На правах рукописи

Сергеева Анна Михайловна

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Менделеева Лариса Павловна**

кандидат медицинских наук **Сидорова Юлия Владимировна**

Официальные оппоненты:

Семочкин Сергей Вячеславович — доктор медицинских наук, заведующий группой высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга отдела лекарственного лечения опухолей Московского научно-исследовательского онкологического института имени П. А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Друй Александр Евгеньевич — доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией молекулярной онкологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России), г.Санкт-Петербург

Защита состоится « » _____ 2026 года в 13 часов 00 минут
на заседании диссертационного совета 21.1.023.02 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России и на сайте www.blood.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук **Сысоева Елена Павловна**

Актуальность темы исследования

Множественная миелома (ММ) представляет собой биологически гетерогенную плазмоклеточную неоплазию с вариабельным клиническим течением (Kumar et al., 2020, Maura et al., 2024). Несмотря на внедрение современных схем лечения (бортезомиб-содержащая индукция, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, применение моноклональных антител и др.) и совершенствование систем стратификации риска, у пациентов с одинаковой стадией заболевания могут наблюдаться существенные различия в скорости прогрессирования ММ и глубине ответа на терапию (L'Agostino et al., 2022; Vooheers et al., 2020). Это свидетельствует о недостаточной точности существующих прогностических моделей и необходимости поиска новых биомаркеров, позволяющих достоверно оценивать риск неблагоприятного течения заболевания и глубину ответа на проводимую терапию. Актуальный вопрос выбора оптимальной терапии может быть решен с помощью использования новых молекулярно-генетических маркеров, в дополнение к существующей стратификации риска.

Точечные мутации в генах *NRAS/KRAS* являются самыми распространенными при ММ (Walker et al., 2018; Bolli et al., 2014). Исследования на модельных организмах показали, что мутации в генах *NRAS/KRAS* повышают пролиферативную активность и устойчивость клеток к апоптозу (Rowley et al., 2002, Wen et al., 2021). Несмотря на это, мутации в генах *NRAS/KRAS* не включены в стандартные шкалы риска при ММ, что возможно, связано с неоднозначностью прогностического значения выявления этих мутаций у пациентов с ММ (Maura et al., 2024; Sudha et al., 2022, Perroud et al., 2023; Gabauer et al., 2016; Lagana et al., 2028). Опухолевые клетки у пациентов с ММ наряду с высокой мутационной нагрузкой характеризуются высокоспецифичным профилем экспрессии генов (Adebayo et al., 2022). Анализ профилей экспрессии генов позволил разработать экспрессионные генные панели, ассоциированные с биологическими особенностями опухоли и ответом на терапию (Zhan et al., 2007; Shaunessy et al., 2007; Mitra et al., 2017; Adebayo et al., 2022). Однако, в связи со сложностью проведения анализа и дороговизной, экспрессионные генные панели в настоящее время не используются в рутинной практике. В условиях ограниченного практического применения существующих экспрессионных панелей поиск компактных и клинически применимых молекулярных сигнатур является важной практической задачей.

Таким образом, перспективным направлением является исследование клинического значения соматических мутаций и анализ транскриптомных особенностей опухолевых плазматических клеток (ПК), 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.

Степень разработанности темы исследования

Мутации в генах семейства *RAS* (*NRAS* и *KRAS)* ранее рассматривались как кандидаты на роль факторов неблагоприятного прогноза (Neri et al., 1988; Chng et al., 2008; Perroud et l., 2023). Мутации в генах *NRAS/KRAS* однозначно приводили к худшему исходу заболевания, если применялись режимы терапии, не содержащие бортезомиб (Chng et al., 2008). 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 с ММ (Нарейко, 2017). Современные исследования доказывают негативный эффект этих мутаций при схемах лечения, включающих ингибитор протеасомы - бортезомиб (Mulligan et al., 2014; Perroud et al., 2023). В то же время, появление ингибиторов 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* (Walker et al., 2014; Walker et al., 2015; Walker et al., 2018; Maura et al., 2024).

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 (Li et al., 2019). В результате фосфорилированный ERK активирует ряд транскрипционных факторов, приводя к усилению экспрессии генов клеточного цикла и повышению пролиферации ПК (Yoshizawa and Sako, 2025). Экспериментальные модели ММ показали, что белки NRAS/KRAS образовавшиеся в результате мутации соответствующих генов одновременно активируют PI3K/AKT путь, что приводит к подавлению апоптоза и выживанию клеток, повышению метаболической активности клеток (Hoang et al., 2006). Белок RAS с аминокислотной заменой при ММ способен активировать NF-kB путь (Tago et al., 2019). Было показано, что мутации в генах *NRAS/KRAS* усиливают протеасомную активность за счет увеличения экспрессии субъединиц протеасомы и снижения стресс-ответа эндоплазматического ретикулума (Shirazi et al., 2018).

В настоящее время описано множество различных механизмов устойчивости опухолевых клеток к бортезомибу. Было показано, что молекулярные механизмы резистентности клеток к бортезомибу связаны с активностью и строением протеасомы (Barrio et al., 2019). Открыта роль стресс-ответа эндоплазматического ретикулума и системы контроля свертываемости белков в механизмах резистентности к ингибитору протеасомы бортезомибу (Cohen et al., 2021; Ri et al., 2010). Установлено, что активация сигнальных путей NF-kB, JAK/STAT, PI3K/AKT может быть фактором снижения чувствительности к бортезомибу (Dehghanifard et al., 2018; Accardi et al., 2015; Sagawa et al., 2015). Выявлена роль эпигенетических модификаций в появлении резистентности к схемам, содержащим бортезомиб (Barwick et al., 2019; Barwick et al., 2021). Опубликованы прогностические транскриптомные сигнатуры, ассоциированные с устойчивостью к бортезомибу

(Shaughnessy et al., 2011; Mitra et al., 2017; Jung et al., 2022).

Цель исследования

Определить мутационный статус генов *KRAS/NRAS* и профиль экспрессии генов в опухолевых плазматических клетках (ПК) 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 плазматических 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

В рамках диссертационной работы 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 аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) с мутациями и без мутаций в

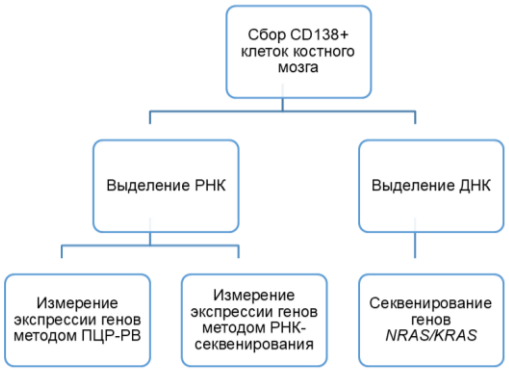
генах *NRAS/KRAS* позволило определить группу пациентов со сниженной глубиной ответа на индукционную терапию, сниженной выживаемостью без прогрессирования (ВБП) и более серьезными нарушениями клинико-лабораторных показателей. Мутации в генах *NRAS/KRAS* могут рассматриваться как дополнительный маркер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

Изучение экспрессии 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.

При помощи анализа транскриптома были определены экспрессии генов, ранжированные по степени важности признака. Анализ данного списка генов позволил выявить дополнительные аспекты механизма устойчивости опухоли к терапии. Добавление новых предикторов ответа на терапию улучшит существующие систему стратификации риска у больных с впервые выявленной ММ, а также является первым шагом на пути создания новой экспрессионной молекулярно-генетической панели для оценки прогноза и ответа на терапию.

Методология и методы исследования

В исследование включено 105 больных с впервые выявленной ММ, проходивших обследование и лечение в «НМИЦ гематологии» Минздрава России с января 2013 по ноябрь 2019 гг., а также 14 доноров (контрольная группа). Пациенты, поступившие в центр, проходили комплексное обследование, включающее лабораторные и инструментальные методы, на основании которых была создана база данных пациентов с ММ. Молекулярно-генетические исследования, выполненные в рамках диссертации, представлены в виде схемы:



Полученные результаты молекулярно-генетических исследований сопоставляли с клинико-лабораторными параметрами, ответом на терапию и показателями выживаемости.

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 сниженной 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 снижением глубины ответа на терапию, а повышенный уровень экспрессии *CREM* и *IL-6* достоверно коррелирует со снижением показателей 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 апробации 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.

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

1. Международная конференция «13th International Conference Haemopoesis Immunology» (г. Будапешт, 3-4 июня, 2016г.).
2. Конгрессы гематологов России и Конгрессы трансфузиологов (г. Москва, 12-14 апреля, 2018 г., 21-23 апреля, 2022 г, 11-13 апреля,2024 г.).
3. Международная конференция «The World Congress on Controversies in Multiple Myeloma» (г. Париж, 2018 г.).
4. Международный конгресс «Xth Eurasian Hematology-Oncology Congress» (г. Стамбул, 8-11 октября, 2019 г.,).
5. Международный конгресс «European Hematology Association Congress» (онлайн, 11-15 июня, 2020 г., г.Милан, 12-15 июня, 2025 г.).
6. I Научно-практической конференции имени академика В.Г. Савченко (г. Москва, 21

сентября, 2022 г.).

7. Научно-практическая конференция «Иммунология гемопоэза» (г. Суздаль, 3-4 июня, 2023 г.).

8. На международной конференции «Korean Society of Hematology (KSH) International Conference & 67th Annual Meeting» (г. Сеул, 26-28 марта, 2026 г.).

Апробация диссертационной работы состоялась 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).

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

Объем и структура диссертации

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 170 страницах машинописного текста и состоит из 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.

Материалы и методы исследования

Клиническая характеристика больных и дизайн исследования

Пациентам, поступившим в центр, проводили комплексное обследование, направленное на верификацию диагноза на основании критериев, разработанных International Myeloma Working Group (IMWG) (Rajkumar et al., 2014), и стадирование ММ по классификациям Durie–Salmon (Durie et al., 1975) и Международной системе стадирования (International Staging System, ISS, R-ISS) (Palumbo et al., 2015). От пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных. Все пациенты получали бортезомиб-содержащие трехкомпонентные схемы лечения в первой линии терапии (индукционный этап): PAD (бортезомиб + адриабластин + дексаметазон), VCD (бортезомиб + циклофосфан + дексаметазон). Противоопухолевый ответ оценивался после 4-6 курсов индукции согласно критериям IMWG (2016) (Kumar et al., 2016).

В исследование включены 105 больных (характеристика представлена в Таблице 1) 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. Контрольная группа состояла из 14 здоровых доноров (муж: жен 1:1, медиана возраста 33 г.). Костный мозг (КМ) больных был получен в отделении гематологии и химиотерапии парапротеинемических гемобластозов с блоком трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, отделении химиотерапии гематологических заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ.

Таблица 1 — Характеристика больных, включенных в исследование, n = 105.

Параметры	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) • t(4;14) (да/нет/нет данных) • del17 (да/нет/нет данных) • amp1q21(да/нет/нет данных) • другие перестройки (да/нет/нет данных)	87 (82,9)/18 (17,1) • 13 (14,9) / 66 (75,9) / 8 (9,2) • 11 (12,6) / 64 (73,6) / 12 (13,8) • 12 (13,8) / 7 (8,1) / 68 (78,2) • 67 (77,0) / 7 (8,1) / 13 (14,9)

Дизайн диссертационной работы представлен на Рисунке 1.

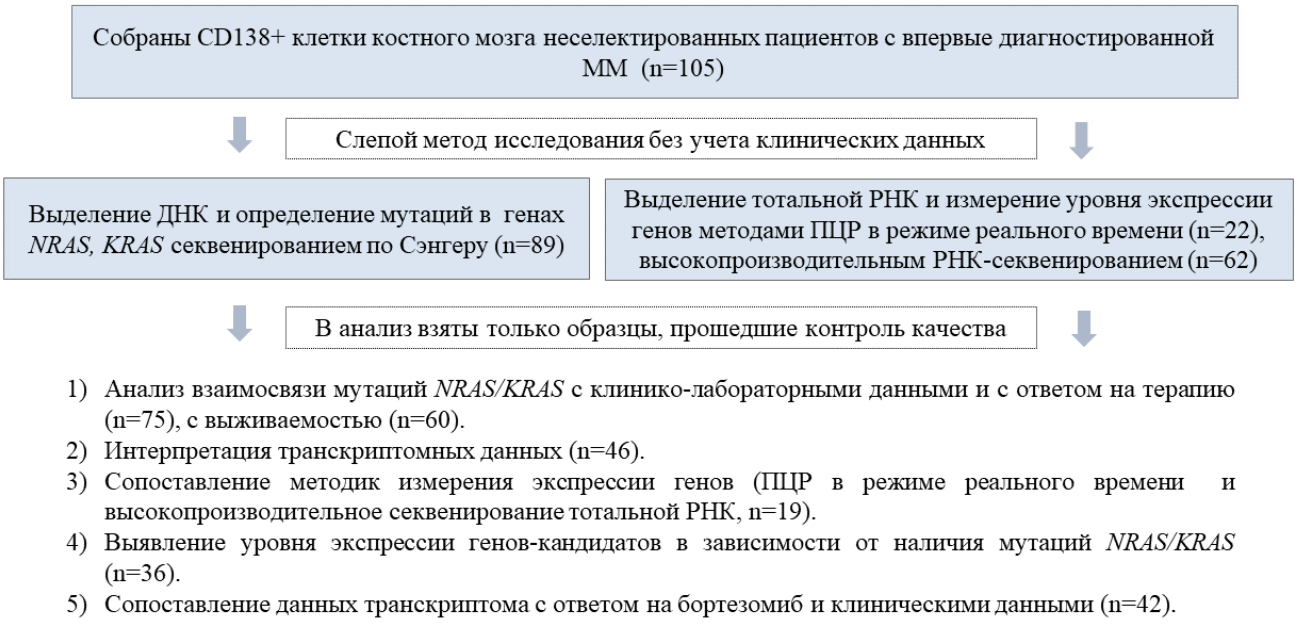


Рисунок 1 – Дизайн диссертационной работы.

Лабораторные методики

Выделение клеток и нуклеиновых кислот

Для исследования использовали ПК CD138+, выделенные из костного мозга больных ММ методом магнитной сепарации с использованием CD138 MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) на сепаратор OctoMACS. Полученные фракции CD138−/CD138+ подсчитывали, а чистоту выделения оценивали методом проточной цитометрии с использованием антител анти-CD138-PE на BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Для выделения геномной ДНК клетки лизировали в буфере с протеиназой К, с последующей фенолом-хлороформной экстракцией, осаждением этанолом, промывкой и растворением в ТЕ-буфере. РНК выделяли методом лизиса клеток в денатурирующем буфере (Sigma-Aldrich, США), с последующей фенол-хлороформной экстракцией, осаждением, промывкой этанолом и растворением в ДЭПК-обработанной воде. При низком содержании ПК в образце использовали TRIzol с осаждением РНК в присутствии гликогена.

Секвенирование генов *NRAS* и *KRAS*

Амплификацию экзонов 2-4 генов *NRAS* и *KRAS* проводили методом полимеразной цепной реакции (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 прямого и обратного праймеров (Синтол, Россия). Температурные условия: 92 °C — 1 мин., 60C — 1 мин., 72 °C — 1 мин., 35 циклов. Продукты ПЦР очищали на колонках с контролем качества очистки методом электрофореза. Секвенирование генов *NRAS/KRAS* по Сэнгеру выполняли на анализаторе ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием прямого и обратного праймеров. Хроматограммы анализировали в программах Ugene и BioEdit (референсные последовательности

RefSeq NG_007524 для гена *KRAS* и NG_007572 для гена *NRAS)*.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени

Качество и концентрацию РНК оценивали электрофорезом в 2% агарозном геле и спектрофотометрически. кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы M-MLV (Promega, США) и случайных гексамерных праймеров (Синтол, Россия). Количественную ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на приборе ABI 7000 Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific, США) в трех повторностях с использованием специфических праймеров и зондов для исследуемых генов и гена «домашнего хозяйства» *HMBS*. Анализ экспрессии генов выполняли методом $2^{\wedge-\Delta\Delta Ct}$. Метод ПЦР-РВ в данной работе использовался для верификации результатов РНК-секвенирования.

Высокопроизводительное РНК-секвенирование

Секвенирование РНК выполняли на платформе Illumina HiSeq 3000 (Illumina, США) с использованием набора для одностороннего секвенирования. Длина фрагментов библиотеки составила 50 п.н. Все образцы секвенировали в одном запуске. Демультиплексирование и конвертацию данных в формат FASTQ проводили с помощью Illumina Bcl2fastq2 v.2.17. Контроль качества данных осуществляли в программах FastQC v.0.11.8 и MultiQC v.1.26. Оценивали общее число прочтений, качество нуклеотидных последовательностей, GC-состав, уровень амплификации, долю выровненных и уникально выровненных прочтений, а также другие показатели качества. Критериями высокого качества данных являлись: средний показатель качества прочтений Phred score >30, содержание неопределённых нуклеотидов (N) <5%, доля выровненных прочтений ≥60%, число уникально картированных прочтений на гены HGNC не менее 2,5 млн и уровень амплификации не выше 35 раз (Sheng et al., 2017).

Анализ экспрессии генов выполняли с применением Salmon (Patro et al., 2017) в режиме квазикартирования с использованием референсного транскриптома GENCODE v32; агрегацию данных с уровня транскриптов до уровня генов выполняли с помощью tximport (Love et al., 2020; Soneson et al., 2016), а идентификаторы Ensembl конвертировали в символы генов HGNC с использованием biomaRt (Durinck et al., 2009). Нормализацию данных и расчет уровня экспрессии генов проводили в пакете DESeq2 (v.1.26.0) в среде R (Love et al., 2014). Для визуализации данных (в среде Python 3) применяли иерархическую кластеризацию с использованием метода Уорда (Ward), в качестве метрики расстояния использовали евклидово расстояние; и метод главных компонент, для которого в анализ вошли 2000 генов с наибольшей вариабельностью экспрессии.

Статистическая обработка данных

Для анализа категориальных признаков использовали критерий Фишера и χ^2-критерий,

рассчитывали отношение шансов (ОШ) с 95% ДИ. Сравнение количественных показателей проводили с использованием t-критерия Стьюдента или теста Уилкоксона. Данные представляли, как среднее ± стандартное отклонение или медиану с межквартильным интервалом (МКИ). Диагностическую и прогностическую значимость оценивали методом ROC-анализа с определением порога по индексу Юдена. Анализ ВБП и ОВ выполняли методом Каплана–Майера, различия оценивали лог-ранговым тестом, влияние факторов — моделью Кокса с расчётом ОР и 95% ДИ. Статистически значимыми считали различия при p <0,05. Для поиска предикторов ответа на терапию использовали данные РНК-секвенирования и алгоритм Random Forest (Python 3, RandomForestClassifier), где уровни экспрессии генов служили признаками, а ответ на бортезомиб — целевой переменной.

Результаты исследования

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

Характеристика мутаций в генах *NRAS/KRAS*

Анализ мутационного статуса генов *NRAS/KRAS* в CD138+ клетках КМ выполнен у 89 пациентов с впервые диагностированной ММ до начала терапии. Мутации выявлены у 37 (42%) больных: в *NRAS* — у 20 пациентов, в *KRAS* — у 17, всего обнаружено 40 мутаций (по 20 в каждом гене). Большинство пациентов (92%) имели по одной мутации, у 8% (n=3) выявлено по два мутационных события. Распределение мутаций по кодонам показано на Рисунке 2А; всего выявлено 19 вариантов мутаций, все миссенс-мутации.

Для подтверждения соматического характера мутаций проведено параллельное секвенирование генов *NRAS/KRAS* в CD138+ и CD138– клетках КМ у 8 пациентов (Рисунок 2Б). В большинстве случаев (6/8) мутации выявлялись только в CD138+ клетках, в двух образцах CD138– обнаружены минорные пики, что может быть связано с контаминацией фракции опухолевыми клетками при сепарации. Полученные данные подтверждают, что мутации в генах *NRAS/KRAS* являются соматическими и характерны для опухолевых плазматических клеток при ММ.

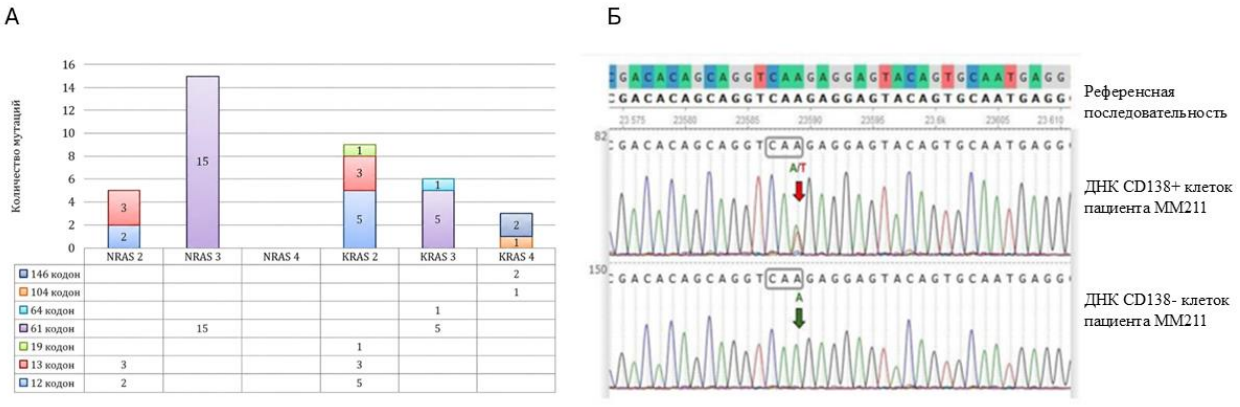


Рисунок 2 – Встречаемость мутаций в генах семейства *RAS* у пациентов с впервые

диагностированной ММ. **А**. *NRAS* 2/3/4 — экзоны 2, 3 и 4; *KRAS* 2/3/4 — экзоны 2, 3 и 4. Каждый цвет столбца соответствует определенному кодону. **Б**. Верхняя хроматограмма — сиквенс ДНК CD138+ клеток, нижняя хроматограмма — ДНК CD138- клеток. Красная стрелка указывает на наличие мутации в CD138+ клетках, отсутствующую в CD138- клетках (зеленая стрелка).

Ответ на терапию бортезомиб-содержащими триплетами схемами больных ММ в зависимости от наличия мутаций в генах *NRAS/KRAS*

Для оценки функциональной значимости мутаций в генах *NRAS/KRAS* применены критерии ClinGen/CGC/VICC. Все выявленные варианты были классифицированы как мутации с высоким онкогенным потенциалом (≥7 баллов).

Анализ клинической значимости мутаций в генах *NRAS/KRAS* проводили на основании оценки глубины ответа на терапию после индукционной терапии PAD/VCD у пациентов с различным мутационным статусом (Рисунок 3). Пациенты были разделены на группы: достигшие глубокого ответа (ПР/ОХЧР по критериям IMWG, 2016) и не достигшие ОХЧР. Оценка проведена у 75 пациентов: мутации выявлены у 33 больных, отсутствие мутаций — у 42. Глубокий ответ был достигнут у 64% пациентов с мутациями и 33,3% без мутаций (p=0,008; ОШ=3,5; ДИ95% 1,32–9,08), что указывает на ассоциацию мутаций в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых ПК при ММ с меньшей вероятностью достижения глубокого ответа на бортезомиб-содержащую индукционную терапию.

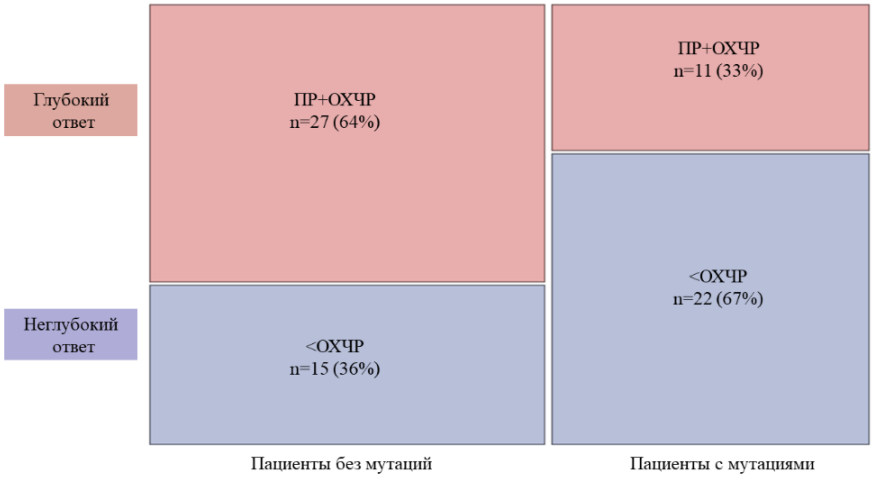


Рисунок 3 – Частота достижения ПР/ОХЧР у пациентов после индукционной терапии в зависимости от наличия мутаций в генах *NRAS/KRAS* в опухолевых клетках костного мозга.

Отдельный анализ показал, что мутации в гене *KRAS* ассоциированы с резистентностью к бортезомиб-содержащей терапии: глубокий ответ отмечен у 13,3% пациентов с мутациями в гене *KRAS* против 63,4% без мутаций в генах семейства *RAS* (p=0,0009; ОШ=11,27; 95% ДИ: 2,23–56,8; Рисунок 4А). Мутации в гене *NRAS* не имели статистически значимой связи со снижением ответа (47,1% против 63,4%; p=0,25; ОШ=1,95; 95% ДИ: 0,62–6,13; Рисунок 4Б), однако отмечалась тенденция к уменьшению глубины противоопухолевого ответа.

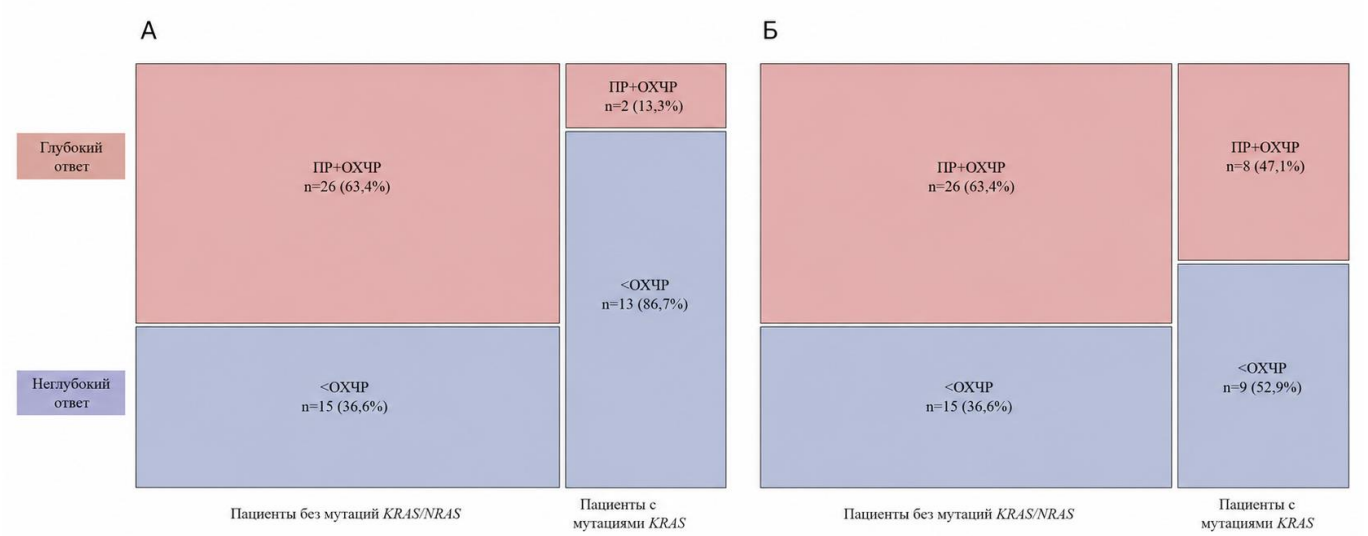


Рисунок 4 – Частота достижения ПР/ОХЧР у пациентов после индукционной терапии в группах с наличием или отсутствием мутаций в генах: **А**. *KRAS*, **Б.** *NRAS* в опухолевых клетках костного мозга.

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 наблюдений (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).

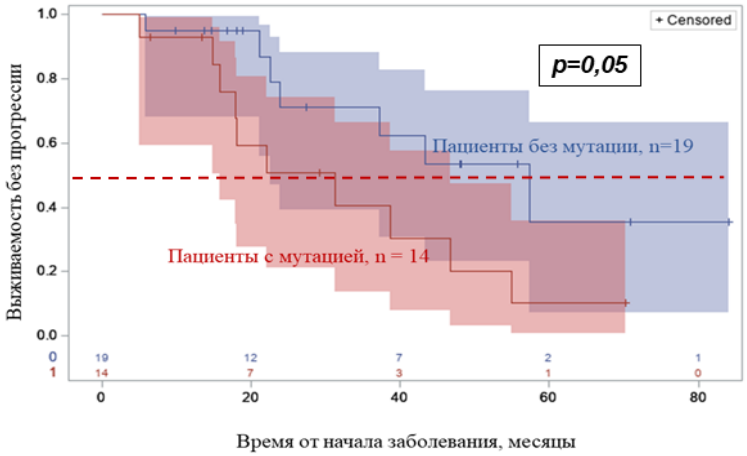


Рисунок 5 – ВБП больных ММ, получивших ауто-ТГСК в зависимости от наличия мутаций в генах *NRAS/KRAS*. Красная линия – пациенты с мутациями в генах *NRAS/KRAS*, синяя линия – пациенты без мутаций.

В другую группу вошли 33 пациента, получившие ауто-ТГСК. Из них, у 14 были обнаружены мутации в генах *NRAS/KRAS*, 19 больных не были носителями мутации на момент диагностики. Значимых различий в ОВ между сопоставляемыми группами не выявлено (p> 0,05); при этом среднее время выживаемости было недооценено из-за цензурирования данных на максимальном сроке наблюдения. Показатели ВБП у носителей мутаций семейства RAS через 20 и 40 месяцев

составили 59,0% и 30,4%, тогда как в контрольной группе — 94,7% и 62,0% соответственно (p = 0,05; Рисунок 5).

Достоверное снижение ВБП пациентов после ауто-ТГСК было ассоциировано с наличием мутаций в гене *KRAS* (p=0,03; Рисунок 6А): медиана составила 18,0 месяцев против 57,4 месяцев в группе контроля (без мутаций в генах семейства *RAS*), а двухлетняя выживаемость — 20,0% против 75,0% соответственно. Наличие мутации в гене *NRAS* не оказывало значимого влияния на ВБП (p=0,12; Рисунок 6Б). В этой группе медиана ВБП составила 38,8 месяцев, а показатели выживаемости через 24 и 36 месяцев составили 83,0% и 63,0% соответственно (в группе контроля — 75,0% на обоих сроках).

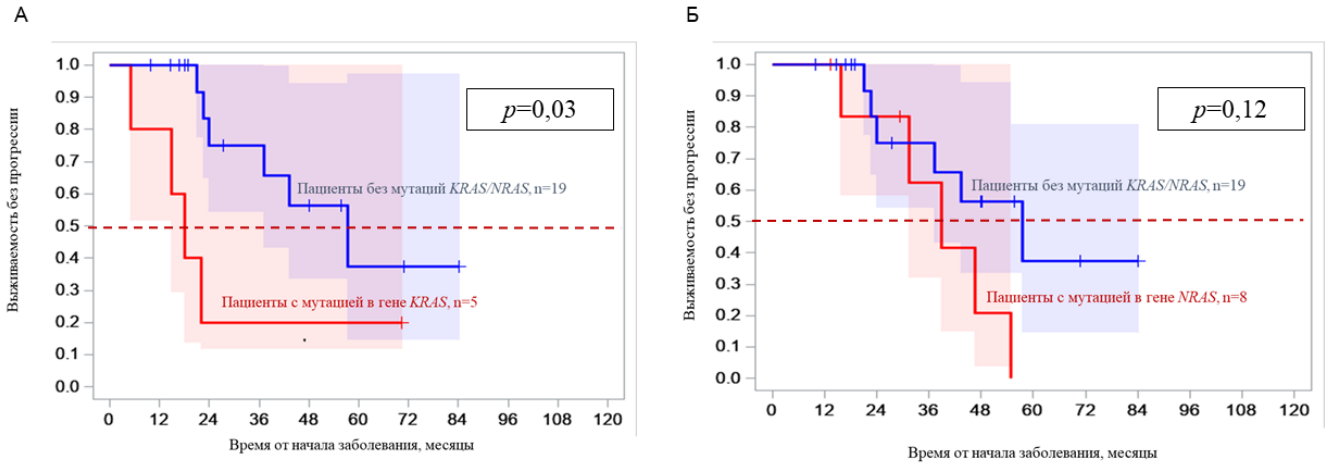


Рисунок 6 – ВБП больных ММ, получивших ауто-ТГСК в зависимости от наличия мутаций в генах: **А**. *KRAS*; **Б**. *NRAS*. Красная линия – пациенты с мутациями в генах *KRAS* или *NRAS*, синяя линия – пациенты без мутаций.

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

Для оценки взаимосвязи клинико-лабораторных характеристик с мутациями в генах *NRAS/KRAS* у пациентов с ММ проведён сравнительный анализ двух групп: с мутациями и без них. Установлено, что при мутациях в генах *NRAS/KRAS* чаще выявлялись костные плазмоцитомы (83,9% против 61,7%; p=0,04; ОШ = 3,23) и множественные очаги остеодеструкции (96,8% против 72,3%; p=0,006; ОШ = 11,5). Лабораторные показатели (β2-микроглобулин, ЛДГ, альбумин, креатинин, гемоглобин, М-градиент, % плазматических клеток в костном мозге) существенно не различались, за исключением более низкого уровня альбумина (36,5 против 39,1 г/л; p=0,04) и более высокого креатинина (101,7 против 73,5 мкмоль/л; p=0,02) у пациентов с мутациями. Далее клинико-лабораторные характеристики сопоставлялись у пациентов с мутациями в генах *KRAS* и *NRAS* и без мутаций в генах *KRAS/NRAS*. У пациентов с мутациями в гене *KRAS* отмечена тенденция к более частому выявлению костных плазмоцитом и множественных остеодеструкций, а также более высокие значения М-градиента (p=0,04), креатинина (p=0,04) и более низкий уровень альбумина (p=0,007). У пациентов с мутациями в гене *NRAS* костные плазмоцитомы

встречались чаще, но без статистической значимости, тогда как множественные остеодеструкции выявлялись достоверно чаще (p=0,02). По остальным клинико-лабораторным показателям значимых различий не получено.

При сопоставлении результатов секвенирования и FISH-исследования не было выявлено достоверной ассоциации между наличием мутаций в генах *NRAS/KRAS* и цитогенетического аберраций высокого риска (p>0,05).

Анализ экспрессии генов в опухолевых клетках больных множественной миеломой

Контроль качества и анализ информативности данных РНК-секвенирования

РНК-секвенирование CD138+ клеток КМ выполнено 62 пациентам и 11 донорам. В целях обеспечения достоверности оценки транскриптомных профилей был проведен контроль качества образцов и сопоставление результатов РНК-секвенирования с данными ПЦР-РВ. Анализ показал высокое качество полученных данных: медианное число прочтений составило 35,2 млн на образец, уникально выровненных прочтений — 10,23 млн, уровень амплификации — 4,71%, доля оснований с качеством ≥ Q30 превышала 90%. Методы визуализации продемонстрировали разделение образцов на группы доноров и пациентов, что отражает биологические различия исследуемых образцов. Исключены образцы, которые не прошли контроль качества. В итоговый транскриптомный анализ включены 46 образцов пациентов и 7 образцов доноров. Сопоставление результатов РНК-секвенирования с данными ПЦР-РВ проведено на 14 образцах пациентов и 5 доноров. Для сравнения оценивали дифференциальную экспрессии 5 генов (*BRAF, MEK1, MEK2, ERK1, ERK2*) у пациентов и доноров обоими методами. Разброс значений при измерении экспрессии методом ПЦР-РВ был выше, чем методом РНК-секвенирования. ПЦР-РВ выявила значимое повышение только *MEK1* (p=0,02). РНК-секвенирование показало статистически значимое увеличение экспрессии *MEK1,* а также *BRAF, MEK2* и *ERK2* у пациентов (p <0,01).

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

С целью идентификации генов, изменяющих уровень экспрессии в опухолевых клетках при ММ при наличии мутации 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: *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; CCND1, p21, p27, c-MYC, VEGF, EGFR, FGFR1; BCL2, BCL2L1, BCL2L2, MCL1, BAX, BCL2A1, BAK1, BOK, BCL2L10, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L14, BCL2L15, BNIP2, BCLXL, BIRC5; IL-6, IL6R, TNF-alpha; MMP2, MMP8, MMP9, MMP11, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP19, MMP21, MMP23B, MMP25; MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D.* В анализ включены пациенты, у которых был определён как мутационный статус,

так и выполнен транскрипционный анализ (19 больных с мутациями в генах *NRAS/KRAS*, 17- без мутаций). В результате проведенного анализа было обнаружено 5 генов (*CREM, p =0,03; NRL, p = 0,03; IL-6, p = 0,024; MEF2B, p = 0,002; MMP14, p = 0,04*), уровень экспрессии которых статистически значимо отличается в образцах опухолевых клеток с мутациями в генах *NRAS/KRAS* по сравнению с контрольными образцами (Рисунок 7). Уровень экспрессии всех этих пяти генов в опухолевых образцах с мутациями оказался выше, чем в контрольной группе без мутаций. Кроме того, в образцах с мутациями уровень экспрессии генов *CCND1, MEF2D, MAFA* был повышен, однако, различия не достигли уровня статистической значимости.

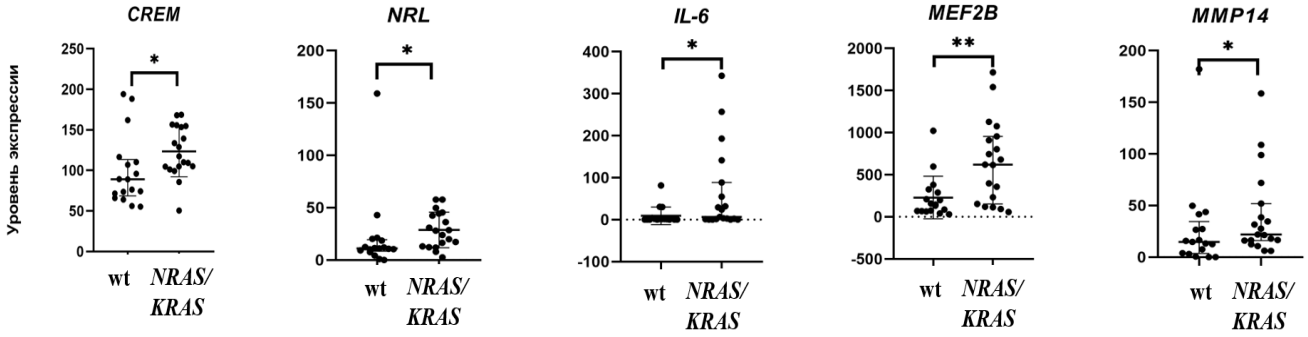


Рисунок 7 – Уровень транскрипционной активности генов–мишеней сигнальных каскадов RAS/ERK в опухолевых клетках в зависимости от наличия мутаций в генах *NRAS/KRAS*. Показаны только гены со статистически значимыми различиями (p <0,05): *CREM, IL-6, NRL, MMP14, MEF2B.* Символ на графике – значение экспрессии в одном образце, горизонтальные линии – медиана и МКИ.

Активация генов *CREM, NRL, IL6, MMP14, MEF2B* обеспечивает индукцию пролиферации и неоангиогенеза (*IL-6, MEF2B*), регуляцию дифференцировки клеток (*NRL*), 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.

Глубина противоопухолевой терапии, показатели ОВ и ВБП больных ММ в зависимости от экспрессии генов *IL-6, CREM, NRL*

Экспрессия генов *IL-6, CREM, NRL, MMP14 и MEF2B* была повышена в опухолевых клетках ММ с мутациями *NRAS/KRAS*. Для оценки их патогенетической и прогностической значимости проведён анализ экспрессии данных генов у пациентов с глубоким (ПР/ОХЧР, n=19) и неглубоким (≤ЧР, n=23) ответом на терапию (Рисунок 8). Для генов *CREM, NRL, IL-6, MMP14* и *MEF2B* рассчитаны медианы и выполнен анализ критерием Манна–Уитни. Установлено, что экспрессия *NRL* была ниже у пациентов с глубоким ответом ПР/ОХЧР по сравнению с пациентами без глубокого ответа (медиана 12,1 против 28,15; p=0,02). Траснкрипционный фактор NRL относится к семейству белков MAF, играющих важную роль в патогенезе ММ. Ранее роль гена *NRL* при ММ не была изучена.

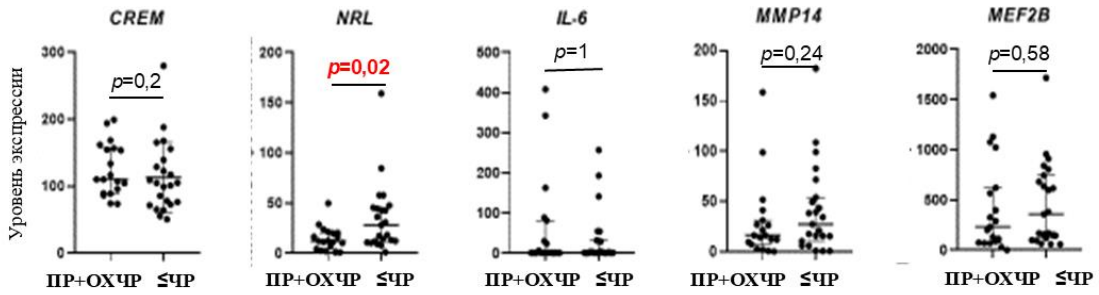


Рисунок 8 – Уровень транскрипционной активности генов-мишеней сигнальных каскадов RAS/ERK: *CREM, IL-6, NRL, MMP14, MEF2B* у пациентов в зависимости от ответа на терапию. Каждый символ обозначает значение экспрессии в одном образце; горизонтальные линии – медиана и МКИ.

В анализ ВБП и ОВ были включены 44 пациента с ММ. Пороговые значения экспрессии для стратификации пациентов определены с помощью ROC-анализа и составили (в логарифмированном виде): *IL-6* – 1,2; CREM – 2,14; *NRL* – 1,52; *MMP14* – 2,11; *MEF2B* – 2,38.

Пациенты с низким уровнем экспрессии гена *IL-6* (<1,2) имели достоверно лучшую ОВ по сравнению с группой с высокой экспрессией (≥1,2) (p=0,05; Рисунок 10Б). Анализ ВБП пациентов в группах пациентов с высокой (≥2,14) и низкой экспрессией (<2,14) гена *CREM*, показал, что увеличение активности гена *CREM* ассоциировано с сокращением показателей ВБП (p=0,01; Рисунок 10А).

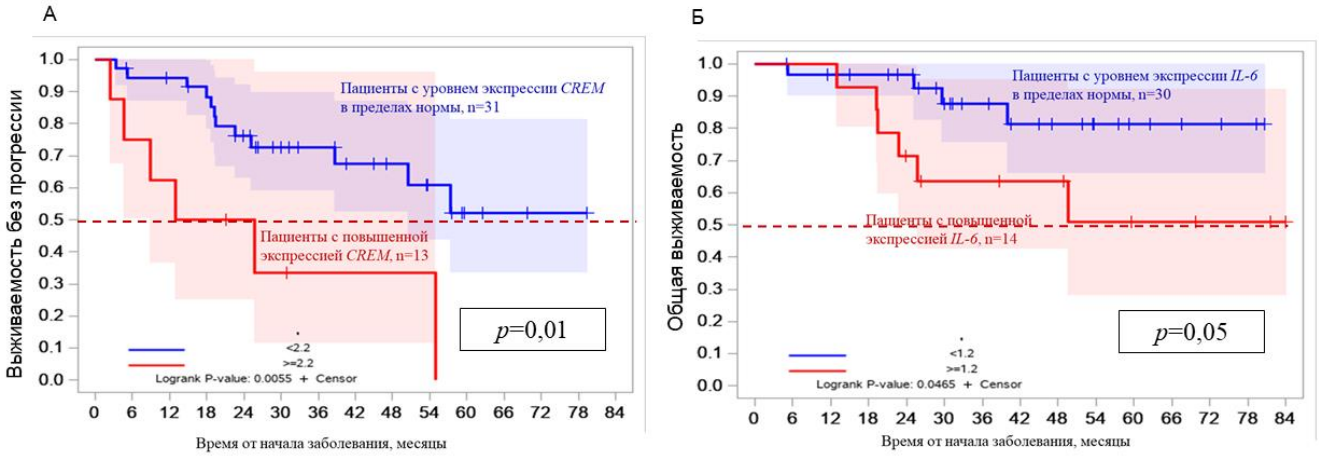


Рисунок 9 – ОВ и ВБП у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии генов *IL-6* и *CREM* в опухолевых клетках. **А.** ОВ в зависимости от экспрессии гена *IL-6*: **Б.** ВБП в зависимости от экспрессии гена *CREM*:

Полученные данные указывают, что высокая экспрессия *IL-6* может рассматриваться как неблагоприятный прогностический фактор, ассоциированный с ОВ и, вероятно связанный с провоспалительными эффектами данного цитокина, активацией сигнальных путей, что способствует прогрессированию опухолевого процесса. 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.

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

Для идентификации молекулярных различий в опухолевых клетках у пациентов с впервые диагностированной ММ, которые влияют на глубину ответа индукционной терапии схемами PAD/VCD, 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) 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 оценен ответ на терапию после 6 курса индукционной терапии схемами PAD/VCD. Девятнадцать пациентов достигли ПР/ОХЧР, у 23 пациентов ответ составил ≤ЧР. На Рисунке 10 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.

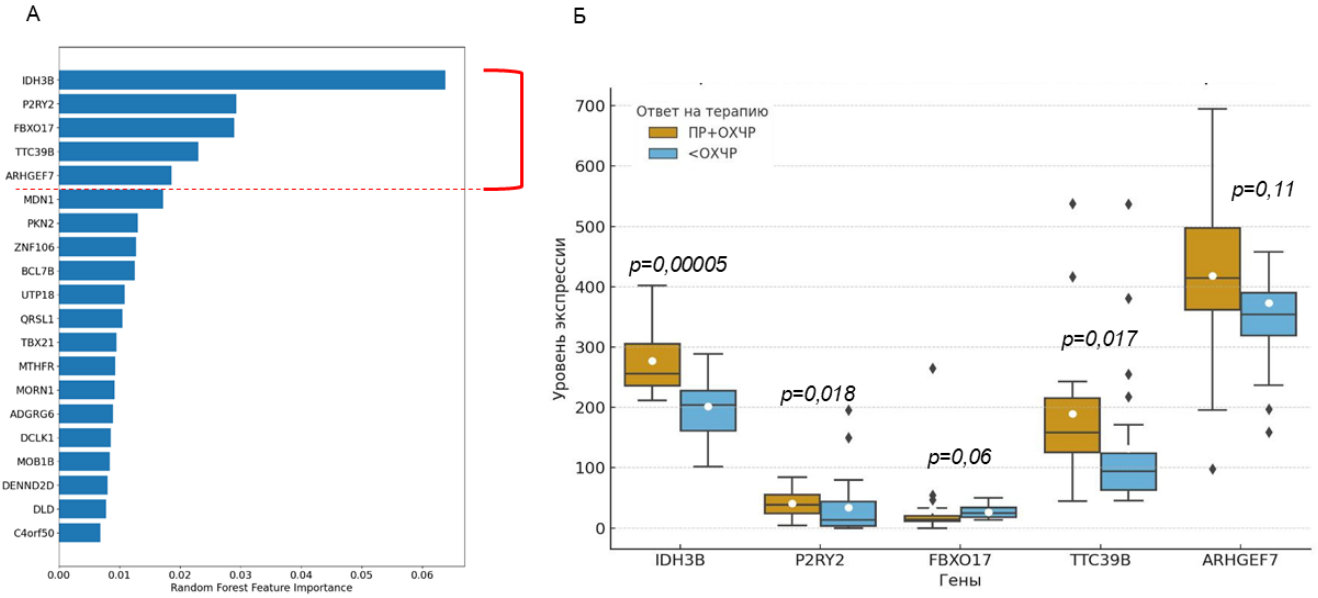


Рисунок 10 – Предикторы ответа на бортезомиб-содержащую индукционную терапию, определенные с помощью транскриптомного анализа. **А**. Гены, внесшие наибольший вклад в предсказательную способность модели. **Б**. Диапазон экспрессий генов (красная скобка на рисунке А): *IDH3B, P2RY2, FBXO17, TTC39B и ARHGEF7* у пациентов с глубоким и неглубоким ответом на терапию.

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 микроокружением (*P2RY2, ARHGEF7*), а также убиквитин-зависимой регуляцией клеточного цикла (*FBXO17*) (Рисунок 10А).

Анализ изменения экспрессии данных генов показал, что у пациентов с глубоким ответом на терапию (ПР+ОХЧР) преимущественно наблюдалось повышение экспрессии генов *IDH3B, P2RY2, ARHGEF7* и *TTC39B*, тогда как для *FBXO17* был характерен противоположный профиль — снижение уровня экспрессии у пациентов с глубоким ответом (Рисунок 10Б).

С учетом ранее выявленной ассоциации мутаций в генах *NRAS/KRAS* со сниженной эффективностью терапии была проведена оценка взаимосвязи мутационного статуса с экспрессией генов-предикторов ответа. Статистически значимых ассоциаций обнаружено не было, однако отмечена тенденция к снижению экспрессии гена *IDH3B* при наличии мутаций в генах *NRAS/KRAS* (p=0,08), что может указывать на возможную связь метаболических нарушений митохондрий и данных мутаций.

При анализе взаимосвязи экспрессии генов *IDH3B, P2RY2, TTC39B, ARHGEF7* и *FBXO17* с клинико-лабораторными характеристиками больных ММ статистически значимых ассоциаций выявлено не было, за исключением гена *ARHGEF7*. Экспрессия данного гена характеризовалась тенденцией к повышению у пациентов с глубоким ответом на терапию и снижением у больных с плазмоцитомами (p=0,07).

Дополнительный анализ показал значимое снижение экспрессии *ARHGEF7* у пациентов с моносомией 13-й хромосомы (p=0,0005). Уровень экспрессии гена *ARHGEF7* в опухолевых клетках больных ММ был ниже по сравнению с клетками здоровых доноров, что позволяет предположить участие данного гена в процессах опухолевой трансформации ПК и формировании ответа на терапию.

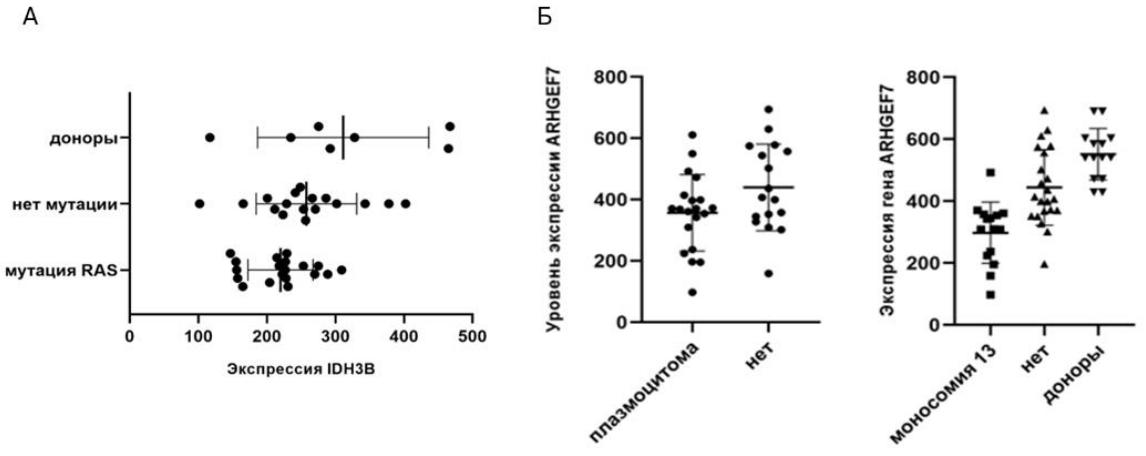


Рисунок 11 – Взаимосвязь экспрессии генов, ассоциированных с ответом на терапию и клинико-лабораторными показателями **А**. Уровни экспрессии *IDH3B* в зависимости от наличия мутаций в генах *NRAS/KRAS* опухолевых ПК, а также в ПК доноров. Б. Уровень экспрессии гена *ARHGEF7* в зависимости от (слева направо): наличия плазмоцитом, наличия моносомии 13.

Заключение

Патогенетическая значимость мутаций в генах семейства *RAS* при ММ подтверждается их отрицательным влиянием на эффективность бортезомиб-содержащих индукционных схем лечения и показатели ВБП у пациентов после ауто-ТГСК. Компаративный анализ выявил превалирующее негативное значение мутаций в гене *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, MEF2B*, которые возможно задействованы в механизмах, реализующих негативный эффект мутаций в генах семейства *RAS*. Экспрессия генов *NRL, CREM, IL-6* ассоциированы со снижением эффективности терапии, ВБП и ОВ соответственно. Выявленные ассоциации экспрессий и неблагоприятного исхода заболевания подчеркивают важную роль нарушения регуляции каскада RAS/ERK в прогрессии ММ.

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). Гиперэкспрессия гена *NRL* ассоциирована со сниженной глубиной 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). 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

Для улучшения стратификации пациентов с впервые выявленной ММ рекомендовано проводить тестирование на мутации в генах *NRAS/KRAS* перед назначением бортезомиб-содержащих схем. Рекомендовано исследовать мутации в генах *NRAS/KRAS* методом секвенирования, так как 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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Sergeeva, A. M. Transcriptome analysis of bone marrow plasma cells in multiple myeloma patients before treatment / A. M. Sergeeva, A. K. Gribkova, V. A. Surimova [et al.] // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2025. – Vol. 19. – No. 1. – P. 98–108.
2. Sergeeva, A. RNA sequencing-based detection of plasma cell clonality and clonotypes in patients with multiple myeloma / A. Sergeeva, Y. Chabaeva, S. Mariina [et al.] // HemaSphere. – 2025. – Vol. 9. – Suppl. 1. – P. 1005–1006.
3. Sergeeva, A. Transcriptomic analysis identifies molecular differences between patients with newly diagnosed multiple myeloma that lead to response or resistance to induction therapy with PAD/VCD regimens / A. Sergeeva, V. Surimova, S. Kulikov, L. Mendeleeva // HemaSphere. – 2025. – Vol. 9 – Suppl. 1. – P. 1030–1032.
4. Сергеева, А. М. Профили экспрессии генов у больных множественной миеломой в дебюте заболевания / А. М. Сергеева, А. К. Грибкова, В. А. Суримова [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2024. – Т. 69. – № 2 – прил. 1. – С. 135.
5. Суримова, В. А. Применение методов машинного обучения для изучения прогностической значимости молекулярно-генетических и иммунофенотипических признаков у пациентов с различными заболеваниями системы крови / В. А. Суримова, Ю. А. Чабаева, Н.В. Рисинская, А. М. Сергеева [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2024. – Т. 69. – № 2 – прил. 1. – С. 342.
6. Сергеева, А. М. Мутации в генах *KRAS/NRAS* и эффективность индукционной терапии по трехкомпонентным схемам на основе бортезомиба у пациентов с впервые диагностированной множественной миеломой / А. М. Сергеева, В. Л. Сурин, Ю. А. Чабаева [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2024. – Т. 17. – № 3. – С. 256–265.
7. Сергеева, А. М. Функциональные различия мутаций генов *KRAS* и *NRAS* в опухоли у пациентов в дебюте множественной миеломы / А. М. Сергеева, В. Л. Сурин, А. А. Крайзман [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2022. – Т. 67. – прил. 2. – С. 137.
8. Borisov, N. Machine learning applicability for classification of PAD/VCD chemotherapy response using 53 multiple myeloma RNA sequencing profiles / N. Borisov, A.Sergeeva, M. Raevskiy [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2021. – Vol. 11. – Art. 652063.
9. Sergeeva, A. Somatic mutations in RAS genes are associated with poor prognosis in multiple myeloma / A. Sergeeva, A. Kraizman, V. Surin, L. Mendeleeva//EHA library. – 2020. –EP920.
10. Макунина, Э. А. Экспрессия гена MAGE-C1 у больных множественной миеломой в дебюте заболевания / Э. А. Макунина, М. В. Фирсова, Л. П. Менделеева, А.М. Сергеева [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – прил. 1. – С. 173.

11. Сергеева, А. М. 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.
12. Abramova, T. Complex molecular genetic study of a patient with multiple myeloma / T. Abramova, A. Sergeeva, V. Surin [et al.] // Molecular Cytogenetics. – 2019. – Vol. 12. – Suppl. 1. – P. 2.P24.
13. Sergeeva, A. Characterization of MAPK signaling pathway in newly diagnosed multiple myeloma / A. Sergeeva, V. Surin, L. Mendeleeva // Leukemia Research. – 2019. – Vol. 85. – P. S22.
14. Sergeeva, A. Genomic alterations in CIITA are frequent in primary mediastinal large B-cell lymphoma and uncommon for multiple myeloma / A. Sergeeva, S. Kuznetsova, Y. Mangasarova, T. Obukhova, V. Surin // Иммунология гемопоэза. – 2019. – Т. 16. – № 2. – С.176–177.
15. Нарейко, М. В. Генетические аномалии у первичных больных множественной миеломой и их влияние на результаты лечения / М. В. Нарейко, Л. П. Менделеева, В. Л. Сурин, А.М. Сергеева [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – прил. 1. – С. 161.
16. Nareyko, M. V. Influence of C-MYC hyperexpression and RAS genes mutations on the disease prognosis and therapy response in multiple myeloma patients / M. V. Nareyko, E. Y. Demidova, A. M. Sergeeva [et al.] // Иммунология гемопоэза. – 2016. – Т. 14. – № 1. – С. 98.

Список сокращений и условных обозначений

ММ — множественная миелома

ПК — плазматические клетки

КМ — костный мозг

ВБП — выживаемость без прогрессирования

ОВ — общая выживаемость

ПР — полная ремиссия

ОХЧР — очень хорошая частичная ремиссия

ЧР — частичная ремиссия

ауто-ТГСК — аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

РНК — рибонуклеиновая кислота

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК — комплементарная ДНК

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

NRAS/KRAS — гены семейства RAS; гомологи малых ГТФаз

RAS/ERK — сигнальный каскад с участием белков RAS и ERK

PI3K/AKT — сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназа/AKT

NF-κB — ядерный фактор κB

JAK/STAT — сигнальный путь Янус-киназа/активатор транскрипции STAT

ЛДГ — лактатдегидрогеназа

СРБ — С-реактивный белок

МКИ — межквартильный интервал

ДИ — доверительный интервал

ОШ — отношение шансов

ОР — отношение рисков

ROC-анализ — анализ характеристической кривой ошибок классификации

AUC — площадь под ROC-кривой

ISS — Международная система стадирования (International Staging System)

R-ISS — пересмотренная Международная система стадирования

IMWG — International Myeloma Working Group (Международная рабочая группа по миеломе)

CD138+ — плазматические клетки, экспрессирующие маркер CD138

CD138− — клетки без экспрессии маркера CD138

IL-6 — интерлейкин-6

CREM — cAMP-responsive element modulator

NRL — нейрорегулируемый белок

MMP14 — матричная металлопротеиназа 14

MEF2B — myocyte enhancer factor 2B

IDH3B — изоцитратдегидрогеназа 3B

P2RY2 — пуринергический рецептор P2Y2

TTC39B — tetratricopeptide repeat domain 39B

ARHGEF7 — RhoGEF 7

FBXO17 — F-box protein 17