно. В модели использовали число деревьев – 30, максимальную глубину дерева – 7. В исследование включено 42 пациента с впервые установленным диагнозом ММ, у которых был прослежен ответ на терапию после 6 курса индукционной терапии схемами PAD/VCD. Ответ на терапию оценивали, как глубокий, если пациент к моменту окончания 6 курса достигал полной ремиссии (ПР) или очень хорошей частичной ремиссии (ОХЧР). Пациенты, у которых эффективность ответа на терапию была ниже, чем ОХЧР, относили к группе резистентных больных. Всего 19 пациентов достигли ПР+ОХЧР, 23 пациента были резистентны к терапии 6 курсами PAD/VCD. На Рисунке 3.18 представлено распределение важности признаков (Feature importance), отражающее вклад экспрессий отдельных генов в предсказательную способность модели. Согласно результатам, наибольший вклад в прогноз ответа на индукционную терапию схемами PAD/VCD вносит ген *IDH3B,* значительно превосходящий другие по показателю важности.

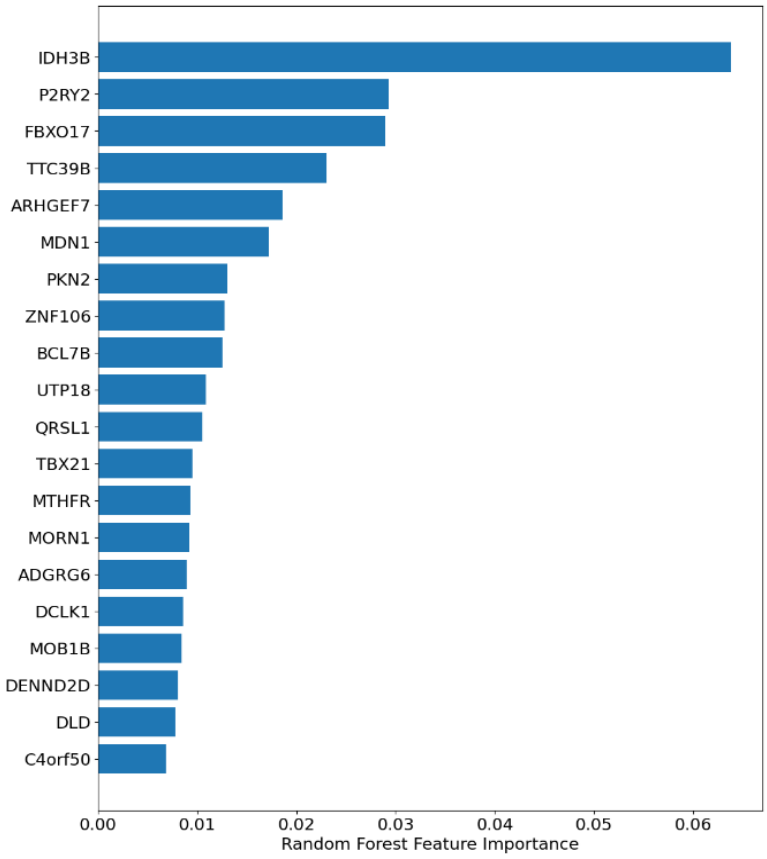



Рисунок 3.18 – Важность признаков, определённая методом «случайного леса», при прогнозировании ответа на терапию у пациентов с ММ на основе транскриптомных данных опухолевых клеток. На диаграмме показаны гены, внесшие наибольший вклад в предсказательную способность модели.

Наибольший вклад в модель вносит ген *IDH3B* (isocitrate dehydrogenase 3 beta subunit) — ген, кодирующий субъединицу митохондриального изоцитратдегидрогеназного комплекса, участвующего в цикле Кребса. Изменения в экспрессии гена *IDH3B* могут отражать перестройку метаболизма опухолевых клеток, направленную на усиление анаболических процессов и устойчивость к терапии. Это может свидетельствовать о метаболической адаптации к гипоксическим условиям костного мозга у пациентов с ММ и влиянии на чувствительность к препаратам, воздействующим на митохондриальные пути.

Вторым по значимости оказался P2RY2 (purinergic receptor P2Y2) — ген, кодирующий рецептор, активируемый внеклеточным АТФ и УТФ. Он участвует в регуляции клеточной пролиферации, миграции и воспалительного ответа. Повышенная активность P2RY2 может способствовать формированию микросреды, поддерживающей выживание опухолевых клеток при ММ и их резистентность к апоптозу.

Третий по важности — FBXO17 (F-box only protein 17), кодирующий белок, участвующий в убиквитин-зависимой деградации белков через SCF-комплекс. Нарушения в этом пути часто связаны с изменением стабильности ключевых регуляторов клеточного цикла и сигналинга. Экспрессия гена *FBXO17* может влиять на деградацию онкопротеинов или супрессоров опухолевого роста, тем самым изменяя ответ опухоли на лечение.

TTC39B (tetratricopeptide repeat domain 39B) — ген, вовлечённый в регуляцию липидного обмена и транспорта холестерина. Липидный метаболизм играет важную роль в поддержании мембранного гомеостаза и сигнальных процессов в опухолевых клетках. Изменения в экспрессии гена TTC39B могут отражать перестройку мембранных структур и сигналинга, влияющего на чувствительность клеток к цитотоксическим агентам.

ARHGEF7 (Rho guanine nucleotide exchange factor 7) — фактор, активирующий малые GTPазы семейства Rho, регулирующие цитоскелет, адгезию и миграцию клеток. В опухолевых клетках этот путь может способствовать инвазивности и выживанию, а также модулировать реакции на стресс, индуцированный лечением. Повышенная экспрессия гена *ARHGEF7* может указывать на активацию сигнальных путей, обеспечивающих резистентность к терапии.

Таким образом, наиболее важные экспрессионные маркеры ответа на терапию бортезомиб-содержащими схемами на этапе индукции связаны с метаболизмом клетки (*IDH3B, TTC39B*), передачей сигналов и взаимодействием с окружением (*P2RY2, ARHGEF7*), а также убиквитин-зависимой регуляцией клеточного цикла (*FBXO17*).

Помимо наиболее значимых предикторов, модель «случайного леса» определила ряд других важных генов — *MDN1, PKN2, ZNF106, BCL7B, UTP18, QRSL1, TBX21, MTHFR, MORN1, ADGRG6, DCLK1, MOB1B, DENND2D, DLD и C4orf50* — которые, несмотря на меньший вклад в предсказательную способность, могут играть значимую роль в патогенезе ММ. Эти гены участвуют в разнообразных биологических процессах, характерных для онкогенеза. Например, *MTHFR* (methylenetetrahydrofolate reductase) регулирует метаболизм фолатов и метилирование ДНК, а его нарушения могут способствовать эпигенетическим изменениям и геномной нестабильности в опухолевых клетках. *BCL7B* относится к семейству генов BCL и может участвовать в регуляции апоптоза и дифференцировки лимфоидных клеток, что особенно актуально для опухолей плазматического ряда. *DCLK1* (doublecortin-like kinase 1) известен как маркер раковых стволовых клеток и может участвовать в регуляции пролиферации и выживания опухолевых клеток. *TBX21* (T-bet) кодирует транскрипционный фактор, влияющий на дифференцировку Т-клеток и иммунный ответ, что может определять взаимодействие опухоли с иммунной микросредой. *PKN2*, в свою очередь, участвует в регуляции цитоскелета и сигнальных путей, связанных с ростом и миграцией клеток, что может способствовать прогрессированию ММ.

Далее мы выяснили (Рисунок 3.19), какое направление изменения экспрессии наиболее важных по нашему анализу генов характерно для пациентов, ответивших на терапию. В большинстве случаев экспрессия была ниже, чем у доноров, но выше, чем у пациентов, не достигших глубокого ответа *(IDH3B, P2RY2, ARHGEF7).*

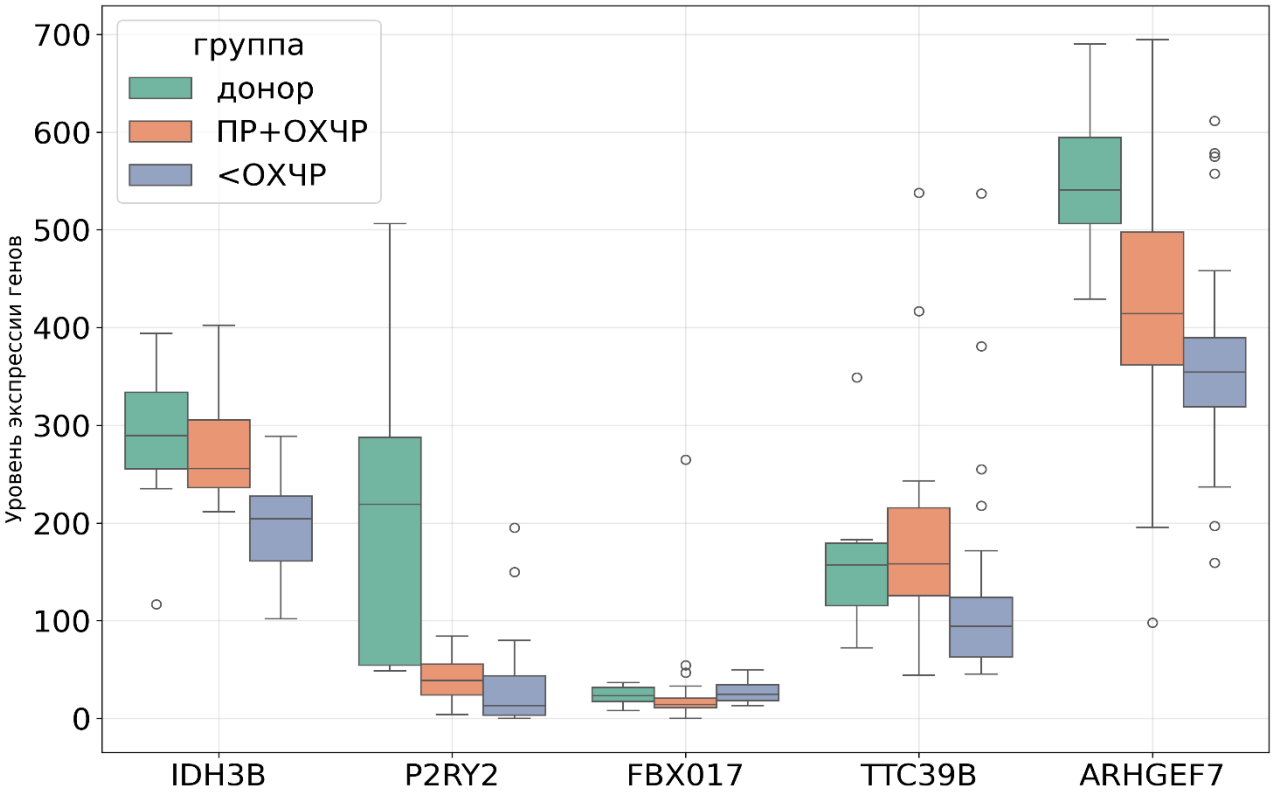



Рисунок 3.19 – Уровни экспрессии генов *IDH3B, P2RY2, FBXO17, TTC39B и ARHGEF7* в опухолевых клетках пациентов с ММ в зависимости от ответа на терапию и ПК доноров. Показан диапазон экспрессий для пациентов с глубоким (ПР+ОХЧР) и неглубоким (<ОХЧР) ответом на терапию и доноров.

Экспрессия гена *TTC39B* была сравнима у пациентов с глубоким ответом и доноров, однако пациенты, не достигшие глубокого ответа, характеризовались значительным снижением экспрессии этого гена. Ген *FBX017* отличался паттерном экспрессии от остальных четырех генов: наименьшие значения экспрессии были характерны для пациентов с глубоким ответом на терапию и сопоставимая у доноров и пациентов с неглубоким ответом на индукционную терапию (Таблица 3.13).

Таблица 3.13 – Уровни экспрессии генов *IDH3B, P2RY2, FBXO17, TTC39B и ARHGEF7* в опухолевых клетках пациентов с глубоким и неглубоким ответом на терапию и у доноров.

| Гены | Пациенты с глубоким ответом (n=19) | Пациенты, не достигшие глубокого ответа (n=23) | Доноры (n=7) |
|---|---|---|---|
| | Экспрессия (Медиана [МКИ]) | | |
| *IDH3B* | 255,66 [236,16-305,33] | 204,10 [161,12-227,50] | 289,35 [255,16-333,79] |
| *P2RY2* | 38,77 [23,92-55,42] | 13,21 [3,24-43,71] | 219,24 [54,58-287,53] |
| *FBX017* | 14,34 [10,85-20,65] | 24,79 [18,02-34,34] | 23,29 [17,26-31,72] |
| *TTC39B* | 158,30 [125,42-215,59] | 94,15 [62,87-123,74] | 157,21 [115,43-179,17] |
| *ARHGEF7* | 414,09 [361,43-497,38] | 354,21 [318,82-389,60] | 540,82 [506,38-594,28] |

Для оценки прогностической значимости отдельных генов в отношении ответа на терапию была рассчитана площадь под ROC-кривой (AUC) для каждого из пяти первых по важности признака генов. Наиболее высокие показатели AUC были получены для гена *IDH3B* (0,8604) и *FBXO17 (0,7778),* для гена *TTC39B* AUC=0,7506, для *P2RY2* AUC= 0,7025 и для гена *ARHGEF7* – 0,6430.

По результатам ROC-анализа были выбраны оптимальные пороговые значения экспрессий этих генов, при которых соотношение чувствительности и специфичности были равными (Таблица 3.14 и Рисунок Б.3.5 в приложении). На основании выбранных пороговых значений пациенты разделены на группы со сниженной экспрессией или нормальной экспрессией. Далее был проведен частотный анализ для определения статистической значимости уровня экспрессии каждого гена в качестве прогностического признака эффективности терапии. Для *IDH3B, FBXO17, TTC39B и ARHGEF7* были получены статистически значимые различия, что говорит о возможности использования шкал экспрессий в качестве прогностического признака ($p$ <0,05).

Таблица 3.14 – Уровни экспрессии генов *IDH3B, P2RY2, FBXO17, TTC39B и ARHGEF7* в опухолевых клетках пациентов.

| Гены | Пороговое значение экспрессии гена, число прочтений гена | Пациенты, достигшие ПР+ОХЧР со сниженной экспрессией гена, n (%) | Пациенты, достигшие <ОХЧР со сниженной экспрессией гена, n (%) | ОШ (95%ДИ) | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| *IDH3B* | 235 | 5/19 (26,3) | 19/23 (82,6) | 13,3 (3,072 - 48,25) | 0,0004 |
| *P2RY2* | 30 | 8/19 (42,1) | 15/23 (65,2) | 2,6 (0,80- 9,75) | 0,21 |
| *FBXO17* | 19 | 13/19 (68,4) | 6/23 (26,1) | 6,1 (1,709 - 22,88) | 0,01 |
| *TTC39B* | 130 | 6/19 (31,6) | 18/23 (78,3) | 7,8 (2,052 - 34,38) | 0,004 |
| *ARHGEF7* | 380 | 6/19 (31,6) | 17/23 (73,9) | 6,1 (1,709 - 22,88) | 0,01 |

### 3.3.2. Взаимосвязь экспрессии генов, ассоциированных с ответом на терапию, и наличия мутации в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках при ММ

Ранее нами было показано, что пациенты с мутациями в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых ПК примерно в 2 раза хуже отвечают на терапию, чем пациенты без мутации. Далее мы выявили транскрипционные предикторы ответа на терапию. На следующем этапе мы исследовали, есть ли взаимосвязь между мутациями и экспрессией генов- предикторов ответа на терапию.

В анализ вошли 5 наиболее важных генов, *IDH3B, P2RY2, TTC39B, ARHGEF7, FBX017*. Статистически значимых взаимосвязей выявлено не было (t-test, p>0,5), вместе с тем отмечена тенденция к снижению экспрессии гена *IDH3B* при наличии мутаций в генах *NRAS/KRAS* (t-test, p = 0,08), что может свидетельствовать о функциональной взаимосвязи между активностью метаболических путей и сигнальными каскадами, ассоциированными с этими мутациями. Как показано на рисунке, экспрессия *IDH3B* была минимальной в опухолевых клетках, несущих мутации в генах *NRAS/KRAS*, и максимальной — в плазматических клетках доноров. Кроме того, отмечено снижение уровня экспрессии *IDH3B* у пациентов, не достигших как минимум ОХЧР на этапе индукции терапии (Рисунок 3.20). Таким образом выявлено, что при повышенная

экспрессия гена *IDH3B* характерна для менее агрессивного течения ММ на основании того, что при повышенной экспрессии реже детектируются мутации в генах *NRAS/KRAS* и выше эффективность применения терапии схемами PAD/VCD. Эти результаты указывают на возможную роль гена *IDH3B* в механизмах лекарственной чувствительности и метаболической адаптации опухолевых клеток, требующую дальнейшего функционального подтверждения.

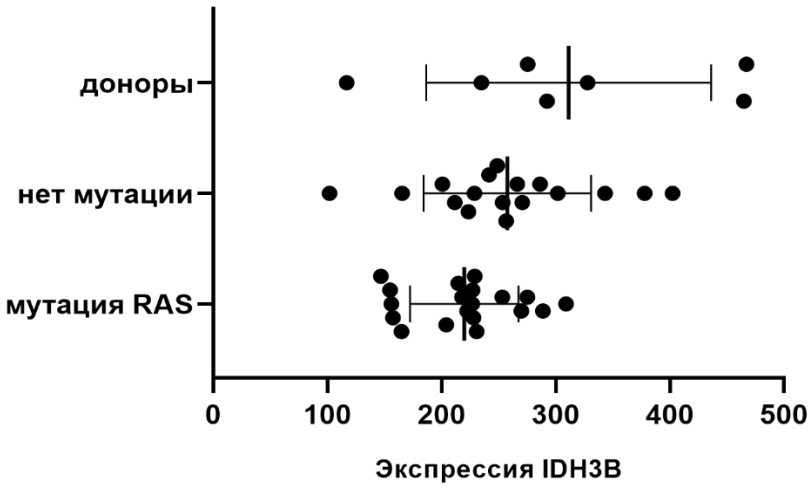



Рисунок 3.20 – Уровни экспрессии гена *IDH3B* в зависимости от ответа на терапию и мутационного статуса *RAS*. Уровни экспрессии *IDH3B* в опухолевых клетках пациентов без мутаций и с мутациями в генах *NRAS/KRAS*, а также в ПК доноров.

### 3.3.3. Взаимосвязь экспрессии генов, ассоциированных с ответом на терапию и клинико-лабораторными показателями.

Для поиска взаимосвязей экспрессии генов *IDH3B, P2RY2, TTC39B, ARHGEF7, FBX017* и клинических проявлений ММ выбраны биохимические показатели в сыворотке крови (β2-микроглобулин, ЛДГ, альбумин, креатинин, гемоглобин), иммунохимические (тип и количество моноклонального иммуноглобулина, количество поликлональных иммуноглобулинов), морфологические (% содержание ПК в костном мозге), пол, возраст, степень остеодеструкции костной ткани (наличие костных и экстрамедуллярных плазмоцитом, количество очагов остеодеструкций) характеристики. Ассоциаций экспрессий вышеперечисленных генов и клинико-лабораторных параметров выявлено не было, за исключением экспрессии гена *ARHGEF7*.

В результате анализа были выявлены ассоциации экспрессии гена *ARHGEF7* и наличия плазмоцитом, и сопоставлены с ответом на терапию. При сравнении пациентов с глубоким ответом на лечение (ПР+ОХЧР) и пациентов с менее выраженным ответом уровень экспрессии *ARHGEF7* характеризовался тенденцией к более высокой экспрессии у пациентов с лучшим ответом. Пациенты, у которых выявлялась плазмоцитома, характеризовались несколько более низким уровнем экспрессии гена *ARHGEF7* по сравнению с больными без плазмоцитом. Однако различия также не достигали статистической значимости (p=0,07), демонстрируя лишь тенденцию. Интересно отметить, что этот ген локализован на 13 хромосоме, делеция или моносомия которой раньше рассматривалась как фактор риска для ММ. Действительно, экспрессия гена *ARHGEF7* существенно различалась при сравнении пациентов с моносомией 13-й хромосомы и пациентов без данной аномалии. Уровень экспрессии гена *ARHGEF7* был значительно снижен при наличии моносомии 13 (p=0,0005), что указывает на возможную связь гена с данной цитогенетической аберрацией. Уровень экспрессии гена *ARHGEF7* в клетках здоровых доноров был выше, чем у пациентов с ММ, включая группу без хромосомных нарушений (Рисунок 3.21). Это подтверждает, что сниженная экспрессия *ARHGEF7* может быть связана с опухолевой трансформацией плазматических клеток.

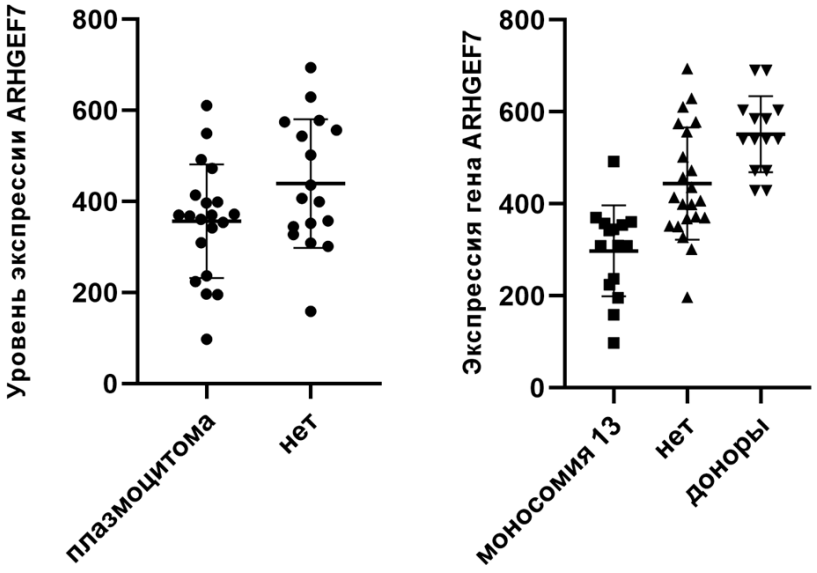



Рисунок 3.21 – Экспрессия гена *ARHGEF7* в зависимости от (слева направо): наличия плазмоцитом, наличия моносомии 13.

## 3.4. Генетические изменения и уровень экспрессии эффекторных генов в дебюте и рецидиве ММ (анализ клинического случая)

Представленное клиническое наблюдение иллюстрирует закономерности молекулярно-генетической трансформации опухоли в процессе прогрессирования ММ. Сравнительный анализ биоматериала, полученного в дебюте и при развитии рецидива, позволил проследить этапы клональной эволюции ММ и оценить динамику экспрессии выявленных нами ранее молекулярных маркеров-предикторов.

История болезни. Пациент, мужчина, 1957 г.р., наблюдался в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с мая 2013 г. по поводу ММ. Диагноз при поступлении: ММ, IIA стадия по Durie-Salmon, I стадия по R-ISS. Диагноз соответствовал критериям IMWG (2014).

Индукционная терапия включала 5 курсов PAD в полных дозах. После 2-го курса достигнута ЧР, после 5-го –ОХЧР. На фоне ОХЧР выполнена мобилизация и сбор аутологичных стволовых клеток крови (ауто-СКК) по схеме: циклофосфан 4 г/м2 и Г-КСФ 5 мкг/кг. Заготовлено 13,0*10^6/кг CD34+ клеток (2 лейкофереза).

В период между сбором СКК и ауто-ТГСК проводились консолидирующие курсы VCD (бортезомиб + циклофосфан + дексаметазон, №4). Перед ауто-ТГСК достигнута сПР (по данным иммунохимического исследования, миелограммы и иммунофенотипирования костного мозга).

Через 100 дней после ауто-ТГСК зафиксирована прогрессия заболевания (В-симптомы, появление парапротеина М-лямбда в дополнение к исходному G-лямбда по данным иммунохимии). Выполнено повторное молекулярное исследование (FISH, оценка экспрессии и мутационного статуса генов). Реиндукция бортезомиб-содержащими режимами оказалась неэффективна. Переведен на вторую линию терапии иммуномодуляторами с достижением ЧР.

При первичной диагностике и в рецидиве заболевания проводили расширенный молекулярно-генетический анализ CD138+ клеток КМ пациента, включающий FISH-исследование, оценку мутационного статуса генов *NRAS/KRAS, TP53* и профиля экспрессии генов (Таблица 3.15). Методика цитогенетического исследования и секвенирования TP53 подробно изложена в статье Сергеевой и соавт.[180].

Таблица 3.15 – Цитогенетические и генные аберрации, выявленные в дебюте и рецидиве ММ в опухолевых клетках пациента.

| Молекулярно-генетические аберрации | Дебют ММ | Рецидив ММ |
|---|---|---|
| *Цитогенетические* | | |
| Трисомия 5,9,15 хромосом | выявлена | выявлена |
| Амплификация 1q21 | не обнаружена | выявлена |
| *Точечные мутации* | | |
| *NRAS* Gln61His (мутация) | выявлена | выявлена |

При молекулярно-цитогенетическом исследовании (FISH) в дебюте заболевания был выявлен лишь гипердиплоидный тип ММ (трисомии 5, 9, 15) в 50 % ядер, то есть пациент относился в благоприятной группе по цитогенетической шкале риска. В опухолевых клетках как в дебюте, так и в рецидиве отмечалась соматическая миссенс-мутация *NRAS* Gln61His, то есть в процессе лечения субклон с мутацией сохранился, хотя его размер уменьшился (пациент достиг ОХЧР). При повторном цитогенетическом исследовании на фоне прогрессии заболевания сохранялся гипердиплоидный тип ММ, однако появилась amp1q21 в 170 интерфазных ядрах из 200

исследованных, то есть в 85 % ядер. Это может свидетельствовать о разрастании клона и увеличении генетической нестабильности ПК пациента.

Анализ первичной структуры всех функционально важных областей гена *TP53* в первичном материале и при рецидиве не выявил соматических мутаций.

Результаты анализа экспрессии ряда генов в ПК костного мозга пациента выявили динамические изменения между моментом диагностики заболевания и рецидивом (Таблицы 3.16, 3.17).

Таблица 3.16 – Экспрессия генов-мишеней RAS/ERK.

| Гены | Дебют ММ | Рецидив ММ | Доноры, медиана [МКИ] |
|---|---|---|---|
| | Количество прочтений гена | | |
| *CREM* | 104,8 | 79,2 | 84,5 [74,45-110,35] |
| *NRL* | 12,0 | 14,5 | 14,9 [10,71-22,82] |
| *IL6* | **54,9** | **1575,2** | 16,86 [15,03-37,61] |
| *MEF2B* | **152,7** | **246,3** | 123,9 [76,51-184,27] |
| *MMP14* | 6,3 | 6,8 | 62,30 [41,84-83,31] |

В рецидиве заболевания отмечена персистенция мутации в гене NRAS при стабильном уровне экспрессии генов-мишеней пути RAS/ERK. Однако, выявлено резкое (приблизительно 30-кратное) повышение уровня мРНК IL-6. Данный факт может указывать на активацию альтернативных путей регуляции транскрипции этого цитокина при прогрессировании заболевания. Кроме того, была отмечена тенденция к росту транскрипционной активности гена фактора транскрипции MEF2B. Сравнительный анализ показал, что уровни экспрессии *IL-6* и *MEF2B* превышали показатели контрольной группы (доноры) уже в дебюте заболевания, демонстрируя дальнейшую интенсификацию в фазе рецидива.

В таблице 3.17 представлены значения экспрессии наиболее значимых генов, IDH3B, P2RY2, FBXO17, TTC39B и ARHGEF7, - предикторов ответа на индукционную терапию у пациентов с ММ согласно результатам анализа транскриптома методом машинного обучения.

Таблица 3.17 – Экспрессия 5 наиболее важных предикторов ответа на индукционную терапию.

| Гены | Дебют ММ | Рецидив ММ | Пороговое значение экспрессии, предиктор глубокого ответа |
|---|---|---|---|
| | Количество прочтений гена | | |
| *IDH3B* | 226,8 | 171,3 | >235 |
| *P2RY2* | 53,2 | 64,2 | >30 |
| *FBXO17* | 15,7 | 940,4 | <19 |
| *TTC39B* | 110,4 | 118,9 | >130 |
| *ARHGEF7* | 372,4 | 687,4 | >380 |

У исследуемого пациента в дебюте заболевания экспрессия *FBXO17* (15,7) и *P2RY2* (53,2) соответствовала значениям, наблюдаемым у пациентов с глубоким ответом (ПР+ОХЧР). Значения экспрессии генов *IDH3B ARHGEF7* оказались приближены к установленным пороговым значениям (226,8 против 235; 372,4 против 380). Экспрессия TTC*39B* (110,4) соответствовала диапазону, характерному преимущественно для группы с менее выраженным ответом (<ОХЧР). Таким образом, в дебюте заболевания отмечался смешанный профиль экспрессии предикторных генов, с тенденцией к глубокому ответу на терапию. В рецидиве заболевания выявлены изменения молекулярного профиля экспрессии ряда генов: снижение экспрессии *IDH3B* до 171,3, сохранение относительно низких значений *TTC39B* (118,9), резкое повышение *FBXO17* до 940,4. Можно заключить, что в рецидиве наблюдалось смещение молекулярных характеристик в сторону паттерна, ассоциированного с резистентностью к терапии.

Приведённый анализ клинического случая пациента с ММ демонстрирует эволюцию опухолевого клона, сопровождающуюся формированием неблагоприятных молекулярных признаков. В дебюте заболевания пациент относился к группе благоприятного цитогенетического риска (гипердиплоидный вариант), однако при рецидиве выявлено появление амплификации 1q21 на фоне персистенции мутации *NRAS* Gln61His, что свидетельствует о клональной эволюции и нарастании генетической нестабильности опухоли. Транскриптомный анализ показал значимые изменения экспрессии ряда генов, характерных для опухолевой прогрессии и резистентного течения, включая выраженное повышение уровней IL-*6 и FBXO17*. Таким образом, комплексный молекулярный анализ выявил основные неблагоприятные

генетические и транскрипционные изменения, отражающие эволюцию опухоли, которое сопровождалось развитием резистентности к ранее эффективной терапии.

# Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

ММ распространенное гематологическое заболевание, которое характеризуется высокой гетерогенностью на молекулярном уровне. Существующие системы стратификации риска не учитывают всю совокупность прогностически значимых аберраций, что ограничивает их точность. Между тем, более точный прогноз эффективности терапии необходим для определения тактики лечения пациентов, а также для улучшения клинических исходов у данной группы больных.

Настоящее исследование было направлено на комплексную оценку клинико-биологического значения изменений в генах семейства *RAS (NRAS* и *KRAS)* и поиск новых потенциальных маркеров ответа на индукционную терапию триплетными схемами с бортезомибом у пациентов с ММ.

Мутации в генах *NRAS/KRAS* были представлены исключительно миссенс-вариантами и выявлены у 42% пациентов. Согласно данным литературы, частота мутаций в генах семейства *RAS* при ММ варьирует от 6 до 52%, что, вероятно, обусловлено различиями в объеме/составе выборок, типе анализируемого материала (мононуклеарные клетки костного мозга или отсортированные плазматические клетки), а также характеристиками применяемых методов. В работах, где сообщается о низкой частоте мутаций, использовались методы с ограниченной разрешающей способностью (саузерн-блоттинг, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов) [20, 144]. В то же время в исследованиях, проведенных с использованием методов секвенирования на расширенных выборках, частота обнаружения мутаций в генах *KRAS/NRAS* достигает 40–52% [26, 63, 131, 181]. Таким образом, полученный нами показатель (42%), определенный методом секвенирования по Сенгеру, соответствует современным данным и может рассматриваться как репрезентативный.

Преобладание миссенс-мутаций в кодонах 12, 13 и 61 согласуется с представлениями о функционально значимых «горячих точках», обеспечивающих конститутивную активацию GTP-связанной формы белка RAS [182]. Особый интерес представляет собой распределение мутаций между генами *NRAS* и *KRAS*: частота их встречаемости статистически не различается в генах *NRAS/KRAS*, однако для *NRAS* характерно превалирование мутаций в кодоне 61, тогда как для гена *KRAS* характерно сопоставимое количество мутаций в 12, 13, 61 кодонах. Это может отражать различия в механизмах клональной селекции опухолевых клеток. Данное различие

дополнительно подтверждает гипотезу о неодинаковой биологической роли изоформ *NRAS* и *KRAS* при ММ. Несмотря на структурную гомологию белков NRAS и KRAS, их внутриклеточная локализация, взаимодействие с эффекторными белками и влияние на сигнальные каскады могут различаться [27, 183, 184].

Оценка противоопухолевого ответа проводилась после 6 курса терапии PAD/VCD у пациентов, не принимающих иммуномодуляторы (леналидомид). Согласно нашему исследованию, пациенты с мутацией в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках статистически реже достигают полной ремиссии или очень хорошей частичной ремиссии (глубокого ответа) после 6 курса индукционной терапии схемами PAD/VCD. Результаты нашей работы доказывают, что наличие мутации в генах семейства *RAS* при ММ приводит к снижению частоты достижения ответа, соответствующего критериям ПР и ОХЧР, на комбинированную противоопухолевую терапию PAD/VCD. Интересно отметить, что по нашим данным, мутации в гене *KRAS,* но не в *NRAS* оказались ассоциированы со сниженной эффективностью индукционной терапии, сниженной ВБП и более выраженными клинико-биохимическими характеристиками ММ. Наши результаты хорошо соотносятся с результатами, полученными в других исследованиях. В работах Chng с соавт. и Li с соавт. было показано, что мутации в генах *KRAS* и *NRAS* ассоциировались с более агрессивным течением ММ, при этом мутация в гене *KRAS* в отличие от *NRAS* оказывала влияние на эффективность терапии [58, 185].

Необходимо отметить, что результаты некоторых работ в отношении прогностического значения мутаций в генах *NRAS/KRAS* сильно разнятся: от негативного до благоприятного (см. подробное описание в разделе 1.7.2). В исследовании Mulligan и соавт. продемонстрировано, что мутации только в гене *NRAS*, но не в *KRAS* влияют на эффективность лечения, причем бортезомиб пациенты получали в монорежиме [29]. В тех случаях, когда пациент принимал дексаметазон, мутации в гене *NRAS* не влияли на эффективность терапии [29]. Можно предположить, что на успех терапии схемами PAD/VCD на индукционном этапе влияет наличие мутации в опухолевой популяции клеток, а также изоформа *KRAS* или *NRAS*. Нами предпринята попытка систематизировать варианты мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у больных ММ с учетом результатов терапии по трехкомпонентным схемам PAD/VCD. Согласно современным рекомендациям ClinGen/CGC/VICC интерпретация выявленных мутаций в генах *NRAS/KRAS* продемонстрировала высокий уровень онкогенности всех вариантов. С помощью протеомных предсказательных программ среди найденных мутаций удалось определить группу высокого риска, которая, однако, недостаточно сильно коррелировала с ответом на терапию. К сожалению,

данные программы оказались недостаточно чувствительны для предсказания эффективности терапии.

В нашем исследовании установлено, что у пациентов, прошедших ауто-ТГСК, наличие мутаций в генах *NRAS/KRAS* сопряжено с менее благоприятными показателями ВБП в сравнении с контрольной группой без этих мутаций. Несмотря на то, что ауто-ТГСК позволяет проводить высокодозную химиотерапию и добиться максимальной эрадикации опухолевого клона без повышения смертности, связанной с иммуносупрессией, этот метод не обеспечивает полного излечения [186]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что мутации в опухолевых клетках в генах *NRAS/KRAS* оказывают отрицательное влияние на длительность ремиссии у трансплантированных пациентов. Ранее в исследованиях, выполнявшихся в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ на меньшей выборке, было показано, что мутации в генах семейства *NRAS* в случае сочетанной гиперэкспрессии гена c-MYC ухудшают показатели выживаемости без прогрессии у нетрансплантируемых пациентов [59], то есть находящиеся на другой схеме терапии. Интересно отметить, что в независимом исследовании было показано, наличие мутаций в генах *RAS* не влияет на показатели ВБП и ОВ у больных с ММ, принимающих в первой линии терапии иммуномодулирующие препараты (леналидомид или талидомид) [25]. В нашем исследовании пациенты получали лечение по трехкомпонентной схеме PAD или VCD без добавления иммуномодулятора. Можно заключить, что при использовании схем PAD или VCD на индукционном этапе у пациентов-кандидатов на ауто-ТГСК, негативный эффект мутации в генах *NRAS/KRAS* статистически значимо подтверждается.

В дополнение к полученным данным о статистически значимом негативном влиянии мутаций в генах *KRAS/NRAS* на эффективность терапии, мы выяснили, что такие характеристики симптоматической ММ, как плазмоцитомы и множественные остеодеструкции, низкий уровень альбумина и высокий уровень креатинина взаимосвязан с наличием мутации в опухолевых клетках в генах *KRAS/NRAS* и статистически значимо выше, чем у пациентов без мутаций. Также у пациентов - носителей мутации в гене *KRAS* в дополнение к указанных лабораторным показателям статистически значимо был выше уровень парапротеина в сыворотке крови. В исследовании Chng и соавт. выявлена ассоциация мутаций в генах *KRAS/NRAS* с остеолитическими нарушениями, сниженным гемоглобином и уровнем тромбоцитов, а также более продвинутой стадией ММ [58]. В работе Li и соавт. мутаций в генах *KRAS/NRAS* также ассоциированы с худшими биохимическими показателями сыворотки крови и комплексным кариотипом, причем именно мутации в гене *KRAS* являются независимым фактором плохого

прогноза при ММ [185]. Так, можно полагать, что, мутации в генах *NRAS/KRAS,* в особенности *KRAS*, взаимосвязаны с более агрессивным течением ММ. Возможное негативное влияние мутаций в генах семейства *RAS* могло быть обусловлено наличием других генетических аберраций в той же опухоли. Мы показали, что эти мутации не ассоциированы с неблагоприятными цитогенетическим поломками. Таким образом, мы показали, что мутации в генах *NRAS/KRAS* несут независимый от цитогенетических аберраций высокого риска неблагоприятный вклад в прогноз ММ.

Для изучения патогенетических механизмов влияния мутаций в генах *NRAS/KRAS* на течение ММ были изучены экспрессии эффекторных генов пути RAS/ERK. Изучение экспрессии проводилось с помощью методов ПЦР-РВ и РНК-секвенирования. Проведённый контроль качества данных РНК-секвенирования подтвердил их информативность и значимость для последующего анализа. Сравнение методов количественной оценки экспрессии (ПЦР-РВ и РНК-секвенирование) продемонстрировало сопоставимость результатов, что повышает достоверность выявляемых закономерностей. Изучение экспрессии генов-мишеней сигнального каскада RAS/ERK показало, что наличие мутаций сопровождается характерными транскриптомными изменениями. Мы выявили 5 из 66 генов, у которых экспрессия повышена в клетках с мутацией в генах *NRAS/KRAS* по сравнению с образцами клеток, у которых не была выявлена мутация: *IL-6, CREM, NRL, MMP14, MEF2B.* Это подтверждает функциональную активность выявленных мутаций и их влияние на клеточные сигнальные пути. В нашем исследовании повышенная экспрессия генов *NRL*, *IL-6* и *CREM* в опухолевых плазмоцитах была связана с худшим ответом на индукционную терапию, сниженными показателями ОВ и ВБП соответственно. Эти наблюдения находят поддержку в ранее опубликованных исследованиях: *IL-6* достаточно давно описан как ключевой ростовой фактор и цитокин микросреды костного мозга, способствующий пролиферации, выживанию и резистентности опухолевых клеток к лечению ММ [187, 188]. IL-6 –активно вырабатывается клетками микроокружения, взаимодействует с рецепторами на поверхности клеток ММ, стимулируя рост последних. На более поздней стадии заболевания опухолевые ПК самостоятельно начинают продуцировать IL-6 аутокринно регулируя свой рост. В работе Billadeu и соавт. показано, что мутации в генах *NRAS/KRAS* способствуют росту клеток миеломной клеточной линии ANBL6, зависимой от IL-6, без добавления дополнительно этого цитокина в среду [189]. Можно полагать, что появление мутаций сопровождается повышением экспрессией IL-6 клетками ANBL6. В нашем исследовании впервые показано, что в опухолевых клетках пациентов с ММ мутации *RAS* ассоциированы с повышенным уровнем экспрессии *IL-6*.

На основании исследования нашего исследования и Billadeu с соавт. [189], можно заключить, что секреция *IL-6*, фактора неблагоприятного прогноза, активируется мутациями в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках при ММ. Увеличение транскрипции гена *CREM* – транскрипционного фактора из семейства CREB/ATF при мутациях в генах семейства RAS изучено мало. Известно, что CREM может действовать как фактор выживания опухолевых клеток за счет формирования иммуносупрессивного окружения у различного вида опухолей [190]. Увеличенная экспрессия CREB1, белка из того же семейства транскрипционных факторов CREB/ATF способствует резистентности к ингибиторам протеасом, реализованной через развитие толерантности к ЭПР-стрессу [191]. Наши данные позволяют предположить, что повышение экспрессии *IL-6* и *CREM* отражает биологически активный фенотип опухоли с мутациями в генах *NRAS/KRAS*, что может указывать на ранее неизвестный механизм резистентности мутированных опухолевых клеток к стандартной терапии у пациентов с ММ.

Для поиска новых экспрессионных маркеров, ассоциированных с ответом на терапию, был выполнен транскриптомный анализ в опухолевых клетках у пациентов с ММ. С помощью метода машинного обучения «случайный лес» была получена прогностическая модель - список генов со значениями важности каждой экспрессии для предсказания глубины ответа на терапию. Экспрессия этих генов значимо ассоциирована с ответом на триплеты PAD/VCD на индукционном этапе. Мы подробно рассмотрели наиболее значимые гены, *IDH3B, P2RY2, FBX017, TTC39B* и *ARHGEF7,* которые вносят наибольший вклад в классификацию пациентов на группы, достигших и не достигших глубокого ответа. Выявленные гены могут отражать ключевые молекулярные механизмы, лежащие в основе вариабельности ответа на индукционную терапию при ММ. Наиболее значимый ген, по нашим данным, *IDH3B*, бэта-субъединица изоцитрат дегидрогеназы, генный продукт которого — это фермент, необходимый для функционирования цикла трикарбоновых кислот, участвующий в митохондриальном метаболизме клетки. Сниженная экспрессия *IDH3B* связана со снижением эффективности терапии на индукционною терапию схемами PAD/VCD. Данный результат представляет особый интерес с точки зрения метаболической реорганизации опухоли и может быть интерпретирован в контексте эффекта Варбурга. Снижение активности ферментов цикла Кребса приводит к уменьшению эффективности окислительного фосфорилирования и снижению продукции восстановленных коферментов, необходимых для функционирования дыхательной цепи. В условиях такого метаболического ограничения опухолевые клетки вынуждены компенсаторно усиливать гликолитический путь получения энергии, даже при наличии достаточного уровня

кислорода. Подобный сдвиг энергетического метаболизма является характерной чертой эффекта Варбурга и широко описан для различных злокачественных новообразований, в том числе для ММ [192]. Дополнительным механизмом, усиливающим данный метаболический фенотип, может быть накопление промежуточных метаболитов цикла Кребса, таких как сукцинат и фумарат. Эти соединения способны ингибировать ферменты, регулирующие деградацию транскрипционного фактора HIF-1α, что приводит к его стабилизации даже в условиях нормоксии. В свою очередь, активация HIF-1α индуцирует экспрессию генов, участвующих в транспорте глюкозы и гликолизе, включая GLUT1, HK2 и LDHA, тем самым усиливая зависимость клеток от гликолитического метаболизма. Следует отметить, что для опухолевых клеток характерна адаптация к гипоксическому микроокружению костного мозга, что дополнительно способствует активации HIF-зависимых путей и усилению гликолиза [181]. В этом контексте снижение активности митохондриальных метаболических путей может рассматриваться как часть более широкой программы метаболической адаптации опухолевых клеток.

Второй по значимости ген, *P2RY2* кодирует пуринэргический рецептор P2Y, участвует в пурин эргической передаче сигнала. Интересно отметить, что Selinexor – ингибитор ядерного экспортина XPO1, одобрен FDA при рефрактерных ММ [193], приводят к активации P2PY2. Белковый продукт следующего по значимости гена *FBX017* - структурный компонент многобелковый комплекс 3 убиквитинлигазы, который катализирует убиквитинирование белков, предназначенных для протеасомальной деградации 26S [194]. Следует подчеркнуть, что экспрессия гена *FBX017,* в отличие от других проанализированных генов (*IDH3B, P2RY2, TTC39B* и *ARHGEF7*), была снижена у пациентов, демонстрирующих высокую эффективность терапии (достигших ПР+ОХЧР), по сравнению как с пациентами, не отвечающими на лечение, так и с донорами. Данный эффект может быть обусловлен уменьшением активности протеасомного комплекса при сниженной экспрессии FBX*017* в дополнение к действию ингибитора протеасомы. В опухолевых клетках, в которых не происходит снижение уровня экспрессии FBX*017,* ингибирование протеасомы выражено в меньшей степени, что в итоге отражается на снижении эффективности терапии. TTC39B (Tetratricopeptide Repeat Domain 39B) – снижается экспрессия при активации метилтрасферазы SETD8, инактивирующей активность TP53 в ПК при ММ. Про ген *ARHGEF7* (Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 7) известно мало – потеря функциональной активности ассоциирована с моносомией хромосомы 13 [195]. Важно отметить, что выявленные гены вовлечены в патогенез и механизмы резистенции к терапии.

Универсальность выявленных изменений и их прогностическую ценность можно проверить на независимой когорте пациентов с ММ.

Ряд работ показал [37, 40, 54, 106, 148, 148, 151, 196], что транскриптомгые сигнатуры могут использоваться для стратификации пациентов и прогнозирования ответа на лечение (Таблица 4). Интересно отметить, что между различными сигнатурами перекрытие генов минимально, поскольку модели были разработаны на разных когортах пациентов с использованием разных методов анализа транскриптома. Как следствие, существующие прогностические сигнатуры не используются в рутинной практике, так как требуют кропотливой пробоподготовки и время для интерпретации результатов, а также дополнительной валидации. Наши результаты частично согласуются с ранее опубликованными исследованиями, посвящёнными анализу транскриптомных профилей пациентов с ММ (полный перечень генов, относящихся к различным сигнатурам, приведён в Таблице Б.3.12 в приложении). Хотя выявленные сигнатуры не демонстрируют прямого совпадения по составу генов с данными настоящей работы, в них представлены представители сходных биологических функциональных категорий, в частности, гены, кодирующие компоненты системы протеасомной деградации белков.

Таблица 4 – Сравнение экспрессионных прогностичеких панелей, разработанных для ММ. МСА – многоступенчатый статистический анализ, ДЭ – дифференциальная экспрессия.

| Характеристика | Mitra_42 | IFM-15 | UAMS-70 | UAMS-80 | EMC-92 |
|---|---|---|---|---|---|
| Тип сигнатуры | Прогноз ответа на терапию | Прогноз течения заболевания | Прогноз течения заболевания | Прогноз течения заболевания | Прогноз течения заболевания |
| Терапия | Ингибиторы протеасомы | Терапия до появления бортезомиба | Смешанная | Бортезомиб | Смешанная |
| Количество генов в сигнатуре | 42 | 15 | 70 | 80 | 92 |
| Материал исследования | Клеточная линия и клинические данные | Клиническое исследование IFM-99 | Клинические исследование TT3 | Клиническое исследование TT3 | Клиническое исследование HOVON/GMMG |

Продолжение Таблицы 4.

| Метод | Машинное обучение | MCA | ДЭ и кривые выживаемости | ДЭ и кривые выживаемости | MCA |
|---|---|---|---|---|---|
| Функциональные биологические группы | Чувствительность к препарату | Иммунитет и ответ на стресс | Пролиферация | Пролиферация и ответ на бортезмиб | Пролиферация и иммунитет |
| Связь с препаратами на основе ингибитора протеасомы | прямая | нет | частично | прямая | частично |
| Пересечение по составу генов | низкое | низкое | небольшое | небольшое | небольшое |

Найденные нарушения мы сопоставили с наличием мутации в генах *KRAS/NRAS*. Важно отметить, что с повышенной экспрессией гена *IDH3B,* которая оказалась чаще встречается у пациентов с худшим ответом на терапию, взаимосвязано носительство мутации в генах *KRAS/NRAS*. Исследование взаимосвязи экспрессии генов и клинико-лабораторных показателей показало, что у пациентов с костными плазмоцитомами ниже экспрессия гена *ARHGEF7*. Сниженное количество транскриптов гена *ARHGEF7* ассоциировано с резистентностью к терапии бортезомиб-содержащими курсами. Эти результаты указывают на потенциальные молекулярные механизмы, лежащие в основе резистентности к терапии, и могут служить основой для разработки новых терапевтических стратегий. Данные ассоциации ранее не были описаны в литературе.

Наше исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, анализ основан на транскриптомных данных, и функциональная значимость повышения экспрессии требует валидации на белковом уровне и в *in vitro/in vivo* моделях. Во-вторых, поскольку данные получены из одной когорты, требуется независимая валидация в другой популяции большего размера. В клиническом контексте, если наши наблюдения подтвердятся, экспрессия генов-предикторов может служить не только прогностическим маркером при ММ, но также и потенциальными мишенями для таргетной терапии.

Найденные маркеры мы подробно рассмотрели в рамках анализа клинического случая. В дебюте заболевания пациент был отнесен к группе благоприятного цитогенетического прогноза, однако при молекулярно-генетическом исследовании была выявлена мутация в гене *NRAS*.

Согласно результатам нашего исследования, наличие мутаций в генах семейства *RAS* ассоциировано с более низкой эффективностью терапии и сокращением ВБП. При этом следует учитывать биологические особенности изоформ: мутации *NRAS* зачастую характеризуются менее выраженным негативным прогностическим влиянием по сравнению с аберрациями в гене *KRAS*. Оценка генов-предикторов терапевтического ответа, определенных с помощью алгоритмов машинного обучения, выявила высокие уровни экспрессии *IDH3B* и *P2RY2* при сниженных значениях *FBXO17*, что в совокупности соответствовало высокой вероятности достижения глубокого ответа (ПР+ОХЧР) на этапе индукции. При развитии рецидива клиническая картина трансформировалась в сторону резистентного течения, что сопровождалось появлением дополнительных цитогенетических маркеров высокого риска, 1q21. Транскриптомный профиль в данной фазе претерпел существенные изменения: была зафиксирована резкая активация экспрессии гена *IL-6*, а значения экспрессии наиболее значимых генов-предикторов сместились в сторону профиля резистентности. В частности, отмечено значительное снижение уровня мРНК *IDH3B* на фоне резкого нарастания экспрессии *FBXO17,* что патофизиологически соответствует фенотипу лекарственной устойчивости. Таким образом, разбор данного клинического случая подтверждает патогенетическую значимость комплексного молекулярного мониторинга для персонализации терапевтической стратегии. Достаточно полное соответствие молекулярных характеристик конкретного пациента с выявленными в ходе работы закономерностями служит дополнительным аргументом в пользу высокой прогностической ценности предложенных маркеров и возможности их внедрения в клиническую практику.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патогенетическая значимость мутаций в генах семейства *RAS* при ММ подтверждается их влиянием на клинические исходы и чувствительность к современным протоколам лечения. Нами показано, что мутационный статус генов семейства *RAS* является фактором риска при ММ, снижающим эффективность ингибиторов протеасом на этапе индукции и ВБП у пациентов-кандидатов на ауто-ТГСК. Компаративный анализ выявил превалирующее негативное значение мутаций *KRAS* по сравнению с *NRAS*, что может быть обусловлено активацией специфических эффекторных путей. В опухолевых клетках с мутациями в генах *NRAS/KRAS* обнаружена гиперэкспрессия таргетных генов: *CREM, NRL, IL-6, MMP14, MEB2B,* которые возможно

задействованы в патогенетических механизмах, реализующих негативный эффект мутаций в генах семейства *RAS* в опухолевой клетке. Экспрессия генов *NRL, CREM, IL-6* ассоциированы с неблагоприятными клиническими проявлениями ММ: снижением эффективности терапии, ВБП и ОВ соответственно. Выявленные ассоциации экспрессий и неблагоприятного исхода заболевания подчеркивают важную роль изменения регуляции каскада RAS/ERK в прогрессии ММ. Кроме того, идентификация набора генов, ассоциированных с ответом на бортезомиб-содержащую терапию, открывает перспективы для разработки прецизионных систем стратификации риска.

В ходе транскриптомного анализа были выявлены основные гены (*IDH3B, P2RY2, TTC39B, FBXO17* и *ARHGEF7)*, уровни экспрессии которых в опухолевых клетках в наибольшей степени ассоциировались с ответом на терапию. Идентификация набора генов, ассоциированных с ответом на бортезомиб-содержащую терапию, открывает перспективы для разработки более точных систем стратификации риска.

# ВЫВОДЫ

1. Мутации в генах *KRAS/NRAS* в опухолевых клетках выявлены у 42% больных в дебюте множественной миеломы. Установлено, что наличие указанных мутаций ассоциировано с появлением костных плазмоцитом (ОШ=3,23, ДИ95% (1,05-9,53), p=0,04).
2. Показано, что наличие мутаций в гене *KRAS* оказывало статистически значимое отрицательное влияние на эффективность индукционной терапии (p=0,0009, ОШ=11,27, (ДИ95% 2,23-56,8)), выживаемость без прогрессирования (p=0,03), сопровождалось высоким содержанием парапротеина (p=0,04) и креатинина (p=0,04), низким уровнем альбумина (p=0,007), а мутации в гене *NRAS* ассоциированы с наличием множественных остеодеструкций (ОШ=12,13, ДИ95% (1,02-217,6), p=0,02).
3. Определено, что мутации в генах семейства *RAS* статистически значимо связаны с повышенной экспрессией пяти генов: *CREM* (p=0,03), *NRL* (p=0,03), *IL-6* (p=0,02), *MEF2B* (p=0,04), *MMP14* (p=0,002). Доказано, что гиперэкспрессия гена *NRL* ассоциирована со снижением глубины ответа на терапию (p=0,02), а повышенный уровень экспрессии генов *CREM* и *IL-6* достоверно коррелирует со снижением показателей выживаемости без прогрессирования (p=0,01) и общей выживаемостью (p=0,05) пациентов.
4. Установлено, что наибольшей прогностической значимостью обладают уровни экспрессии генов *IDH3B* (AUC=0,86), *P2RY2* (AUC=0,86), *FBXO17* (AUC=0,79), *TTC39B* (AUC=0,79) и *ARHGEF7* (AUC=0,79). Доказано, что гиперэкспрессия генов *IDH3B, P2RY2, TTC39B* и *ARHGEF7* ассоциирована с достижением глубокого ответа, в то время как повышенная транскрипционная активность гена *FBXO17* является маркером низкой эффективности терапии. Выявлена тенденция к снижению экспрессии гена *ARHGEF7* у пациентов с плазмоцитомами (p=0,07).

# ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С учетом полученных данных для улучшения стратификации пациентов с впервые выявленной ММ рекомендовано перед назначением бортезомиб-содержащих схем проводить тестирование на мутации в генах *NRAS/KRAS*.

Рекомендовано исследовать мутации в генах *NRAS/KRAS* методом секвенирования, так как только данный метод позволяет выявить все нуклеотидные замены в пределах 2-4 экзонов.

При использовании секвенирования по Сенгеру рекомендовано предварительно проводить селекцию CD138+ клеток для улучшения чувствительности определения мутаций.

Рекомендованный алгоритм проведения диагностического исследования:



# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|---|---|
| алло-ТГСК | аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток |
| ауто-ТГСК | аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток |
| ВБП | выживаемость без прогрессирования |
| ВДХТ | высокодозная химиотерапия |
| ВОЗ | Всемирная организация здравоохранения |
| ВПС | высокопроизводительное секвенирование |
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| кДНК | комплементарная ДНК |
| КМ | костный мозг |
| ЛДГ | лактатдегидрогеназа |
| ММ | множественная миелома |
| МОБ | минимальная остаточная болезнь |
| МРТ | магнитно-резонансная томография |
| ОВ | общая выживаемость |
| ПЗ | прогрессирование заболевания |
| ПК | плазматические клетки |
| ПР | полная ремиссия |
| ПЦР | полимеразная цепная реакция |
| РНК | рибонуклеиновая кислота |
| СЛЦ | свободные лёгкие цепи |
| СРБ | С-реактивный белок |
| УФ | ультрафиолет |
| ЭДТА | этилендиаминтетрауксусная кислота |
| ЭПР | эндоплазматический ретикулум |
| ADGRG6 | Adhesion G Protein-Coupled Receptor G6, рецептор G6, сопряжённый с G-белком адгезии |
| AKT | AKr Thymoma, Protein Kinase B, протеинкиназа B |
| AP-1 | Activator Protein 1, активирующий белок 1 (транскрипционный фактор) |
| APRIL | A Proliferation-Inducing Ligand, лиганд, индуцирующий пролиферацию |
| ARHGEF7 | Rho Guanine nucleotide Exchange Factor 7, фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Rho 7 |
| AS-PCR | Allele-Specific Polymerase chain reaction, аллель-специфическая полимеразная цепная реакция |

| | |
|---|---|
| ATAC | Assay for Transposase-Accessible Chromatin, метод оценки доступности хроматина для транспозазы |
| ATF | Activating Transcription Factor, активирующий транскрипционный фактор |
| ATM | Ataxia Telangiectasia Mutated, белок, мутирующий при атаксии-телеангиэктазии |
| AUC | Area Under the Curve, площадь под кривой |
| BAFF | B-cell activating factor, фактор активации В-клеток |
| BAK1 | BCL2-antagonist/killer 1, антагонист BCL2 / проапоптотический белок |
| BAX | Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor, регулятор апоптоза, ассоциированный с BCL2 |
| BCL-2 | BCL2 Associated X Apoptosis Regulator, белок лимфомы В-клеток 2 |
| BCL2A1 | B-cell lymphoma 2-related protein A1, антиапоптотический белок семейства BCL2 |
| BCL-XL | B-cell lymphoma-extra large, антиапоптотический белок семейства BCL2 |
| BCMA | B-cell maturation antigen, антиген созревания В-клеток |
| BIRC | Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein, бакуловирусный белок, содержащий повторы |
| BRAF | B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, серин/треонин-протеинкиназа BRAF |
| CAR-T | Chimeric Antigen Receptor T-cell, Т-лимфоциты с химерным антигенным рецептором |
| CCND | Cyclin D, циклин D |
| CD | Cluster of differentiation, кластер дифференцировки |
| CD138 | кластер дифференцировки 138 |
| CD19 | кластер дифференцировки 19 |
| CD38 | кластер дифференцировки 38 |
| CD45 | кластер дифференцировки 45 |
| CD56 | кластер дифференцировки 56 |
| c-FOS | Cellular Oncogene FBJ Murine Osteosarcoma, протоонкоген FOS |
| c-JUN | Cellular Oncogene Jun, протоонкоген JUN |
| c-MYC | Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Celular Oncogene Homolog, протоонкоген MYC |
| CRAB | hypercalcemia, renal failure, anemia, bone leisons, гиперкальциемия, почечная недостаточность, анемия, поражение костей |
| CXCR4 | C-X-C motif chemokine receptor 4, рецептор хемокина CXCR4 |
| CYLD | Cylindromatosis lysine 63 deubiquitinase, деубиквитиназа CYLD |
| DKK-1 | Dickkopf-1, белок Dickkopf-1 |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor, рецептор эпидермального фактора роста |
| ERK | Extracellular Signal-Regulated Kinase, внеклеточно-регулируемая киназа |

| | |
|---|---|
| FISH | Fluorescence in situ hybridization, флуоресцентная гибридизация in situ |
| FGFR | Fibroblast Growth Factor Receptor, рецептор фактора роста фибробластов |
| GC | Guanine, cytosine, гуанин-цитозиновый состав |
| GEP | Gene expression profile, профиль экспрессии генов |
| HCl | Hydrochloric acid, соляная кислота |
| IGH | Immunoglobulin Heavy Locusлокус тяжёлой цепи иммуноглобулина |
| IL | Interleukin, интерлейкин |
| IL-6R | Interleukin-6 receptor, рецептор интерлейкина-6 |
| IMiDs | Immunomodulatory drugs, иммуномодулирующие препараты |
| IMWG | International Myeloma Working Group, Международная рабочая группа по множественной миеломе |
| ISS | International Staging System, международная система стадирования |
| JAK | Janus Kinase, Янус-киназа |
| KRAS | Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, протоонкоген KRAS |
| MAPKs | Mitogen-Activated Protein Kinases, митоген-активируемые протеинкиназы |
| MCL1 | Myeloid Cell Leukemia 1, белок миелоидного лейкоза 1 |
| MHC I | Major Histocompatibility Complex class I, главный комплекс гистосовместимости I класса |
| mTOR | mechanistic Target Of Rapamycin, мишень рапамицина млекопитающих |
| NF-κB | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор каппа-B |
| NRAS | Neuroblastoma RAS viral oncogene, протоонкоген NRAS |
| PCR | Polymerase Chain Reaction, полимеразная цепная реакция |
| PI3K | Phosphoinositide 3-Kinase, фосфоинозитид-3-киназа |
| RANK | Receptor Activator of Nuclear Factor kB, рецептор активатора NF-κB |
| RANKL | Receptor Activator of Nuclear Factor kB Ligand, лиганд рецептора RANK |
| RAS | Rat sarcoma, семейство онкогенов RAS |
| RB1 | Retinoblastoma 1, ген ретинобластомы |
| ROC | Receiver Operating Characteristic, кривая, используемая для оценки качества диагностических тестов. |
| R-ISS | Revised International Staging System, пересмотренная международная система стадирования |
| SNV | Single Nucleotide Variant, однонуклеотидная замена |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription, активаторы транскрипции и передатчики сигнала |
| TP53 | Tumor Protein p53, опухолевый супрессор p53 |
| TT2 | Total Therapy 2 |
| TT3 | Total Therapy 3 |

| | |
|---|---|
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor, сосудистый эндотелиальный фактор роста |
| WNT | Wingless-related integration site, сигнальный путь WNT |

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Haematolymphoid tumours. // International Agency for Research on Cancer: [сайт]. – 2025. URL: https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/63/198/ - Текст: электронный.

2. Множественная миелома: клинические рекомендации: код по МКБ-10: С90.0: возрастная группа: взрослые: год утверждения: 2024 / разраб.: Нац. гематол. о-во, РОО «О-во онкогематологов», Ассоц. онкологов России // Рубрикатор клинических рекомендаций: [сайт] – URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/ - Текст: электронный.

3. Second Revision of the International Staging System (R2-ISS) for Overall Survival in Multiple Myeloma: A European Myeloma Network (EMN) Report Within the HARMONY Project / M. D'Agostino, D. A. Cairns, J. J. Lahuerta [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2022. – Vol. 40. – № 29. – P. 3406-3418.

4. Kumar, S. K. The multiple myelomas — current concepts in cytogenetic classification and therapy / S. K. Kumar, S. V. Rajkumar // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2018. – Vol. 15. – № 7. – P. 409-421.

5. Cytogenetic abnormalities in multiple myeloma: association with disease characteristics and treatment response / N. Abdallah, S. V. Rajkumar, P. Greipp [et al.] // Blood Cancer Journal. – 2020. – Vol. 10. – Cytogenetic abnormalities in multiple myeloma. – № 8. – P. 82.

6. Identification of the true hyperdiploid multiple myeloma subset by combining conventional karyotyping and FISH analysis / G. Barilà, L. Bonaldi, A. Grassi [et al.] // Blood Cancer Journal. – 2020. – Vol. 10. – № 2. – P. 18.

7. Cyclin D dysregulation: An early and unifying pathogenic event in multiple myeloma / P. L. Bergsagel, W. M. Kuehl, F. Zhan [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 106. – № 1. – P. 296-303.

8. Chromatin-based, in-cis and in-trans regulatory rewiring underpins distinct oncogenic transcriptomes in multiple myeloma. / J. Alvarez-Benayas, N. Trasanidis, A. Katsarou [et al.] // Nature communications. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 5450.

9. The molecular classification of multiple myeloma / F. Zhan, Y. Huang, S. Colla [et al.] // Blood. – 2006. – Vol. 108. – № 6. – P. 2020-2028.

10. CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms / F. Zhan, S. Zhan, S. Colla [et al.] // Blood. – 2007. – Vol. 109. – № 11. – P. 4995-5001.

11. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients / A. Broyl, D. Hose, H. Lokhorst [et al.] // Blood. – 2010. – Vol. 116. – № 14. – P. 2543-2553.

12. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma / B. A. Walker, K. Mavrommatis, C. P. Wardell [et al.] // Blood. – 2018. – Vol. 132. – № 6. – P. 587-597.

13. Bortezomib Induction and Maintenance Treatment in Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Results of the Randomized Phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 Trial / P. Sonneveld, I. G. H. Schmidt-Wolf, B. Van Der Holt [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2012. – Vol. 30. –№ 24. – P. 2946-2955.

14. Daratumumab, lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone for transplant-eligible newly diagnosed multiple myeloma: the GRIFFIN trial / P. M. Voorhees, J. L. Kaufman, J. Laubach [et al.] // Blood. – 2020. – Vol. 136. – № 8. – P. 936-945.

15. Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups / N. Bolli, G. Biancon, M. Moarii [et al.] // Leukemia. – 2014. – Vol. 32. – № 12. – P. 2604-2616.

16. Rowley, M. Activation of N-ras and K-ras induced by interleukin-6 in a myeloma cell line: implications for disease progression and therapeutic response / M. Rowley, B. V. Ness. // Oncogene. - 2002. – Vol. 21. – №57. – P. 8769-8775.

17. Introduction of an Activated N-ras Oncogene Alters the Growth Characteristics of the Interleukin 6-dependent Myeloma Cell Line ANBL6 / D. Billadeau, D. Jelinek, N. Shah [et al.]. // Cancer Research. – 1995. – Vol. 55. – №16. – P. 3640-3646.

18. Expression of NrasQ61R and MYC transgene in germinal center B cells induces a highly malignant multiple myeloma in mice / Z. Wen, A. Rajagopalan, E. Flietner [et al.]. // Blood. – 2021. – Vol. 137. – №1. – P. 61-74.

19. Hematopoiesis and leukemogenesis in mice expressing oncogenic NrasG12D from the endogenous locus / Q. Li, K. Haigis, A. M. [et al.].// Blood. – 2011. – Vol. 117. – №6. – P. 2022-2032.

20. Ras oncogene mutation in multiple myeloma. / A. Neri, J. P. Murphy, L. Cro [et al.] // The Journal of experimental medicine. – 1989. – Vol. 170. – № 5. – P. 1715-1725.

21. Favorable prognostic impact of RAS mutation status in multiple myeloma treated with high-dose melphalan and autologous stem cell support in the era of novel agents: A single center perspective / N.

Gebauer, H. Biersack, A. C. Czerwinska [et al.] // Leukemia and Lymphoma. – 2016. – Vol. 57. – № 1. – P. 226-229.

22. Whole-genome sequencing of multiple myeloma reveals oncogenic pathways are targeted somatically through multiple mechanisms / P. H. Hoang, S. E. Dobbins, A. J. Cornish [et al.] // Leukemia. – 2018. – Vol. 32. – № 11. – P. 2459-2470.

23. Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups / N. N. Bolli, G. Biancon, M. Moarii [et al.] // Leukemia. – 2016. – Vol. 32. – № 6. – P. 847.

24. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors / T. Rasmussen, M. Kuehl, M. Lodahl [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 105. – № 1. – P. 317-323.

25. Genomic Classification and Individualized Prognosis in Multiple Myeloma / F. Maura, A. R. Rajanna, B. Ziccheddu [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2024. – Vol. 42. – № 11. – P. 1229-1240.

26. Myeloma Genome Project Panel is a Comprehensive Targeted Genomics Panel for Molecular Profiling of Patients with Multiple Myeloma / P. Sudha, A. Ahsan, C. Ashby [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2022. – Vol. 28. – № 13. – P. 2854-2864.

27. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial / P. Liu, T. Leong, L. Quam [et al.] // Blood. – 1996. – Vol. 88. – № 7. – P. 2699-2706.

28. Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling / W. J. Chng, S. Kumar, S. VanWier [et al.] // Cancer Research. – 2007. – Vol. 67. – № 7. – P. 2982-2989.

29. Mutation of NRAS but not KRAS signi fi cantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy / G. Mulligan, D. I. Lichter, A. D. Bacco [et al.]. – 2014. – Vol. 123. – № 5. – P. 632-639.

30. Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies / J. L. Bos, S. Bezieau, M. Devilder [et al.] // Annu Rev Biochem. – 2015. – Vol. 85. – № 1. – P. 9268-9272.

31. Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms / B. A. Walker, C. P. Wardell, L. Melchor [et al.] // Leukemia. – 2014. – Vol. 28. – № 2. – P. 384-390.

32. Effect of MAPK activation via mutations in *NRAS* , *KRAS* and *BRAF* on clinical outcome in newly diagnosed multiple myeloma / C. Perroud, D. Thurian, M. Andres [et al.] // Hematological Oncology. – 2023. – Vol. 41. – № 5. – P. 912-921.

33. Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group / A. Palumbo, H. Avet-Loiseau, S. Oliva [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2015. – Vol. 33. – № 26. – P. 2863-2869.

34. Integrative network analysis identifies novel drivers of pathogenesis and progression in newly diagnosed multiple myeloma / A. Laganà, D. Perumal, D. Melnekoff [et al.] // Leukemia. – 2018. – Vol. 32. – № 1. – P. 120-130.

35. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells / F. Zhan, J. Hardin, B. Kordsmeier [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 99. – № 5. – P. 1745-1757.

36. Multivariant Transcriptome Analysis Identifies Modules and Hub Genes Associated with Poor Outcomes in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients / O. O. Adebayo, E. B. Dammer, C. D. Dill [et al.] // Cancers. – 2022. – Vol. 14. – № 9. – P. 2228.

37. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1 / J. D. Shaughnessy, F. Zhan, B. E. Burington [et al.] // Blood. – 2007. – Vol. 109. – № 6. – P. 2276-2284.

38. Development of gene expression-based score to predict sensitivity of multiple myeloma cells to DNA methylation inhibitors / J. Moreaux, T. Rème, W. Leonard [et al.] // Molecular Cancer Therapeutics. – 2012. – Vol. 11. – № 12. – P. 2685-2692.

39. Investigation of a gene signature to predict response to immunomodulatory derivatives for patients with multiple myeloma: an exploratory, retrospective study using microarray datasets from prospective clinical trials / M. Bhutani, Q. Zhang, R. Friend [et al.] // The Lancet. Haematology. – 2017. – Vol. 4. – № 9. – P. e443-e451.

40. A gene expression signature distinguishes innate response and resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma / A. K. Mitra, T. Harding, U. K. Mukherjee [et al.] // Blood Cancer Journal. – 2017. – Vol. 7. – № 6. – P. e581.

41. Gene expression-based prediction of myeloma cell sensitivity to histone deacetylase inhibitors / J. Moreaux, T. Reme, W. Leonard [et al.] // British Journal of Cancer. – 2013. – Vol. 109. – № 3. – P. 676-685.

42. Kinome expression profiling to target new therapeutic avenues in multiple myeloma / H. de Boussac, A. Bruyer, M. Jourdan [et al.] // Haematologica. – 2020. – Vol. 105. – № 3. – P. 784-795.

43. Effects of IL-6 Variants in Multiple Myeloma: Growth Inhibition and Induction of Apoptosis in Primary Cells / M. T. Petrucci, M. R. Ricciardi, C. Gregorj [et al.] // Leukemia & Lymphoma. – 2002. – Vol. 43. – Effects of IL-6 Variants in Multiple Myeloma. – № 12. – P. 2369-2375.

44. Exploring BCL2 regulation and upstream signaling transduction in venetoclax resistance in multiple myeloma: potential avenues for therapeutic intervention / R. Fonseca, Y. X. Zhu, L. A. Bruins [et al.] // Blood Cancer Journal. – 2025. – Vol. 15. –№ 1. – P. 10.

45. Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma / S. Barrio, T. Stühmer, M. Da-Viá [et al.] // Leukemia. – 2019. – Vol. 33. – № 2. – P. 447-456.

46. Identification of resistance pathways and therapeutic targets in relapsed multiple myeloma patients through single-cell sequencing / Y. C. Cohen, M. Zada, S.-Y. Wang [et al.] // Nature Medicine. – 2021. – Vol. 27. – № 3. – P. 491-503.

47. Bortezomib-resistant myeloma cell lines: a role for mutated PSMB5 in preventing the accumulation of unfolded proteins and fatal ER stress / M. Ri, S. Iida, T. Nakashima [et al.] // Leukemia. – 2010. – Vol. 24. – Bortezomib-resistant myeloma cell lines. – № 8. – P. 1506-1512.

48. Various Signaling Pathways in Multiple Myeloma Cells and Effects of Treatment on These Pathways / A. Dehghanifard, S. Kaviani, S. Abroun [et al.] // Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. – 2018. – Vol. 18. – № 5. – P. 311-320.

49. Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling / F. Accardi, D. Toscani, M. Bolzoni [et al.] // BioMed Research International. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-13.

50. TM -233, a novel analog of 1′-acetoxychavicol acetate, induces cell death in myeloma cells by inhibiting both JAK / STAT and proteasome activities / M. Sagawa, T. Tabayashi, Y. Kimura [et al.] // Cancer Science. – 2015. – Vol. 106. – № 4. – P. 438-446.

51. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma / B. G. Barwick, V. A. Gupta, P. M. Vertino, L. H. Boise // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1121.

52. Chromatin Accessibility Identifies Regulatory Elements Predictive of Gene Expression and Disease Outcome in Multiple Myeloma / B. G. Barwick, V. A. Gupta, S. M. Matulis [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2021. – Vol. 27. – № 11. – P. 3178-3189.

53. Single-cell analysis of multiple myelomas refines the molecular features of bortezomib treatment responsiveness / S.-H. Jung, S.-S. Park, J.-Y. Lim [et al.] // Experimental & Molecular Medicine. – 2022. – Vol. 54. – № 11. – P. 1967-1978.

54. Pharmacogenomics of bortezomib test-dosing identifies hyperexpression of proteasome genes, especially PSMD4, as novel high-risk feature in myeloma treated with Total Therapy 3 / J. D. Shaughnessy, P. Qu, S. Usmani [et al.] // Blood. – 2011. – Vol. 118. – № 13. – P. 3512-3524.

55. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon / K. Haigis, K. Kendall, Y. Wang [et al.].// Nature Genetics. – 2008. – Vol. 40. – № 5. – P. 600-608.

56. Ras oncogene mutation in multiple myeloma. / A. Neri, J. P. Murphy, L. Cro [et al.] // The Journal of experimental medicine. – 1989. – Vol. 170. – № 5. – P. 1715-1725.

57. Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies / A. Neri, D. M. Knowlest, A. Greco [et al.]. – 1988. – Vol. 85. – № December. – P. 9268-9272.

58. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma / R. W. Chng, N. Gonzalez-Paz, T. Price-Troska [et al.] // Leukemia. – 2008. – Vol. 6. – № 9. – P. 2166-2171.

59. Нарейко, М. В. Особенности экспрессии генов c-MYC, CCND1, MMSET и мутационный статус генов семейства RAS при множественной миеломе: специальность 3.01.28 «Гематология и переливание крови»: диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук/ Нарейко Мария Вячеславовна; ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава Российской Федерации, 2017. – 128 с. – Библиогр.: с. 104–106.

60. Europe PMC Funders Group Mutational Spectrum , Copy Number Changes , and Outcome : Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma / B. A. Walker, E. M. Boyle, C. P. Wardell [et al.]. – 2015. – Vol. 33. – № 33. – P. 3911-3920.

61. Treatment of RAS-Mutated Multiple Myeloma by Targeting MAP4K2 / S. Li, J. Fu, X. Xu [et al.] // Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. – 2019. – Vol. 19. – № 10. – P. e131-e132.

62. Yoshizawa, R. Cell cycle dependence of ERK activation dynamics is regulated by PI3K and PAK1 signaling / R. Yoshizawa, Y. Sako // Scientific Reports. – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 27688.

63. Oncogenic RAS mutations in myeloma cells selectively induce cox-2 expression, which participates in enhanced adhesion to fibronectin and chemoresistance / B. Hoang, L. Zhu, Y. Shi [et al.] // Blood. – 2006. – Vol. 107. – № 11. – P. 4484-4490.

64. Oncogenic Ras mutant causes the hyperactivation of NF-κB via acceleration of its transcriptional activation / K. Tago, M. Funakoshi-Tago, S. Ohta [et al.] // Molecular Oncology. – 2019. – Vol. 13. – № 11. – P. 2493-2510.

65. Activating KRAS, NRAS, and BRAF Mutants Enhance Proteasome Capacity and Reduce Endoplasmic Reticulum Stress in Multiple Myeloma, Thereby Promoting Plasma Cell Survival and Proteasome Inhibitor Resistance / F. Shirazi, R. J. Jones, I. Kuiatse [et al.] // Blood. – 2018. – Vol. 132. – № Supplement 1. – P. 406-406.

66. Treatment of multiple myeloma-related bone disease: recommendations from the Bone Working Group of the International Myeloma Working Group / E. Terpos, E. Zamagni, S. Lentzsch [et al.] // The Lancet Oncology. – 2021. – Vol. 22. – № 3. – P. e119-e130.

67. Sezer, O. Myeloma Bone Disease: Recent Advances in Biology, Diagnosis, and Treatment / O. Sezer // The Oncologist. – 2009. – Vol. 14. – Myeloma Bone Disease. – № 3. – P. 276-283.

68. Multiple myeloma: signaling pathways and targeted therapy / Q. Lu, D. Yang, H. Li [et al.] // Molecular Biomedicine. – 2024. – Vol. 5. – Multiple myeloma. – № 1. – P. 25.

69. Panaroni, C. Myeloma and Bone Disease / C. Panaroni, A. J. Yee, N. S. Raje // Current Osteoporosis Reports. – 2017. – Vol. 15. – № 5. – P. 483-498.

70. International Myeloma Working Group Recommendations for the Diagnosis and Management of Myeloma-Related Renal Impairment / M. Dimopoulos, P. Sonneveld, N. Leung [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2016. – Vol. 34. – № 13. – P. 1544-1557.

71. Characteristics and outcome of multiple myeloma patients presenting with anaemia only: A retrospective multi-centre study / T. Shragai, M. E. Gatt, A. Shaulov [et al.] // Leukemia Research. – 2021. – Vol. 101. – P. 106498.

72. Calculated Whole Blood Viscosity and Albumin/Fibrinogen Ratio in Patients with a New Diagnosis of Multiple Myeloma: Relationships with Some Prognostic Predictors / M. Carlisi, R. Lo Presti, S. Mancuso [et al.] // Biomedicines. – 2023. – Vol. 11. – № 3. – P. 964.

73. Dispenzieri, A. Neurological aspects of multiple myeloma and related disorders / A. Dispenzieri, R. A. Kyle // Best Practice & Research Clinical Haematology. – 2005. – Vol. 18. – № 4. – P. 673-688.

74. Multifocal neuropathy due to plasma cell infiltration of peripheral nerves in multiple myeloma / C. Denier, P. Lozeron, D. Adams [et al.] // Neurology. – 2006. – Vol. 66. – № 6. – P. 917-918.

75. Silberman, J. Review of peripheral neuropathy in plasma cell disorders / J. Silberman, S. Lonial // Hematological Oncology. – 2008. – Vol. 26. – № 2. – P. 55-65.

76. Multiple Myeloma: Molecular Pathogenesis and Disease Evolution / M. Heider, K. Nickel, M. Högner, F. Bassermann // Oncology Research and Treatment. – 2021. – Vol. 44. – Multiple Myeloma. – № 12. – P. 672-681.

77. Host-related immunodeficiency in the development of multiple myeloma / T. Dosani, S. Mailankody, N. Korde [et al.] // Leukemia & Lymphoma. – 2018. – Vol. 59. – № 5. – P. 1127-1132.

78. Immune System Alterations in Multiple Myeloma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies to Reverse Immunosuppression / A. Díaz-Tejedor, M. Lorenzo-Mohamed, N. Puig [et al.] // Cancers. – 2021. – Vol. 13. – № 6. – P. 1353.

79. Secondary Immunodeficiency in Hematological Malignancies: Focus on Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia / A. Allegra, A. Tonacci, C. Musolino [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2021. – Vol. 12. – P. 738915.

80. Van De Donk, N. W. Multiple myeloma / N. W. Van De Donk, C. Pawlyn, K. L. Yong // The Lancet. – 2021. – Vol. 397. – № 10272. – P. 410-427.

81. Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 / A. J. Cowan, C. Allen, A. Barac [et al.] // JAMA Oncology. – 2018. – Vol. 4. – Global Burden of Multiple Myeloma. – № 9. – P. 1221.

82. Recent trends in multiple myeloma incidence and survival by age, race, and ethnicity in the United States / L. J. Costa, I. K. Brill, J. Omel [et al.] // Blood Advances. – 2017. – Vol. 1. – № 4. – P. 282-287.

83. Epidemiology of multiple myeloma in city Moscow / O. Y. Vinogradova, V. V. Ptushkin, M. V. Chernikov [et al.] // Terapevticheskii arkhiv. – 2019. – Vol. 91. – № 7. – P. 83-92.

84. Analysis of the epidemiological characteristics of multiple myeloma and clinical factors affecting the course of the disease / Zh. M. Kozich, V. N. Martinkov, I. V. Veyalkin [et al.] // Medical and Biological Problems of Life Activity. – 2023. – № 1. – P. 55-61.

85. Миелома молодых: особенности клиники и течения заболевания / О. В. Коробицына, К. О. Фаризова, Е. А. Коробкин [и др.] //Вестник Челябинской областной клинической больницы. – 2019. – №. 4. – С. 2-6.

86. Multiple Myeloma: A Rare Case in an 8-Year-Old Child / E. D. Crusoe, A. M. Da Silva, J. Agareno [et al.] // Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. – 2015. – Vol. 15. – № 1. – P. e31-e33.

87. Epidemiology of multiple myeloma according to the кirov region population registers / A. S. Luchinin, S. V. Semochkin, N. V. Minaeva [et al.] // Oncohematology. – 2017. – Vol. 12. – № 3. – P. 50-56.

88. Epidemiology of multiple myeloma in Novosibirsk (Siberian federal district) / N. V. Skvortsova, T. I. Pospelova, I. B. Kovynev [et al.] // Klinicheskaya Onkogematologiya/Clinical Oncohematology. – 2019. – Vol. 12. – № 1. – P. 86-94.

89. Epidemiology of multiple myeloma according to the kirov region population registers / A. S. Luchinin, S. V. Semochkin, N. V. Minaeva [et al.] // Oncogematologiya. – 2017. – Vol. 12. – № 3. – P. 50-56.

90. Лучинин, А. С. "Клинико-эпидемиологическая характеристика и факторы прогноза множественной миеломы: спец. 14.01. 21 «Гематология и переливание крови»: диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук/ Лучинин Александр Сергеевич; ФГБУ «Национальный мед. исслед. центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», 2018. – 102 с. – Библиогр.: с. 80-82.

91. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study / O. Landgren, R. A. Kyle, R. M. Pfeiffer [et al.] // Blood. – 2009. – Vol. 113. –№ 22. – P. 5412-5417.

92. Association of Immune Marker Changes With Progression of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance to Multiple Myeloma / O. Landgren, J. N. Hofmann, C. M. McShane [et al.] // JAMA Oncology. – 2019. – Vol. 5. – № 9. – P. 1293-1301.

93. Brown LM1, Gridley G, Check D, L. O. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. / L. O. Brown, G. Gridley, D. Check // Blood. – 2008. – Vol. 111. – № 7. – P. 3388-3394.

94. Family history of hematologic malignancies and risk of multiple myeloma: differences by race and clinical features / M. A. VanValkenburg, G. I. Pruitt, I. K. Brill [et al.] // Cancer Causes and Control. – 2016. – Vol. 27. – № 1. – P. 81-91.

95. Bianchi, G. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma / G. Bianchi, N. C. Munshi // Blood. – 2015. – Vol. 125. – № 20. – P. 3049-3058.

96. Geriatric assessment in multiple myeloma patients: validation of the International Myeloma Working Group (IMWG) score and comparison with other common comorbidity scores / M. Engelhardt, S. M. Dold, G. Ihorst [et al.] // Haematologica. – 2016. – Vol. 101. – № 9. – P. 1110-1119.

97. Durie, B. G. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival / B. G. Durie, S. E. Salmon // Cancer. – 1975. – Vol. 36. – № 3. – P. 842-854.

98. International staging system for multiple myeloma / P. R. Greipp, J. San Miguel, B. G. Durie [et al.] // Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2005. – Vol. 23. – № 15. – P. 3412-3420.

99. C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system / R. Bataille, M. Boccadoro, B. Klein [et al.] // Blood. – 1992. – Vol. 80. – № 3. – P. 733-737.

100. Bonello, F. Risk Stratification before and During Treatment in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: From Clinical Trials to the Real-World Setting / F. Bonello, L. Cani, M. D'Agostino // Frontiers in Oncology. – 2022. – Vol. 12. – P. 830922.

101. High subclonal fraction of 17p deletion is associated with poor prognosis in multiple myeloma / A. Thakurta, M. Ortiz, P. Blecua [et al.] // Blood. – 2019. – Vol. 133. – № 11. – P. 1217-1221.

102. Rajkumar, S. V. Multiple myeloma: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management / S. V. Rajkumar // American Journal of Hematology. – 2024. – Vol. 99. – № 9. – P. 1802-1824.

103. Sawyer, J. R. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma / J. R. Sawyer // Cancer Genetics. – 2011. – Vol. 204. – № 1. – P. 3-12.

104. Biran, N. Risk stratification in multiple myeloma, part 2: the significance of genetic risk factors in the era of currently available therapies / N. Biran, S. Jagannath, A. Chari // Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O. – 2013. – Vol. 11. – № 9. – P. 578-583.

105. Prognostic implications of abnormalities of chromosome 13 and the presence of multiple cytogenetic high-risk abnormalities in newly diagnosed multiple myeloma / M. Binder, S. V. Rajkumar, R. P. Ketterling [et al.] // Blood Cancer Journal. – 2017. – Vol. 7. – № 9. – P. e600-e600.

106. A gene expression signature for high-risk multiple myeloma / R. Kuiper, A. Broyl, Y. De Knegt [et al.] // Leukemia. – 2012. – Vol. 26. – № 11. – P. 2406-2413.

107. Garfall, A. L. New Biological Therapies for Multiple Myeloma / A. L. Garfall // Annual Review of Medicine. – 2024. – Vol. 75. – № 1. – P. 13-29.

108. Triplet therapies – the new standard of care for multiple myeloma: how to manage common toxicities / A. Paner, T. M. Okwuosa, K. J. Richardson, E. N. Libby // Expert Review of Hematology. – 2018. – Vol. 11. – № 12. – P. 957-973.

109. Overall Survival with Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone in Previously Treated Multiple Myeloma (CASTOR): A Randomized, Open-Label, Phase III Trial / P. Sonneveld, A. Chanan-Khan, K. Weisel [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2023. – Vol. 41. – № 8. – P. 1600-1609.

110. Multiple myeloma: response to treatment and survival of patients according to the interim analysis of the Russian observational, retrospective-prospective, multicenter cohort study (MULTISPECT) / V. V. Ptushkin, M. A. Kunst, T. A. Mitina [et al.] // Terapevticheskii arkhiv. – 2022. – Vol. 94. – № 7. – P. 827-835.

111. The Role of Bispecific Antibodies in Relapsed Refractory Multiple Myeloma: A Systematic Review / R. Khanam, O. S. Ashruf, S. H. B. Waqar [et al.] // Antibodies. – 2023. – Vol. 12. – № 2. – P. 38.

112. Rasche, L. CAR T-cell therapy in multiple myeloma: mission accomplished? / L. Rasche, M. Hudecek, H. Einsele // Blood. – 2024. – Vol. 143. – № 4. – P. 305-310.

113. Ding, H. CAR-T Therapy in Relapsed Refractory Multiple Myeloma / H. Ding, Y. Wu // Current Medicinal Chemistry. – 2024. – Vol. 31. – № 27. – P. 4362-4382.

114. Brudno, J. N. CAR T Cells and T-Cell Therapies for Cancer: A Translational Science Review / J. N. Brudno, M. V. Maus, C. S. Hinrichs // JAMA. – 2024. – Vol. 332. – № 22. – P. 1924.

115. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial / C. B. Reeder, D. E. Reece, V. Kukreti [et al.] // Leukemia. – 2009. – Vol. 23. – № 7. – P. 1337-1341.

116. Response and prognosis of patients with multiple myeloma induced by PAD/TAD / T. Zeng, H. He, H. Shi [et al.] // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. – 2015. – Vol. 95. – № 10. – P. 731-735.

117. Phase III trial of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone (VCD) versus bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAd) in newly diagnosed myeloma / E. K. Mai, U. Bertsch, J. Dürig [et al.] // Leukemia. – 2015. – Vol. 29. – № 8. – P. 1721-1729.

118. Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone (VRd) followed by autologous stem cell transplant for multiple myeloma / M. H. Sidiqi, M. A. Aljama, I. Bin Riaz [et al.] // Blood Cancer Journal. – 2018. – Vol. 8. – № 11. – P. 106.

119. Daratumumab, Bortezomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma / P. Sonneveld, M. A. Dimopoulos, M. Boccadoro [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2024. – Vol. 390. – № 4. – P. 301-313.

120. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications / S. Manier, K. Z. Salem, J. Park [et al.] // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2017. – Vol. 14. – № 2. – P. 100-113.

121. Impact of Genes Highly Correlated with *MMSET* Myeloma on the Survival of Non- *MMSET* Myeloma Patients / S. P. Wu, R. M. Pfeiffer, I. E. Ahn [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2016. – Vol. 22. – № 16. – P. 4039-4044.

122. Rajkumar, S. V. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management / S. V. Rajkumar // American Journal of Hematology. – 2022. – Vol. 97. – № 8. – P. 1086-1107.

123. Multiple myeloma with t(11;14): impact of novel agents on outcome / B. Puertas, V. González-Calle, E. Sobejano-Fuertes [et al.] // Blood Cancer Journal. – 2023. – Vol. 13. – Multiple myeloma with t(11;14). – № 1. – P. 40.

124. del(17p) without *TP53* mutation confers a poor prognosis in intensively treated newly diagnosed patients with multiple myeloma / J. Corre, A. Perrot, D. Caillot [et al.] // Blood. – 2021. – Vol. 137. – № 9. – P. 1192-1195.

125. Role of 1q21 in Multiple Myeloma: From Pathogenesis to Possible Therapeutic Targets / J. Burroughs Garcìa, R. A. Eufemiese, P. Storti [et al.] // Cells. – 2021. – Vol. 10. – Role of 1q21 in Multiple Myeloma. – № 6. – P. 1360.

126. Outcome of Multiple Myeloma with Chromosome 1q Gain and 1p Deletion after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Propensity Score Matched Analysis / A. Varma, D. Sui, D. R. Milton [et al.] // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2020. – Vol. 26.– № 4. – P. 665-671.

127. Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotypes / A. N. Mohamed, G. Bentley, M. L. Bonnett [et al.] // American Journal of Hematology. – 2007. – Vol. 82. – № 12. – P. 1080-1087.

128. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma : the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma : the experience of the Intergroupe Francophone du Mye´lome / H. Avet-loiseau, M. Attal, P. Moreau [et al.]. – 2007. – Vol. 109. – № 8. – P. 3489-3495.

129. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. / S. V. Rajkumar, M. A. Dimopoulos, A. Palumbo [et al.] // The Lancet. Oncology. – 2014. – Vol. 15. – № 12. – P. e538-48.

130. Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients / B. A. Walker, C. P. Wardell, A. Brioli [et al.] // Blood Cancer Journal. – 2014. – Vol. 4. – № 3. – P. e191-e191.

131. Europe PMC Funders Group Mutational Spectrum , Copy Number Changes , and Outcome : Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma / B. A. Walker, E. M. Boyle, C. P. Wardell [et al.]. – 2015. – Vol. 33. – № 33. – P. 3911-3920.

132. The spectrum of somatic mutations in monoclonal gammopathy of undetermined significance indicates a less complex genomic landscape than that in multiple myeloma / A. Mikulasova, C. P. Wardell, A. Murison [et al.] // Haematologica. – 2017. – Vol. 102. – № 9. – P. 1617-1625.

133. Molecular and biologic markers of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma / S. Mailankody, E. Mena, C. M. Yuan [et al.] // Leukemia & Lymphoma. – 2010. – Vol. 51. – № 12. – P. 2159-2170.

134. Subclonal evolution in disease progression from MGUS/SMM to multiple myeloma is characterised by clonal stability / A. K. Dutta, J. L. Fink, J. P. Grady [et al.] // Leukemia. – 2019. – Vol. 33. – № 2. – P. 457-468.

135. Single-cell profiling of tumour evolution in multiple myeloma — opportunities for precision medicine / A. K. Dutta, J. B. Alberge, R. Sklavenitis-Pistofidis [et al.] // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2022. – Vol. 19. – № 4. – P. 223-236.

136. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy / J. Downward // Nature Reviews Cancer. – 2003. – Vol. 3. – № 1. – P. 11-22.

137. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance / G. A. Hobbs, C. J. Der, K. L. Rossman//Journal of cell science. – 2016. – Vol. 129. – № 7. – P. 1287-1292.

138. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal / J. Gao, B. A. Aksoy, U. Dogrusoz [et al.]. // Science Signaling. – 2013. – Vol. 6. – № 269. – pl.1.

139. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. / S. Forbes, D. Beare, P. Gunasekaran [et al.].// Nucleic Acids Research. – 2015. – Vol. 43 (Database issue). – P. D805-D811.

140. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. / S. Manier, J. Park, M. Capelletti [et al.] // Nature communications. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 1691.

141. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells / N. M. Hamad, J. H. Elconin, A. E. Karnoub [et al.]. // Genes Development. – 2002. – Vol.15. – № 16. – P. 2045-57.

142. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients / B. M. Weiss, J. Abadie, P. Verma [et al.] // Blood. – 2009. – Vol. 113. – № 22. – P. 5418-5422.

143. Molecular spectrum of BRAF, NRAS and KRAS gene mutations in plasma cell dyscrasias: implication for MEK-ERK pathway activation / M. Lionetti, M. Barbieri, K. Todoerti [et al.] // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6. – № 27. – P. 24205-24217.

144. Alterations of *RAS* signalling in Chinese multiple myeloma patients: absent *BRAF* and rare *RAS* mutations, but frequent inactivation of *RASSF1A* by transcriptional silencing or expression of a non-

functional variant transcript / M. H. Ng, K. M. Lau, W. S. Wong [et al.] // British Journal of Haematology. – 2003. – Vol. 123. – № 4. – P. 637-645.

145. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis / B. A. Walker, K. Mavrommatis, C. P. Wardell [et al.] // Leukemia. – 2019. – Vol. 33. – № 1. – P. 159-170.

146. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells / F. Zhan, J. Hardin, B. Kordsmeier [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 99. – № 5. – P. 1745-1757.

147. Integrative Analysis of Bulk RNA-Seq and Single-Cell RNA-Seq Unveils Novel Prognostic Biomarkers in Multiple Myeloma / J. Zhao, X. Wang, H. Zhu [et al.] // Biomolecules. – 2022. – Vol. 12. – № 12. – P. 1855.

148. Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: A study of the Intergroupe Francophone du Myélom / O. Decaux, L. Lodé, F. Magrangeas [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2008. – Vol. 26. – № 29. – P. 4798-4805.

149. Inhibition of aurora kinases for tailored risk-adapted treatment of multiple myeloma. / D. Hose, T. Rème, T. Meissner [et al.] // Blood. – 2009. – Vol. 113. – № 18. – P. 4331-4340.

150. Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome / N. J. Dickens, B. A. Walker, P. E. Leone [et al.] // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. – 2010. – Vol. 16. – № 6. – P. 1856-1864.

151. Gene expression of anti- and pro-apoptotic proteins in malignant and normal plasma cells / M. Jourdan, T. Reme, H. Goldschmidt [et al.] // British Journal of Haematology. – 2009. – Vol. 145. – № 1. – P. 45-58.

152. A gene expression signature for high-risk multiple myeloma / R. Kuiper, A. Broyl, Y. De Knegt [et al.] // Leukemia. – 2012. – Vol. 26. – № 11. – P. 2406-2413.

153. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1 / J. D. Shaughnessy, F. Zhan, B. E. Burington [et al.] // Blood. – 2007. – Vol. 109. – № 6. – P. 2276-2284.

154. Rna-sequencing-based transcriptomic score with prognostic and theranostic values in multiple myeloma / E. Alaterre, V. Vikova, A. Kassambara [et al.] // Journal of Personalized Medicine. – 2021. – Vol. 11. – № 10.

155. The centrosome index is a powerful prognostic marker in myeloma and identifies a cohort of patients that might benefit from aurora kinase inhibition / W. J. Chng, E. Braggio, G. Mulligan [et al.] // Blood. – 2008. – Vol. 111. – № 3. – P. 1603-1609.

156. Antioxidant Defenses Confer Resistance to High Dose Melphalan in Multiple Myeloma Cells / C. Gourzones, C. Bellanger, S. Lamure [et al.] // Cancers. – 2019. – Vol. 11. – № 4. – P. 439.

157. Wu, P.-K. Growth Inhibitory Signaling of the Raf/MEK/ERK Pathway / P.-K. Wu, A. Becker, J.-I. Park // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 15. – P. 5436.

158. Combined MEK1/2 and ATR inhibition promotes myeloma cell death through a STAT3-dependent mechanism in vitro and in vivo / L. Li, X. Hu, J. Nkwocha [et al.] // British Journal of Haematology. – 2024. – Vol. 205. – № 6. – P. 2338-2348.

159. Combined targeting of MEK/MAPK and PI3K/Akt signalling in multiple myeloma / T. Steinbrunn, T. Stühmer, C. Sayehli [et al.] // British Journal of Haematology. – 2012. – Vol. 159. – № 4. – P. 430-440.

160. Song, D. The potential of activator protein 1 (AP-1) in cancer targeted therapy / D. Song, Y. Lian, L. Zhang // Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 14. – P. e1224892.

161. Multiple myeloma: signaling pathways and targeted therapy / Q. Lu, D. Yang, H. Li [et al.] // Molecular Biomedicine. – 2024. – Vol. 5. – Multiple myeloma. – № 1. – P. 25.

162. The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma / E. Tian, F. Zhan, R. Walker [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2003. – Vol. 349. – № 26. – P. 2483-2494.

163. Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanisms and targeting options / H. Van Andel, K. A. Kocemba, M. Spaargaren, S. T. Pals // Leukemia. – 2019. – Vol. 33. – № 5. – P. 1063-1075.

164. Serum albumin level is a significant prognostic factor reflecting disease severity in symptomatic multiple myeloma / J. E. Kim, C. Yoo, D. H. Lee [et al.] // Annals of Hematology. – 2010. – Vol. 89. – № 4. – P. 391-397.

165. Matthes, T. Revisiting IL-6 antagonism in multiple myeloma / T. Matthes, B. Manfroi, B. Huard // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2016. – Vol. 105. – P. 1-4.

166. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis / M. A. Frassanito, A. Cusmai, G. Iodice, F. Dammacco // Blood. – 2001. – Vol. 97. – Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma. – № 2. – P. 483-489.

167. Harmer, D. Interleukin-6 Interweaves the Bone Marrow Microenvironment, Bone Loss, and Multiple Myeloma / D. Harmer, C. Falank, M. R. Reagan // Frontiers in Endocrinology. – 2018. – Vol. 9. – P. 788.

168. Perper, R. J. Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation / R. J. Perper, T. W. Zee, M. M. Mickelson // The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. – 1968. – Vol. 72. – № 5. – P. 842-848.

169. Impact of CD138 Magnetic Bead-based Positive Selection on Bone Marrow Plasma Cell Surface Markers / R. Bansal, T. Kimlinger, K. A. Gyotoku [et al.] // Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. e48-e51.

170. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data / S. Andrews // Babraham Bioinformatics: [software]. – 2010. – URL: www.bioinformatics.babraham.ac.uk.

171. Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis / Q. Sheng, K. Vickers, S. Zhao [et al.] // Briefings in Functional Genomics. – 2017. – Vol. 16. – № 4. – P. 194-204.

172. Atlas of RNA sequencing profiles for normal human tissues / M. Suntsova, N. Gaifullin, D. Allina [et al.] // Scientific Data. – 2019. – Vol. 6. – № 1. – P. 36.

173. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression / R. Patro, G. Duggal, M. I. Love [et al.] // Nature Methods 2017 14:4. – 2017. – Vol. 14. – № 4. – P. 417-419.

174. Tximeta: Reference sequence checksums for provenance identification in RNA-seq / M. I. Love, C. Soneson, P. F. Hickey [et al.] // PLOS Computational Biology. – 2020. – Vol. 16. – № 2. – P. e1007664.

175. Soneson, C. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences / C. Soneson, M. I. Love, M. D. Robinson // F1000Research. – 2016. – Vol. 4. – P. 1521.

176. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt / S. Durinck, P. T. Spellman, E. Birney, W. Huber // Nature Protocols 2009 4:8. – 2009. – Vol. 4. – № 8. – P. 1184-1191.

177. Love, M. I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / M. I. Love, W. Huber, S. Anders // Genome Biology. – 2014. – Vol. 15. – № 12. – P. 550.

178. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC) / P. Horak, M. Griffith, A. M. Danos [et al.] // Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics. – 2022. – Vol. 24. – № 9. – P. 1991.

179. Single cell characterization of myeloma and its precursor conditions reveals transcriptional signatures of early tumorigenesis / R. Boiarsky, N. J. Haradhvala, J.-B. Alberge [et al.] // Nature Communications. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 7040.

180. Сравнение молекулярно-генетической структуры опухолевых клеток до лечения и после констатации рецидива множественной миеломы (краткий обзор и описание клинического случая)/ А. М.Сергеева, Т. В. Абрамова, В. Л. Сурин [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т. 64. – № 3. – С. 362-374.

181. Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma / F. Maura, N. Bolli, N. Angelopoulos [et al.] // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-12.

182. Pylayeva-Gupta Y. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web / Y. Pylayeva-Gupta, E. Grabocka, D. Bar-Sagi // Nature Reviews Cancer. – 2011. – Vol. 11.– № 11. – P. 761-774.

183. Wild-Type NRas and KRas Perform Distinct Functions during Transformation / P. P. Fotiadou, C. Takahashi, H. N. Rajabi, M. E. Ewen // Molecular and Cellular Biology. – 2007. – Vol. 27. – № 19. – P. 6742-6755.

184. Hernandez-Valladares, M. Comparative proteomic analysis of compartmentalised Ras signalling / M. Hernandez-Valladares, I. A. Prior // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 17307.

185. Plasma cell myeloma with *RAS/BRAF* mutations is frequently associated with a complex karyotype, advanced stage disease, and poorer prognosis / N. Li, P. Lin, Z. Zuo [et al.] // Cancer Medicine. – 2023. – Vol. 12. – № 13. – P. 14293-14304.

186. Outcomes of Maintenance Therapy with Bortezomib after Autologous Stem Cell Transplantation for Patients with Multiple Myeloma / D. Sivaraj, M. M. Green, Z. Li [et al.] // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2017. – Vol. 23. – № 2. – P. 262-268.

187. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: chromosomal aberrations, changes in gene expression, cytokine networks, and the bone marrow microenvironment. / B. Klein, A. Seckinger, T. Moehler, D. Hose // Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer. – 2011. – Vol. 183. – P. 39-86.

188. Lauta, V. M. Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data / V. M. Lauta // Cytokine. – 2001. – Vol. 16. – № 3. – P. 79-86.

189. Activating mutations in the N- and K-ras oncogenes differentially affect the growth properties of the IL-6-dependent myeloma cell line ANBL6 / D. Billadeau, P. Liu, D. Jelinek [et al.] // Cancer Research. – 1997. – Vol. 57. – № 11. – P. 2268-2275.

190. CREM Is Correlated With Immune-Suppressive Microenvironment and Predicts Poor Prognosis in Gastric Adenocarcinoma / K. Yu, L. Kuang, T. Fu [et al.] // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – Vol. 9. – P. 697748.

191. Regulation of stress tolerance by CREB1 sustains multiple myeloma cell survival / R. Kudalkar, J. Altom, J. Galloway [et al.] // Cell Death & Disease. – 2026. – Vol. 17. – № 1. – P. 46.

192. Targeting myeloma metabolism: How abnormal metabolism contributes to multiple myeloma progression and resistance to proteasome inhibitors / X. Zhou, R. He, W.-X. Hu [et al.] // Neoplasia. – 2024. – Vol. 50. – P. 100974.

193. Selinexor in relapsed/refractory multiple myeloma / J. Richter, D. Madduri, S. Richard, A. Chari // Therapeutic Advances in Hematology. – 2020. – Vol. 11. – P. 2040620720930629.

194. FBXO17 promotes cell proliferation through activation of Akt in lung adenocarcinoma cells / T. L. Suber, I. Nikolli, M. E. O'Brien [et al.] // Respiratory Research. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 206.

195. Comprehensive molecular profiling of multiple myeloma identifies refined copy number and expression subtypes / S. Skerget, D. Penaherrera, A. Chari [et al.] // Nature Genetics. – 2024. – Vol. 56. – № 9. – P. 1878-1889.

196. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients / A. Broyl, D. Hose, H. Lokhorst [et al.] // Blood. – 2010. – Vol. 116. – № 14. – P. 2543-2553.

# ПРИЛОЖЕНИЕ А

справочное

Рисунок А.1 – Глубина ответа на терапию при ММ согласно рекомендациям, IMWG 2016.

| |
|---|
| • Строгий полный ответ/строгая полная ремиссия (сПО/сПР):<br><br>полный ответ/полная ремиссия при нормальном соотношении свободных легких цепей (СЛЦ) и отсутствие клональных ПК при иммуногистохимии/проточной цитометрии (менее $10^{-5}$). |
| • Полный ответ/полная ремиссия (ПО/ПР):<br><br>отрицательный результат при иммунофиксации сыворотки и мочи и отсутствие плазмоцитом мягких тканей; менее 5% ПК в костном мозге;<br>при ММ измеряемой только по уровню СЛЦ необходимо нормальное соотношение СЛЦ (k/l 0,26-1,65) |
| • Очень хороший частичный ответ/ Очень хорошая частичная ремиссия (ОХЧО/ОХЧР**):**<br><br>М-протеин в сыворотке крови и мочи определяется только методом иммунофиксации, но не при электрофорезе или отмечается снижение уровня М-компонента в сыворотке >90% или М-компонент в моче <100 мг/сут;<br>при ММ измеряемой только по уровню СЛЦ необходимо снижение соотношения СЛЦ на 90% и более. |
| • Частичный ответ/ частичная ремиссия (ЧО/ЧР)**:**<br><br>снижение уровня сывороточного М-компонента ≥50% и снижение 24-часовой экскреции М-белка с мочой ≥90% (или <200 мг/сут); размеры плазмоцитом мягких тканей должны уменьшится более, чем на 50%;<br>при ММ измеряемой только по уровню СЛЦ необходимо снижение соотношения СЛЦ на 50% и более. |
| • Стабилизация заболевания (СЗ):<br><br>не достигнуты критерии ЧО/ЧР, несоответствие критериям прогрессирования ММ. |
| • Прогрессирование заболевания (ПЗ):<br><br>увеличение М-белка ≥25% от наименьшего значения (абсолютный прирост ≥5 г/л), увеличение числа плазматических клеток в КМ (не менее 10%), появление новых очагов в костях или увеличение размера ранее определяемых, появление новых плазмоцитом или определение их размеров, гиперкальциемия (уровень кальция в сыворотке >11,5 мг/дл или 2,75 ммоль/л), которую можно связать с плазмоклеточной пролиферацией.<br>при ММ измеряемой только по уровню СЛЦ, прогрессирование устанавливается при увеличении разницы между вовлеченными и невовлеченными СЛЦ на 100 мг/л. |

Таблица А.1 – Повторяющиеся цитогенетические аберрации у больных ММ согласно ВОЗ 2022.

| **Цитогенетическая аберрация** | **Вовлеченный ген** | **Частота (%)** |
|---|---|---|
| Первичные с вовлечением генов Ig | | |
| t(4;14)(p16;q32) | IGH::*NSD2* | 15 |
| t(11;14)(q13;q32) | IGH:: *CCND1* | 16 |
| t(6;14)(p21;q32) | IGH::*CCND3* | 3 |
| t(12;14)(p13;q32) | IGH::*CCND2* | <1 |
| t(14;16)(q32;q23) | IGH::*MAF* | 5 |
| t(14;20)(q32;q11) | IGH::*MAFB* | 2 |
| t(8;14)(q24;q32) | IGH::*MAFA* | <1 |
| Вторичные | | |
| 1q21 дупликация/амплификация | *CKS1B, ADAR (ADAR1)* | 40 |
| 1p делеция | *CDKN2C* | 20 |
| 17p13 делеция | *TP53* | 10 |
| 13q делеция | *RB1* | 50 |

Таблица А.2 – Характристика ключевых сигнальных путей, регуляция и функционирование которых изменено в опухолевых клетках при ММ.

| **Сигнальный путь** | **Ключевые молекулы** | **Функции** | **Факторы активации** | **Терапевтические мишени** | **Ключевые ссылки (DOI)** |
|---|---|---|---|---|---|
| IL-6 / JAK / STAT3 | IL-6, IL-6R, gp130, JAK1/2, STAT3 | Выживание, антиапоптоз, пролиферация | Высокие уровни IL-6; паракринная активация | JAK-ингибиторы, анти-IL-6, MCL-1 ингибиторы | DOI:10.1038/s41375-023-02032-8 DOI:10.1182/blood.2019000962 |

Продолжение Таблицы А.2

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NF-κB (классический/ альтернативный) | IKK, p65/p50, NIK, RelB | Выживание, воспаление, резистентность | Мутации TRAF3, CYLD, NIK; BAFF, APRIL | Протеасомные ингибиторы; NIK/IKK ингибиторы | DOI:10.1038/s41408-023-00902-0 DOI:10.1182/blood.2020005288 |
| PI3K / AKT / mTOR | PI3K, AKT, mTORC1/2 | Метаболизм, рост, резистентность | IGF-1, IL-6, адгезия к строме | PI3K/AKT ингибиторы, mTOR ингибиторы | DOI:10.1038/s41408-020-00355-8 |
| RAS / RAF / MEK / ERK | KRAS, NRAS, BRAF, MEK, ERK | Пролиферация, стрессоустойчивость | Мутации KRAS/NRAS/BRAF | BRAF & MEK ингибиторы | DOI:10.1182/bloodadvances.2020003431 |
| MCL-1 зависимость | MCL-1, BCL-2, BCL-XL | Антиапоптоз, выживание | Гиперэкспрессия MCL-1 | MCL-1 ингибиторы; венетоклакс | DOI:10.1158/1078-0432.CCR-19-2167 |
| Notch | Notch1–4, Jagged, DLL | Ангиогенез, IL-6 активация | Контакт с BMSC | Ингибиторы γ-секретазы | DOI:10.1182/blood.2019000934 |
| Wnt / β-catenin | Wnt, Frizzled, β-catenin | Плюрипотентность, резистентность | Стромальные сигналы | Wnt ингибиторы | DOI:10.1038/s41408-021-00527-y |
| Hedgehog | SHH, PTCH, SMO, Gli | Поддержание стволовых клеток | Активация стромы | SMO ингибиторы | DOI:10.1182/blood.2019000919 |
| TGF-β | TGF-β1, TGF-βR, SMAD2/3 | Иммуносупрессия | Гиперсекреция стромой | TGF-β ингибиторы | DOI:10.1038/s41375-021-01372-2 |
| CXCR4 / SDF-1 | CXCR4, SDF-1 | Миграция, удержание в костном мозге | Высокая активация оси SDF-1 | Плериксафор; CXCR4 ингибиторы | DOI:10.1182/blood.2020005221 |
| Integrin / FAK | VLA-4, FAK | Адгезионная резистентность | Контакт со стромой | FAK ингибиторы | DOI:10.1038/s41388-019-0908-0 |

# ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.3.1 – Виды мутаций, обнаруженные в генах *NRAS/KRAS* в CD138+ клетках костного мозга у пациентов с ММ.

| номер экзона гена *NRAS/KRAS* | *ген NRAS* | | *ген KRAS* | |
|---|---|---|---|---|
| | вид мутации | число мутаций | вид мутации | число мутаций |
| 2 экзон | Gly12Ala | 1 | Gly12Val | 1 |
| | Gly12Asp | 1 | Gly12Asp | 3 |
| | Gly13Asp | 1 | Gly12Ala | 1 |
| | Gly13Arg | 2 | Gly13Asp | 3 |
| | | | Leu19Phe | 1 |
| 3 экзон | Gln61Leu | 3 | Gln61Arg | 1 |
| | Gln61Lys | 4 | Gln61His | 6 |
| | Gln61His | 4 | Tyr64Asn | 1 |
| | Gln61Arg | 4 | | |
| 4 экзон | нет | нет | Lys104Arg | 1 |
| | | | Ala146Pro | 1 |
| | | | Ala146Val | 1 |

Таблица Б.3.2 – Оценка прогностического значения мутаций в генах *NRAS/KRAS* на основании результатов программы PolyPhen2 с использованием алгоритмов HumDiv и HumVar.

| ген | мутация | прогноз по HumDiv | рейтинг по HumDiv | прогноз по HumVar | рейтинг по HumVar |
|---|---|---|---|---|---|
| *NRAS* | Gly12Ala | Возможно повреждающая | 0,848 | Возможно повреждающая | 0,589 |
| | Gly12Asp | Возможно повреждающая | 0,488 | Неповреждающая | 0,399 |
| | Gly13Asp | Неповреждающая | 0,434 | Неповреждающая | 0,383 |
| | Gly13Arg | Вероятно повреждающая | 0,999 | Вероятно повреждающая | 0,982 |
| | Gln61Leu | Возможно повреждающая | 0,925 | Возможно повреждающая | 0,688 |

Продолжение Таблицы Б.3.2

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *NRAS* | Gln61Lys | Возможно повреждающая | 0,861 | Возможно повреждающая | 0,464 |
| | Gln61His | Неповреждающая | 0,124 | Неповреждающая | 0,141 |
| | Gln61Arg | Неповреждающая | 0,085 | Неповреждающая | 0,106 |
| *KRAS* | Gly12Val | Вероятно повреждающая | 0,999 | Вероятно повреждающая | 0,978 |
| | Gly12Asp | Возможно повреждающая | 0,517 | Неповреждающая | 0,361 |
| | Gly12Ala | Возможно повреждающая | 0,956 | Возможно повреждающая | 0,773 |
| | Gly13Asp | Возможно повреждающая | 0,803 | Возможно повреждающая | 0,506 |
| | Leu19Phe | Вероятно повреждающая | 1 | Вероятно повреждающая | 0,999 |
| | Gln61Arg | Неповреждающая | 0,009 | Неповреждающая | 0,047 |
| | Gln61His | Неповреждающая | 0,033 | Неповреждающая | 0,046 |
| | Tyr64Asn | Вероятно повреждающая | 1 | Вероятно повреждающая | 0,975 |
| | Lys104Arg | Вероятно повреждающая | 0,999 | Вероятно повреждающая | 0,973 |
| | Ala146Pro | Вероятно повреждающая | 1 | Вероятно повреждающая | 1 |
| | Ala146Val | Вероятно повреждающая | 0,998 | Вероятно повреждающая | 0,909 |

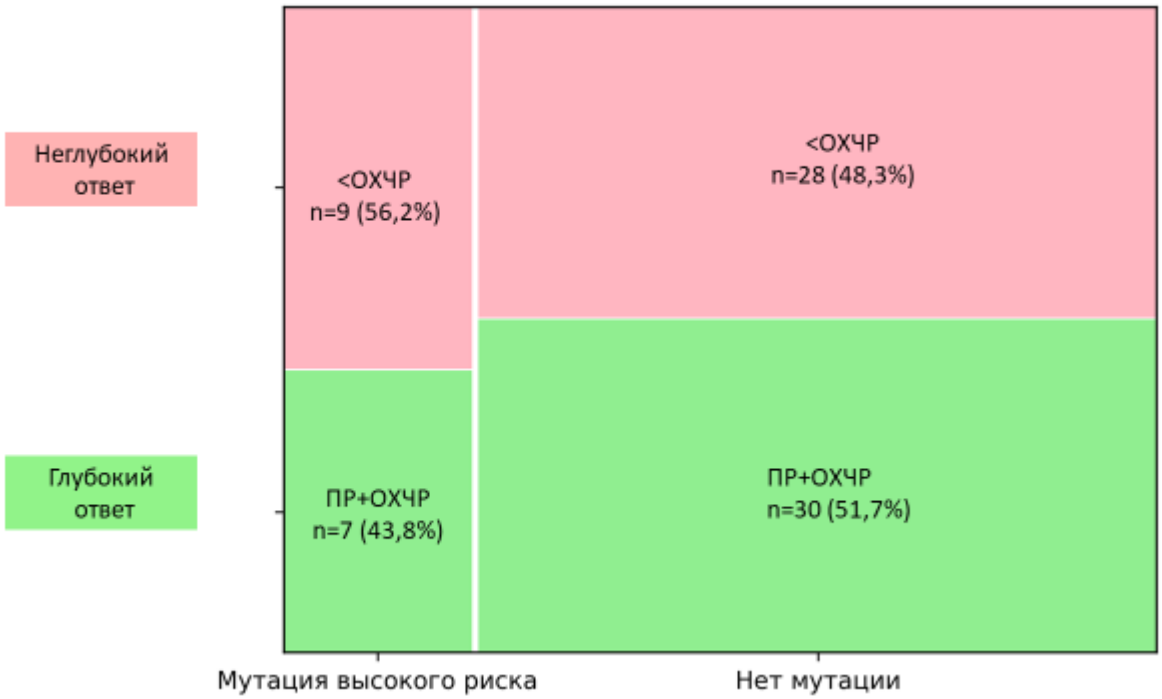



Рисунок Б.3.1 – Частота достижения глубокого противоопухолевого ответа (ПР + ОХЧР) у пациентов после 6 циклов индукционной терапии по трехкомпонентным схемам, включающим бортезомиб, в группах с наличием или отсутствием мутации высокого риска в генах семейства *RAS*. ОХЧР — очень хорошая частичная ремиссия; ПР — полная ремиссия. Зеленый цвет – доля пациентов, достигших ОХЧР+ПР, розовый цвет – доля пациентов, достигших только ответа менее, чем ОХЧР.

Таблица Б.3.3 – Характеристика клинико-лабораторных параметров у пациентов в группах с наличием/отсутствием мутаций из группы высокого риска *in silico.*

| Параметры | Пациенты с мутацией из группы высокого риска | Пациенты без мутации из группы высокого риска | ОШ [95% ДИ] | *p* |
|---|---|---|---|---|
| Наличие костных плазмоцитом | 13/15 (86, 7%) | 42/63 (66, 7%) | 3,25 [0,67-15,75] | 0,13 |
| Наличие экстрамедуллярных плазмоцитом | 0/15(0%) | 3/65 (4,6%) | - | 0,4 |
| Наличие множественных остеодеструкций | 15/15 (100%) | 49/63 (77, 8%) | - | 0,13 |
| | Медиана [МКИ] | | *p* | |
| IgG, МЕ/мл | 276 [64-504] | 237,5 [122-388] | 0,48 | |
| IgA, МЕ/мл | 41 [26-233] | 54,5 [26-233] | 0,81 | |
| IgM, МЕ/мл | 31 [27-35] | 38,5 [33-45] | 0,12 | |
| ПК в костном мозге, % | 32,9,8 [11,6-49] | 22,6 [16,4-29] | 0,78 | |
| М-градиент, г/л | 30,7 [13,5-40,1] | 24 [21,5-37,6] | 0,8 | |
| В2-микроглобулин, мг/л | 4,6 [2,9-11,4] | 5,9 [4,5-8,7] | 0,28 | |
| ЛДГ, Е/л | 345[225,3-414] | 351,5 [322-375] | 0,26 | |
| Альбумин, г/л | 36,8 [29,4-41] | 38,2 [36-39,7] | 0,42 | |
| Креатинин, мкмоль/л | 108 [82-169] | 84 [73-102,3] | 0,23 | |
| Гемоглобин, г/л | 111 [89-126] | 107 [93-118] | 0,42 | |

Таблица Б.3.4 – Процентное содержание ПК в образцах, концентрация выделенной РНК и индекс целостности (RIN) РНК.

| Код пациента | % CD138+ клеток после обогащения на магнитных колонках | QC RNA concentration (ng/ul) | QC RIN |
|---|---|---|---|
| MM104 | N | 1,2 | 3,6 |
| MM107 | N | 13 | 6,3 |
| MM108 | N | 5,8 | 1,5 |
| MM109 | N | 4 | 2,9 |
| MM111 | N | 48 | 2,9 |
| MM115 | N | 10 | 4,3 |

Продолжение Таблицы Б.3.4

| | | | |
|---|---|---|---|
| MM116 | N | 2,4 | 4 |
| MM117 | N | 1,7 | 2,8 |
| MM118 | N | 1,1 | 2,1 |
| MM120 | N | 1,8 | 3,1 |
| MM121 | 26 | 1,5 | 4,7 |
| MM122 | N | 63 | 2,4 |
| MM123 | N | 1,8 | 2,7 |
| MM126 | 98 | 22 | 4,2 |
| MM128 | N | 5 | 4,5 |
| MM129 | N | 76 | 7,4 |
| MM130 | N | 29 | 4,5 |
| MM131 | 99 | 10 | 3,6 |
| MM132 | 94 | 2,5 | 2,8 |
| MM133 | 96,7 | 5,1 | 5,3 |
| MM134 | 93,6 | 80 | 6 |
| MM135 | 94 | 2,6 | 2,9 |
| MM136 | 96 | 4,4 | 3,8 |
| MM137 | 88 | 2,2 | 3,6 |
| MM138 | 96 | 66 | 2,9 |
| MM139 | 76,3 | 1,7 | 3,5 |
| MM140 | 47,3 | 10 | 4,1 |
| MM141 | 84 | 0,8 | 3,2 |
| MM144 | 97 | 1 | 3,2 |
| MM145 | 95 | 1 | 3,2 |
| MM146 | 98 | 1,6 | 4,3 |
| MM147 | 86 | 90 | 5,2 |
| MM148 | 99,7 | 1 | 3,1 |
| MM149 | 95 | 99 | 7 |
| MM150 | 96 | 33 | 3,2 |
| MM151 | 95,6 | 2,6 | 6,2 |
| MM152 | 94 | 2,6 | 6,2 |
| MM153 | 98 | 146 | 8,7 |
| MM154 | 94 | 12 | 4,4 |
| MM155 | 89 | 1,1 | 3,1 |
| MM156 | 99 | 27 | 4,9 |
| MM158 | 94 | 20 | 5,9 |
| MM159 | 93 | 20 | 2 |
| MM160 | 97,5 | 1,3 | 3,3 |
| MM161 | 95,6 | 9 | 5,1 |
| MM162 | 85 | 1 | 3,6 |

Продолжение Таблицы Б.3.4

| | | | |
|---|---|---|---|
| MM163 | 77 | 125 | 4,3 |
| MM165 | 80 | 3 | 3,7 |
| MM166 | 90 | 20 | 7,6 |
| MM167 | 89 | 0,06 | 6,1 |
| MM169 | 97,5 | 1,2 | 3,2 |
| MM170 | 95 | 3,7 | 5,2 |
| MM171 | N | 6,2 | 3,9 |
| MM172 | 93 | 5 | 6,2 |
| MM173 | 96 | 347 | 7,8 |
| MM174 | 77 | 4 | 3,7 |
| MM175 | 95 | 21 | 5,8 |
| MM178 | 81,5 | 60 | 3,6 |
| MM179 | 80 | 41 | 3,6 |
| MM180 | 30 | 36 | 8 |
| MM181 | N | 62 | 7,2 |
| D1 | N | 32 | 5,1 |
| D2 | N | 6 | 5,2 |
| D3 | 95 | 1,8 | 3,9 |
| D4 | 33 | 1,2 | 2,6 |
| D5 | 86 | 70 | 2,5 |
| D6 | 16 | 1 | 3,2 |
| D7 | 85,3 | 12 | 6,1 |
| D8 | 24 | N | 4 |
| D9 | 76,5 | 16 | 4,9 |
| D10 | N | 1 | 3,3 |
| D11 | N | 10 | 3,2 |

Таблица Б.3.5 – Контроль качества образцов полученных РНК-секвенированием.

| **Код образца** | **Число прочтений, млн** | **Выровненные прочтения, %** | **Уникально выровненные прочтения, млн** | **Уровень амплификации** | **Phred Score >30 - 1, <30 -0** | **Качество прочтения образца, >95% -1, <95% -0** | **%GC** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D1 | 34,722 | 97,82 | 12,370 | 1,81 | 1 | 1 | 49 |
| D10 | 26,504 | 0,95 | 0,045 | 51,73 | 1 | 0 | 55 |
| D11 | 33,15 | 87,39 | 10,092 | 12,45 | 1 | 1 | 54 |
| D2 | 39,098 | 82,91 | 12,428 | 3,59 | 1 | 1 | 51 |
| D3 | 40,158 | 17,98 | 3,110 | 9,37 | 1 | 1 | 55 |

Продолжение Таблицы Б.3.5

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D4 | 41,348 | 83,29 | 12,851 | 13,68 | 1 | 1 | 53 |
| D5 | 34,577 | 88,74 | 14,264 | 7,48 | 1 | 1 | 56 |
| D6 | 34,465 | 86,54 | 14,167 | 6 | 1 | 1 | 55 |
| D7 | 43,95 | 86,3 | 15,285 | 4,9 | 1 | 1 | 54 |
| D8 | 32,403 | 80 | 8,857 | 5,22 | 1 | 1 | 54 |
| D9 | 31,944 | 89,84 | 11,222 | 3,85 | 1 | 1 | 53 |
| MM104 | 44,021 | 17,74 | 2,739 | 43,32 | 1 | 0 | 55 |
| MM107 | 47,478 | 95,06 | 16,474 | 2,52 | 1 | 1 | 52 |
| MM108 | 27,659 | 64,83 | 2,766 | 12,17 | 1 | 1 | 65 |
| MM109 | 32,745 | 77,82 | 8,083 | 4 | 1 | 1 | 53 |
| MM111 | 34,431 | 54,33 | 8,281 | 4,71 | 1 | 1 | 55 |
| MM115 | 40,559 | 96,24 | 10,436 | 2,03 | 1 | 1 | 51 |
| MM116 | 31,504 | 69,48 | 9,383 | 15,23 | 1 | 1 | 56 |
| MM117 | 39,231 | 38,44 | 5,797 | 10,69 | 1 | 1 | 53 |
| MM118 | 22,964 | 0,7 | 0,015 | 52,97 | 1 | 1 | 55 |
| MM119 | 25,833 | N | 0,800 | N | 1 | 1 | 54 |
| MM120 | 29,819 | 9,09 | 1,004 | 21,3 | 1 | 1 | 55 |
| MM121 | 43,087 | 59,8 | 10,029 | 17,52 | 1 | 1 | 54 |
| MM122 | 39,921 | 84,9 | 13,436 | 4,14 | 1 | 1 | 56 |
| MM123 | 35,053 | 15,51 | 1,747 | 42,48 | 1 | 0 | 55 |
| MM126 | 38,75 | 69,9 | 8,614 | 2,45 | 1 | 1 | 50 |
| MM128 | 41,443 | 28,49 | 4,241 | 5,17 | 1 | 1 | 53 |
| MM129 | 41,034 | 87,63 | 12,476 | 2,35 | 1 | 1 | 51 |
| MM130 | 35,332 | 62,48 | 8,601 | 3,33 | 1 | 1 | 53 |
| MM131 | 31,556 | 89,81 | 11,044 | 3,01 | 1 | 1 | 52 |
| MM132 | 36,432 | 73,95 | 5,924 | 17,65 | 1 | 1 | 59 |
| MM133 | 35,17 | 92,07 | 15,885 | 5,51 | 1 | 1 | 56 |
| MM134 | 38,343 | 98,24 | 11,168 | 1,87 | 1 | 1 | 47 |
| MM135 | 30,987 | 83,87 | 10,846 | 10,46 | 1 | 1 | 54 |
| MM136 | 37,032 | 93,53 | 12,810 | 3,73 | 1 | 1 | 52 |
| MM137 | 35,348 | 92,98 | 13,290 | 9,76 | 1 | 1 | 53 |
| MM138 | 35,016 | 95,72 | 11,057 | 2,21 | 1 | 1 | 53 |
| MM139 | 41,828 | 78,62 | 11,724 | 14,66 | 1 | 1 | 54 |
| MM140 | 34,192 | 89,63 | 10,927 | 5,67 | 1 | 1 | 53 |
| MM141 | 21,768 | 21,97 | 1,198 | 42,82 | 1 | 1 | 55 |
| MM144 | 26,895 | 78,61 | 6,026 | 9,98 | 1 | 1 | 50 |
| MM145 | 18,993 | 96,4 | 4,644 | 2,17 | 1 | 1 | 46 |
| MM146 | 34,647 | 95,87 | 11,327 | 2,07 | 1 | 1 | 49 |
| MM147 | 24,675 | 89,1 | 6,750 | 8,86 | 1 | 1 | 55 |
| MM148 | 36,767 | 96,2 | 13,592 | 2,31 | 1 | 1 | 50 |

Продолжение Таблицы Б.3.5

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MM150 | 38,971 | 95,39 | 13,626 | 2,36 | 1 | 1 | 50 |
| MM151 | 37,081 | N | 16,260 | N | 1 | 1 | 49 |
| MM152 | 37,379 | 95,44 | 11,480 | 2,37 | 1 | 1 | 49 |
| MM153 | 37,466 | 98,29 | 10,857 | 1,8 | N | N | 47 |
| MM154 | 43,177 | 74,4 | 14,653 | 2,15 | 1 | 1 | 49 |
| MM155 | 30,122 | 38,03 | 6,253 | 8,76 | N | N | 48 |
| MM156 | 38,334 | 97,03 | 10,777 | 1,74 | 1 | 1 | 47 |
| MM158 | 35,081 | 92,91 | 9,662 | 2,33 | 1 | 1 | 49 |
| MM159 | 34,282 | 95,58 | 6,392 | 5,29 | 1 | 1 | 66 |
| MM160 | 35,185 | 86,1 | 5,944 | 9,48 | 1 | 1 | 61 |
| MM161 | 34,541 | 95,46 | 10,447 | 4,11 | N | N | 52 |
| MM162 | 28,401 | 57,98 | 6,373 | 19,31 | 1 | 0 | 54 |
| MM163 | 33,148 | 95,43 | 9,513 | 2,56 | 1 | 1 | 55 |
| MM165 | 30,663 | 90,5 | 9,165 | 8,87 | 1 | 1 | 56 |
| MM166 | 37,022 | 96,08 | 13,188 | 3,19 | 1 | 1 | 53 |
| MM167 | 40,967 | 96,92 | 10,855 | 1,85 | 1 | 1 | 50 |
| MM169 | 38,608 | 76,27 | 8,774 | 11,67 | 1 | 0 | 56 |
| MM170 | 32,736 | 91,6 | 12,407 | 5,37 | 1 | 1 | 53 |
| MM171 | 25,658 | 13,18 | 0,840 | 45,92 | 1 | 1 | 54 |
| MM172 | 34,863 | 95,45 | 11,902 | 3,29 | 1 | 1 | 53 |
| MM173 | 36,591 | 97,34 | 13,899 | 2,11 | 1 | 1 | 48 |
| MM174 | 30,577 | 83,49 | 8,858 | 11,22 | 1 | 1 | 55 |
| MM175 | 43,667 | 96,72 | 16,350 | 2,56 | 1 | 1 | 51 |
| MM178 | 33,63 | 70,68 | 8,876 | 30,22 | N | N | 57 |
| MM179 | 30,877 | 47,47 | 6,106 | 25,09 | 1 | 1 | 55 |
| MM180 | 37,861 | 98,54 | 16,149 | 2,25 | 1 | 1 | 52 |
| MM181 | 36,351 | 97,18 | 12,389 | 1,94 | 1 | 1 | 48 |

Таблица Б.3.6 – Характеристики контроля качества РНК-секвенирования для образцов пациентов (ММ) и доноров (D). Желтым цветом выделены те образцы, которые были исключены и анализа.

| Образцы | Низкий процент CD138+ в образце | RIN меньше 2 | Меньше 20 млн | Меньше 2,5 млн уникальных прочтений | Невысокое качество определения оснований | GC | Экспрессия иммуно глобулинов |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D1 | | | | | | | |
| D10 | | X | | X | | | |
| D11 | | | | | | | |
| D2 | | | | | | | |
| D3 | | | | | | | |
| D4 | X | | | | | | |
| D5 | | | | | | | |
| D6 | X | | | | | | |
| D7 | | | | | | | |
| D8 | X | | | | | | |
| D9 | | | | | | | |
| MM104/2 | | | | | X | | |
| MM107 | | | | | | | |
| MM108 | | X | | | | X | |
| MM109 | | | | | | | |
| MM111 | | | | | | | |
| MM115 | | | | | | | |
| MM116 | | | | | | | |
| MM117 | | | | | | | |
| MM118 | | | | X | | | |
| MM119 | | | | X | | | |
| MM120 | | | | X | | | |
| MM121 | X | | | | | | X |
| MM122 | | | | | | | |
| MM123 | | | | X | X | | |
| MM126 | | | | | | | |
| MM128 | | | | | | | |
| MM129 | | | | | | | |
| MM130 | | | | | | | |
| MM131 | | | | | | | |
| MM132 | | | | | | | |
| MM133 | | | | | | | X |
| MM134 | | | | | | | |
| MM135 | | | | | | | |
| MM136 | | | | | | | |
| MM137 | | | | | | | |
| MM138 | | | | | | | |

Продолжение Таблицы Б.3.6

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MM139 | | | | | | | |
| MM140 | X | | | | | | |
| MM141 | | | | X | | | |
| MM144 | | | | | | | |
| MM145 | | | X | | | | |
| MM146 | | | | | | | |
| MM147 | | | | | | | |
| MM148 | | | | | | | |
| MM150 | | | | | | | |
| MM151 | | | | | | | |
| MM152 | | | | | | | |
| MM153 | | | | | | | |
| MM154 | | | | | | | |
| MM155 | | | | | | | |
| MM156 | | | | | | | |
| MM158 | | | | | | | |
| MM159 | | X | | | | X | |
| MM160 | | | | | | | |
| MM161 | | | | | | | |
| MM162 | | | | | | | |
| MM163 | | | | | | | |
| MM165 | | | | | | | |
| MM166 | | | | | | | |
| MM167 | | | | | | | |
| MM169 | | | | | X | | |
| MM170 | | | | | | | |
| MM171 | | | | X | | | |
| MM172 | | | | | | | |
| MM173 | | | | | | | |
| MM174 | | | | | | | |
| MM175 | | | | | | | |
| MM178 | | | | | | | |
| MM179 | | | | | | | |
| MM180 | X | | | | | | |
| MM181 | | | | | | | |

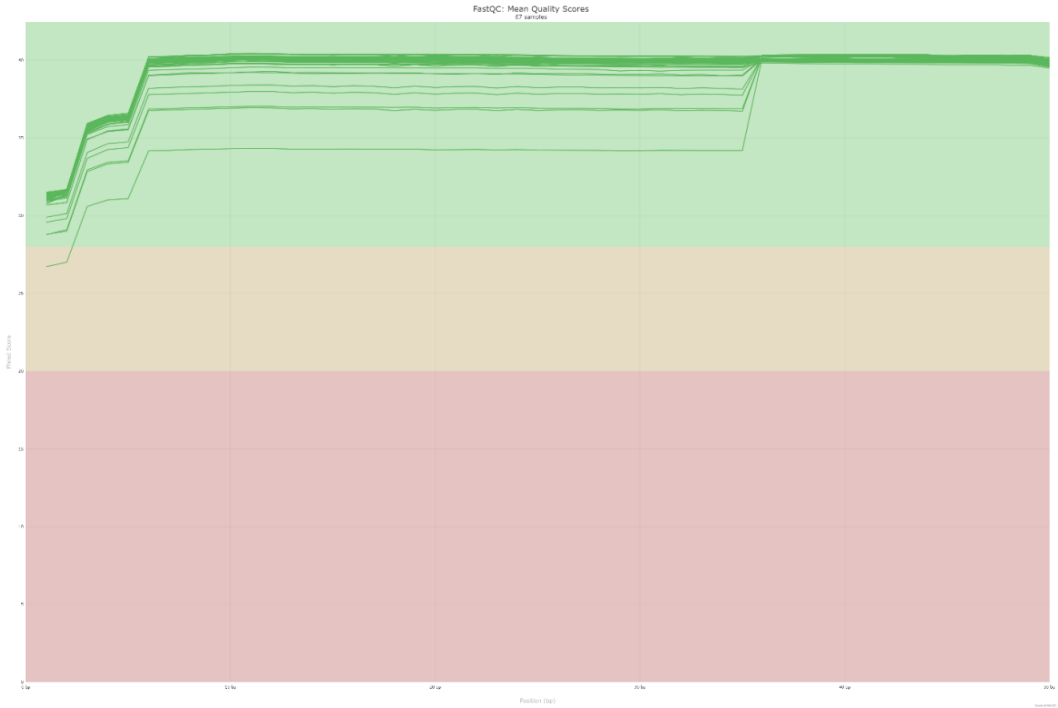



Рисунок Б.3.2 – Гистограммы, отражающие надежность определения оснований. Среднее по качеству прочтений в образце. Зеленая область: Phred Score более 30.




Рисунок Б.3.3 – Количество неопределенных оснований в прочтении в %. В зеленой области расположены образцы с высоким процентом однозначно определённых оснований. Образцы, отмеченные стрелками (D10, MM104, MM123, MM162, MM169), имеют низкое качество прочтения.

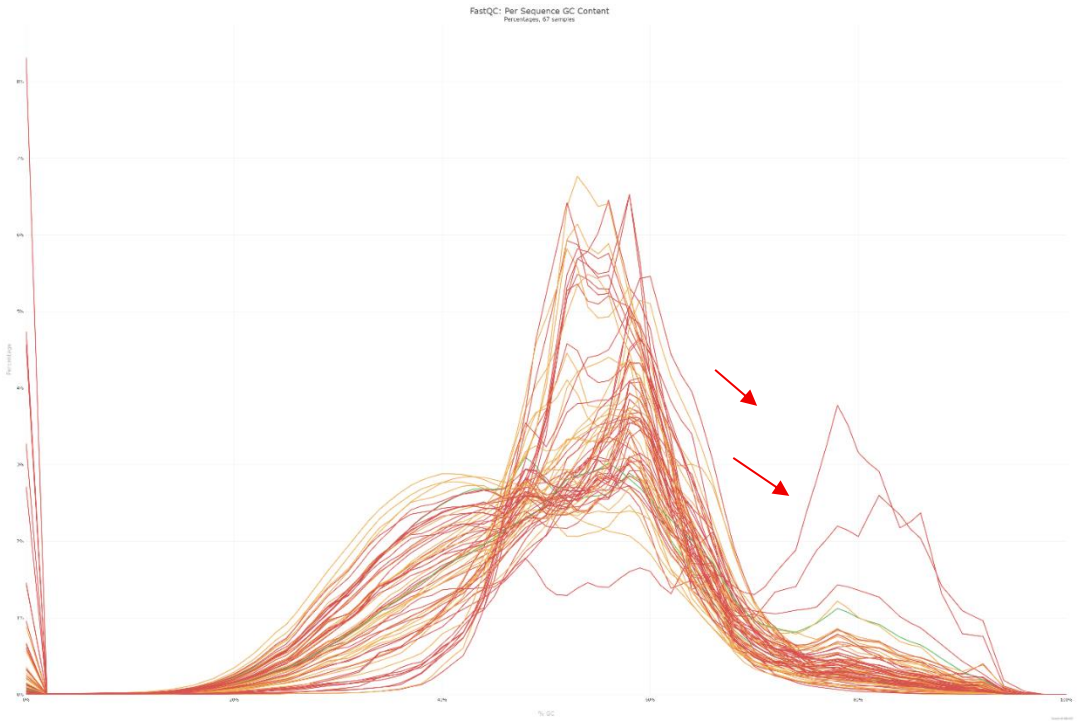



Рисунок Б.3.4 – Распределение GC нуклеотидов в прочтениях. Каждая линия – образец. Распределение соответствует ожидаемому. Два образца, ММ108 и ММ159 имеют дополнительные пики (отмечены красными стрелками).

Таблица Б.3.7 – Уровень экспрессии генов протеинкиназного каскада, измеренный методами ПЦР-РВ и РНК-секвенированием.

| ПЦР-РВ | | | | РНК-секвенирование | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Доноры | Пациенты | | | Доноры | Пациенты | |
| Гены | Медиана [МКИ], ОУЭ | | *p* | Гены | Медиана [МКИ], ОУЭ | | *p* |
| *BRAF* | 4,3 [2,3-6,9] | 6,1 [2,2-13,9] | 0,5 | *BRAF* | 1,2 [0,7-1,35] | 3,9 [2,9-4,9] | 0,0014 |
| *MEK1* | 3,1 [1,6-7,1] | 12,8 [7,5-19,1] | 0,02 | *MEK1* | 0,6 [0,5-0,9] | 1,8 [1,5-2,4] | 0,0009 |
| *MEK2* | 3,9 [1,8-28,5] | 9,4 [5,7-15,1] | 0,39 | *MEK2* | 1,1 [0,8-1,9] | 4,4 [4,0-5,2] | 0,0003 |
| *ERK1* | 4,3 [1-25,9] | 1 [0,6-1,3] | 0,08 | *ERK1* | 1,9 [1,1-2,4] | 1,8 [1,1-2,4] | 0,95 |
| *ERK2* | 3,4 [2,6-5,0] | 2,8 [0,8-5,4] | 0,62 | *ERK2* | 0,5 [0,4-0,6] | 0,8 [0,6-1,2] | 0,03 |

Таблица Б. 3.8 – Сопоставление данных экспрессии генов *HMBS*, *hprt1*, *gpdh*, *rpl13a* и среднего геометрического из 4 референсных генов. Результаты ПЦР-РВ.

| Образцы | *HMBS* | *hprt1* | *gpdh* | *rpl13a* | Среднее геометрическое для генов *HMBS*, *hprt1*, *gpdh*, *rpl13a* | *HMBS*-среднее геометричекое |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ct, среднее по трем повторностям | | | | | |
| ММ116 | 31,97 | 33,60 | 25,53 | 27,22 | 29,40 | 2,57 |
| ММ111 | 27,37 | 27,70 | 21,57 | 24,81 | 25,24 | 2,13 |

Продолжение Таблицы Б. 3.8

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MM155 | 33,94 | 34,60 | 29,34 | 30,75 | 32,08 | 1,86 |
| MM151 | 33,65 | 32,31 | 26,70 | 28,76 | 30,23 | 3,42 |
| MM145 | 37,08 | 36,22 | 30,89 | 34,25 | 34,53 | 2,56 |
| MM159 | 31,02 | 33,69 | 27,40 | 29,69 | 30,37 | 0,66 |
| MM152 | 28,56 | 27,64 | 21,17 | 25,54 | 25,56 | 3,00 |
| MM154 | 34,95 | 34,71 | 26,84 | 30,29 | 27,24 | 7,71 |
| MM117 | 31,98 | 33,40 | 27,26 | 30,71 | 30,75 | 1,23 |
| D8 | 36,59 | 37,83 | 31,96 | 35,54 | 35,41 | 1,18 |

Таблица Б.3.9 – Эффекторные гены-мишени каскада RAS/ERK. Представлены результаты статистического анализа двух групп: пациентов с мутациями и пациентов без мутаций в генах *NRAS/KRAS*. Значения экспрессии, выраженные в прочтениях генов, представлены в логарифмированном виде. Красным отмечены гены, у которых уровень экспрессии статистически значимо отличается в группе пациентов с мутациями от группы без мутаций.

| Гены | Группа пациентов без мутаций, среднее | Группа пациентов с мутациями, среднее | Уровень значимости, *p* | Группа пациентов без мутаций, станд. откл. | Группа пациентов с мутациями, станд. откл. |
|---|---|---|---|---|---|
| *c-JUN* | 9,08 | 9,24 | 0,65 | 1,07 | 1,00 |
| *JUNB* | 8,29 | 8,12 | 0,68 | 1,24 | 1,17 |
| *JUND* | 8,29 | 8,52 | 0,39 | 0,83 | 0,73 |
| *c-FOS* | 8,90 | 9,27 | 0,16 | 0,82 | 0,74 |
| *FOSB* | 9,69 | 9,85 | 0,53 | 0,83 | 0,70 |
| *Fra-1* | 2,61 | 2,69 | 0,86 | 1,19 | 1,28 |
| *Fra-2* | 5,96 | 5,61 | 0,35 | 1,34 | 0,88 |
| *CREB* | 6,17 | 6,02 | 0,38 | 0,27 | 0,66 |
| *CREM* | **4,52** | **4,78** | **0,03** | **0,39** | **0,29** |
| *ATF-1* | 4,80 | 4,76 | 0,85 | 0,55 | 0,46 |
| *CREB-2 (ATF-4)* | 8,47 | 8,37 | 0,50 | 0,38 | 0,49 |
| *CREB-3* | 6,04 | 6,13 | 0,47 | 0,38 | 0,34 |
| *CREB-5* | 3,65 | 4,35 | 0,25 | 1,98 | 1,55 |
| *ATF-2 (CRE-BP1)* | 6,10 | 6,23 | 0,14 | 0,27 | 0,26 |
| *ATF-3* | 5,89 | 6,09 | 0,61 | 1,21 | 1,09 |
| *ATF-5 (ATFX)* | 6,22 | 6,23 | 0,99 | 1,39 | 1,31 |
| *ATF-6* | 7,10 | 7,03 | 0,69 | 0,57 | 0,41 |
| *ATF-7* | 5,72 | 6,04 | 0,09 | 0,56 | 0,53 |
| *B-ATF* | 1,26 | 1,24 | 0,97 | 1,82 | 1,77 |

Продолжение Таблицы Б.3.9

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *MAF* | 4,46 | 4,18 | 0,71 | 2,30 | 2,22 |
| *MAFA* | 0,71 | 1,39 | 0,10 | 0,82 | 1,45 |
| *MAFB* | 3,99 | 3,78 | 0,75 | 2,24 | 1,52 |
| *NRL* | **2,38** | **3,13** | **0,03** | **1,19** | **0,78** |
| *CCND1* | 5,39 | 7,44 | 0,06 | 3,25 | 3,13 |
| *VEGF* | 6,69 | 6,50 | 0,33 | 0,54 | 0,56 |
| *EGFR* | 0,32 | 0,43 | 0,73 | 0,84 | 1,03 |
| *FGFR1* | 4,38 | 4,34 | 0,84 | 0,73 | 0,61 |
| *BCL2* | 7,85 | 7,69 | 0,34 | 0,55 | 0,46 |
| *BCL2L1* | 6,73 | 6,63 | 0,59 | 0,39 | 0,65 |
| *BCL2L2* | 5,40 | 5,52 | 0,48 | 0,42 | 0,60 |
| *MCL1* | 9,73 | 9,49 | 0,15 | 0,43 | 0,55 |
| *BAX* | 5,39 | 5,60 | 0,20 | 0,52 | 0,44 |
| *BCL2A1* | 3,56 | 3,08 | 0,40 | 1,67 | 1,68 |
| *BAK1* | 5,71 | 5,68 | 0,82 | 0,50 | 0,47 |
| *BOK* | 0,15 | 0,53 | 0,19 | 0,64 | 1,01 |
| *BCL2L10* | 0,77 | 0,69 | 0,80 | 0,95 | 0,87 |
| *BCL2L12* | 4,34 | 4,68 | 0,30 | 1,29 | 0,55 |
| *BCL2L13* | 5,86 | 5,82 | 0,71 | 0,28 | 0,38 |
| *BCL2L14* | 3,88 | 3,58 | 0,23 | 0,67 | 0,78 |
| *BCL2L15* | 4,97 | 5,05 | 0,79 | 0,71 | 0,95 |
| *BNIP2* | 6,53 | 6,35 | 0,18 | 0,36 | 0,42 |
| *BCLXL* | 6,73 | 6,63 | 0,59 | 0,39 | 0,65 |
| *BIRC5* | 4,52 | 4,61 | 0,62 | 0,46 | 0,51 |
| *IL-6* | **0,93** | **2,40** | **0,02** | **1,42** | **2,17** |
| *IL6R* | 7,46 | 7,11 | 0,35 | 1,10 | 1,14 |
| *TNF-alpha* | 2,32 | 2,37 | 0,95 | 2,33 | 2,26 |
| *MMP2* | 0,85 | 1,26 | 0,34 | 1,26 | 1,28 |
| *MMP8* | 4,03 | 3,73 | 0,64 | 1,29 | 2,30 |
| *MMP9* | 4,29 | 4,55 | 0,69 | 1,66 | 2,06 |
| *MMP11* | 4,06 | 3,98 | 0,71 | 0,40 | 0,78 |
| *MMP13* | 0,80 | 0,91 | 0,70 | 0,63 | 0,95 |
| *MMP14* | **2,39** | **3,29** | **0,04** | **1,54** | **0,92** |
| *MMP15* | 1,20 | 1,18 | 0,97 | 1,63 | 1,54 |
| *MMP16* | 2,46 | 2,22 | 0,76 | 2,42 | 2,28 |
| *MMP17* | 0,96 | 1,34 | 0,48 | 1,30 | 1,85 |
| *MMP19* | 2,56 | 2,34 | 0,70 | 1,76 | 1,64 |
| *MMP21* | 1,66 | 2,03 | 0,27 | 0,99 | 0,98 |
| *MMP23B* | 1,71 | 2,22 | 0,22 | 0,92 | 1,40 |

Продолжение Таблицы Б.3.9

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *MMP25* | 2,99 | 3,21 | 0,73 | 1,79 | 1,91 |
| *C-MYC* | 7,16 | 6,37 | 0,06 | 1,29 | 1,18 |
| *p21* | 7,31 | 7,55 | 0,38 | 0,73 | 0,86 |
| *p27* | 6,80 | 6,93 | 0,46 | 0,46 | 0,55 |
| *MEF2A* | 6,75 | 6,66 | 0,37 | 0,31 | 0,25 |
| *MEF2B* | **4,99** | **6,08** | **0,00** | **0,96** | **1,03** |
| *MEF2C* | 8,02 | 7,92 | 0,65 | 0,73 | 0,47 |
| *MEF2D* | 7,65 | 7,86 | 0,08 | 0,33 | 0,38 |

Таблица Б.3.10 – Результаты ROC- анализа для оценки предиктивной способности экспрессий генов *IL-6, CREM, NRL, MMP14, MEF2B* на глубину ответ на терапию.

| Ген | AUC |
|---|---|
| *CREM* | 0,618 |
| *NRL* | 0,287 |
| *IL6* | 0,499 |
| *MMP14* | 0,394 |
| *MEF2B* | 0,449 |

Таблица Б.3.11 – Логарифмированное значение экспрессии *IL-6, CREM, NRL, MMP14, MEF2B* у доноров.

| | Гены, уровень экспрессии | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Образцы | *CREM* | *NRL* | *IL-6* | *MMP14* | *MEF2B* |
| D1 | 1,91 | *1,00* | *1,13* | *1,46* | *1,75* |
| D11 | 1,73 | *0,40* | *0,91* | *1,79* | *1,93* |
| D2 | 1,93 | *1,05* | *1,16* | *0,54* | *1,84* |
| D3 | 2,09 | *1,52* | *1,11* | *1,94* | *2,38* |
| D5 | 2,14 | *1,32* | *0,63* | *2,11* | *2,19* |
| D7 | 1,83 | *1,39* | *1,22* | *1,90* | *2,33* |
| D9 | 1,99 | *1,17* | *0,85* | *1,74* | *2,09* |
| Верхняя граница уровня экспрессии | 2,14 | 1,52 | 1,22 | 2,11 | 2,38 |

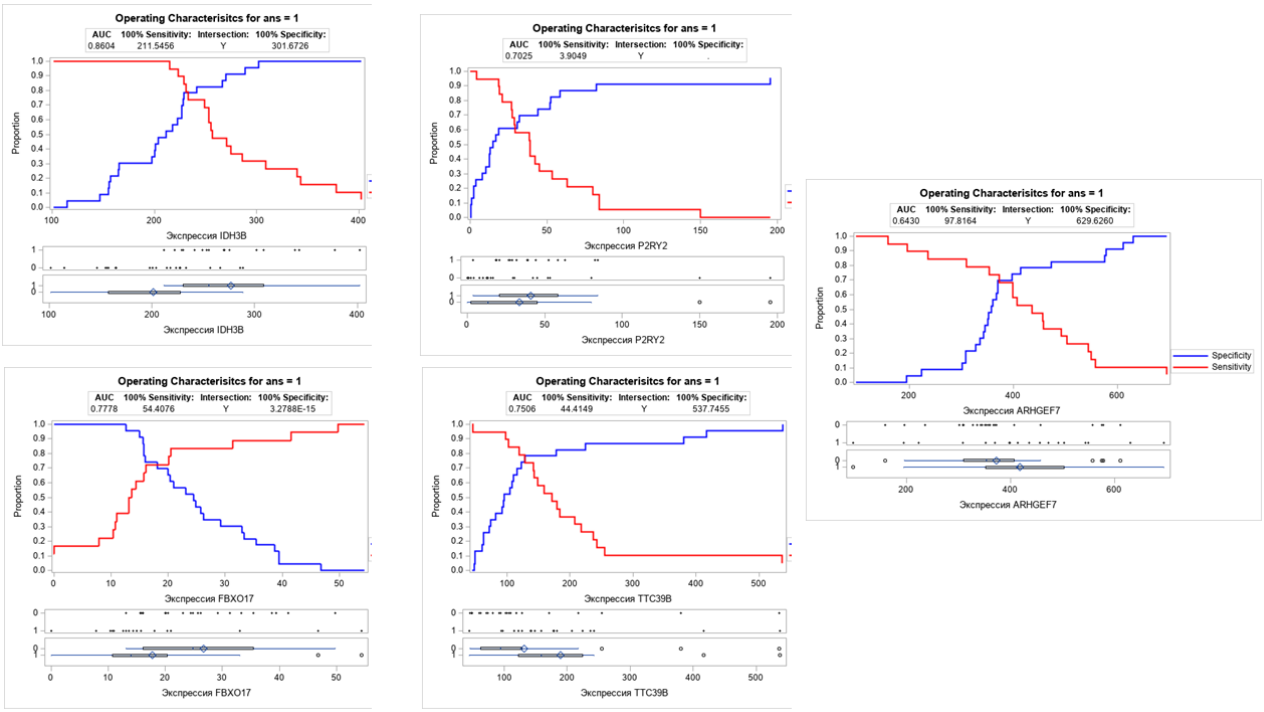



Рисунок Б.3.5 – Чувствительность и специфичность определения уровня экспрессии генов *IDH3B, P2RY2, FBXO17, TTC39B и ARHGEF7* для прогноза ответа на индукционную терапию.

Таблица Б.3.12 – Список генов, вошедших в экспрессионные сигнатуры.

| Данное исследование | **IFM15** | **UAMS70** | **UAMS80** | **EMC92** | **Mitra42** |
|---|---|---|---|---|---|
| *IDH3B* | *TSPAN7* | *AHCYL1* | *COX6C* | *AURKA* | *ABCF2* |
| *P2RY2* | *DUSP4* | *AIM2* | *NOLA1* | *AURKB* | *ACTG1* |
| *FBX017* | *ADM* | *ANXA2* | *COPS5* | *BIRC5* | *ANP32E* |
| *TTC39B* | *GADD45A* | *ASPM* | *SOD1* | *BUB1* | *ARF1* |
| *ARHGEF7* | *PRDM5* | *BIRC5* | *TUBA6* | *CCNB1* | *ATP6V0B* |
| *MDN1* | *IFI6* | *BUB1* | *HNRPC* | *CDC20* | *B2M* |
| *PKN2* | *NDNF* | *C1QA* | *PSMB2* | *CDCA3* | *CCT2* |
| *ZNF106* | *PRR15* | *C1QB* | *PSMC4* | *CDCA5* | *CCT3* |
| *BCL7B* | *BTBD3* | *CCNB1* | *LOC400657* | *CDCA8* | *CCT5* |
| *UTP18* | *TGFBI* | *CDCA1* | *C1orf31* | *CEP55* | *CD74* |
| *QRSL1* | *IFITM1* | *CDCA3* | *FUNDC1* | *CKS1B* | *COPS5* |
| *TBX21* | *PURPL* | *CDCA8* | *SUMO1* | *DEPDC1* | *EEF1A1* |
| *MTHFR* | *MT1F* | *CDK1* | *PSMB4* | *DLGAP5* | *EEF1G* |
| *MORN1* | *LINC01239* | *CKS1B* | *PSMB3* | *ESPL1* | *EIF3E* |
| *ADGRG6* | *LINC01480* | *CTBS* | *ENSA* | *FAM64A* | *EIF3F* |
| *DCLK1* | | *DLGAP5* | *PSMB4* | *FOXM1* | *EIF3H* |
| *MOB1B* | | *ECT2* | *COMMD8* | *GTSE1* | *EIF3L* |

Продолжение Таблицы Б.3.12

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *DENND2D* | | *FAM72A* | *MRPL47* | *HJURP* | *EIF4G1* |
| *DLD* | | *HJURP* | *PSMC5* | *KIF11* | *GNB2L1 (RACK1)* |
| *C4orf50* | | *KIF11* | *HNRPC* | *KIF14* | *HNRNPA1* |
| | | *KIF14* | *PSMA4* | *KIF18B* | *HNRNPK* |
| | | *KIF20A* | *PSMD4* | *KIF20A* | *HSP90AB1* |
| | | *KIF23* | *NMT1* | *KIF23* | *HSPA8* |
| | | *KNTC1* | *PSMB7* | *KIF4A* | *LDHB* |
| | | *LARS2* | *NXT2* | *KNTC1* | *NME1* |
| | | *LTBP1* | *SLC25A14* | *MELK* | *NPM1* |
| | | *MAD2L1* | *PSMD4* | *MCM2* | *PSMA1* |
| | | *MELK* | *PSMD2* | *MCM4* | *PSMA2* |
| | | *MPHOSPH1* | *SNRPD1* | *MCM6* | *PSMA4* |
| | | *NADK* | *PSMD4* | *NDC80* | *PSMA5* |
| | | *NEK2* | *CHORDC1* | *NEK2* | *PSMA7* |
| | | *NUF2* | *PSMD14* | *NUF2* | *PSMB2* |
| | | *PBK* | *LAP3* | *PBK* | *PSMB3* |
| | | *PRC1* | *PSMA7* | *PLK1* | *PSMB4* |
| | | *PTTG1* | *UBPH* | *PRC1* | *PSMB6* |
| | | *RRM2* | *BIRC5* | *PTTG1* | *PSMC2* |
| | | *SLC19A1* | *STAU2* | *RAD51* | *PSMC6* |
| | | *STMN1* | *ALDOA* | *RFC4* | *PSMD1* |
| | | *TBRG4* | *TMC8* | *RRM2* | *PSMD2* |
| | | *TMPO* | *C1orf128* | *SKA1* | *PSMD7* |
| | | *TOP2A* | *FLNA* | *SPC25* | *PSMD11* |
| | | *TPX2* | *HIST1H3B* | *STMN1* | *RPLP0* |
| | | *TYMS* | *FOSB* | *TOP2A* | |
| | | *UBE2C* | *LOC644250* | *TPX2* | |
| | | *YWHAZ* | *C17orf60* | *TTK* | |
| | | *ZWINT* | *LZTR2* | *UBE2C* | |
| | | *CKS2* | *PDE4B* | *UHRF1* | |
| | | *CENPF* | *STAU2* | *ZWINT* | |
| | | *CEP55* | *PDE4B* | | |
| | | *DEPDC1* | *GABARAPL1* | | |
| | | *FANCI* | *TAGAP* | | |
| | | *FOXM1* | *LOC643318* | | |
| | | *KIAA0101* | *CISH* | | |
| | | *KIF2C* | *NR4A1* | | |
| | | *MCM2* | *MGC61598* | | |
| | | *MCM4* | *ANKRD37* | | |
| | | *NDC80* | *KIAA1394* | | |

Продолжение Таблицы Б.3.12

| **UAMS70** | **UAMS80** |
|---|---|
| *NUSAP1* | *ACVR1C* |
| *PLK1* | *TBC1D9* |
| *RAD51* | *CRYGS* |
| *RFC4* | *PDE4B* |
| *SKA1* | *CISH* |
| *SPC25* | *ZNF710* |
| *TTK* | *RBM33* |
| *UHRF1* | *STX11* |
| *XRCC2* | *KIAA1754* |
| *ZWILCH* | *CISH* |
| *CENPA* | *RPL41* |
| *CENPE* | *WIRE* |
| | *LAPTM4A* |
| | *KLHL7* |
| | *C9orf130* |
| | *C14orf100* |