

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ЛАНДШАФТА МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Чебыкина Д.А.¹, Моторин Д.В.¹, Семенова Н.Ю.¹, Мотыко Е.В.¹, Кириенко А.Н.¹, Кустова Д.В.¹, Гарифуллин А.Д.¹, Бессмельцев С.С.^{1,2}, Сидоркевич С.В.¹,
Мартынкевич И.С.¹

¹ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16, тел./факс +7 (812) 309-79-81, email: bloodscience@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41
email:bessmeltsev@yandex.ru

Резюме. За последние десятилетия методы диагностики генома претерпели настоящую эволюцию: от анализа хромосомных aberrаций до полногеномного секвенирования единичных клеток, углубив знания о клеточном происхождении множественной миеломы (ММ), ее микроокружении, молекулярном ландшафте. Каждый год регистрируются и внедряются новые препараты и схемы лечения, создание которых стало возможным благодаря лабораторным данным, полученным при мультиомиксных молекулярно-генетических исследованиях с применением секвенирования нового поколения (NGS).

Цель исследования. Изучить молекулярно-генетический ландшафт и прогностическую значимость выявленных мутаций генов у пациентов с ММ с применением NGS-анализа.

Материалы и методы. Всем пациентам проведен мутационный скрининг с использованием NGS-панели 118 генов. Анализ ДНК пациента проведен на платформе NextSeq Illumina методом парно-концевого чтения. Для определения прогностической значимости всех найденных мутаций у каждого пациента была

рассчитана опухолевая мутационная нагрузка (ТМВ), которая определялась как количество мутаций на 1 мегабазу (Mb) кодирующей последовательности. Медиана ТМВ равнялась 5,0 мутаций/Mb.

Результаты. Проведено исследование у 44 пациентов в возрасте от 38 до 81 года (медиана возраста 60 лет). Медиана наблюдения составила 32,8 месяцев с максимальным периодом наблюдения 13 лет. Среди всех выявленных мутаций, неблагоприятное влияние на течение ММ оказывали мутации в генах *NRAS*, *FAT1* и *ATM*. Трехлетняя БСВ в группе с высокой ТМВ ($\geq 6,63$) составила 42,8% (95% ДИ:22,6–81,0), у пациентов с низкой ТМВ ($< 6,63$) – 76,7%, (95% ДИ:22,6–81,0), $p = 0,041$

Заключение. Мутации в генах *NRAS*, *FAT1* и *ATM* показали неблагоприятное влияние на выживаемость пациентов с ММ. Установлено, что высокая опухолевая мутационная нагрузка является значимым негативным прогностическим фактором у пациентов с ММ. Наличие хотя бы одной патогенной мутации ухудшает прогноз пациентов с ММ.

Ключевые слова: множественная миелома; хромосомные перестройки; mSMART; секвенирование нового поколения

FEATURES OF THE MOLECULAR LANDSCAPE OF MULTIPLE MYELOMA

Chebykin D.A.¹, Motorin D.V.¹, Semenova N.U.¹, Motyko E.V.¹, Kirienko A.N.¹,
Kustova D.V.¹, Garifullin A.D.¹, Bessmeltsev S.S.^{1,2}, Sidorkevich S.V.¹,
Martynkevich I.S.¹

¹*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024, Tel.: +7 (812) 309-79-81; e-mail: bloodscience@mail.ru*

²*Federal State Budgetary Institution of Higher Education "North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov" of the Ministry of Health of the Russian Federation*

email:bessmeltsev@yandex.ru

Summary. Significant advances in the diagnosis and treatment of multiple myeloma (MM) have appreciably improved survival rates, but it has not been possible to exclude MM from the list of incurable diseases yet. The results of sequencing a panel of genes by means of the NGS make it possible not only to determine the prognosis, but also, thanks to the accumulation and systematization of data, the detection of new mutations, contribute to a deeper understanding of the pathogenesis of MM and the development of new targeted drugs.

The aim of the work. Studying the prognostic significance of gene mutations in patients with MM using NGS analysis.

Materials and methods. All patients underwent mutation screening using an NGS panel of probes for 118 genes. The patient's DNA was analyzed on the NextSeq Illumina platform by means of paired-end reading. To determine the prognostic significance of all mutations found in each patient, the tumor mutational burden (TMB) was calculated, which was defined as the number of mutations per 1 megabase (Mb) of the coding sequence. The median TMB was 5.0 mutations/Mb.

Results. The study was conducted in 44 patients aged from 38 to 81 years old (median age 60 years old). The median follow-up was 32.8 months with a maximum follow-up period of 13 years. Among all the identified mutations, mutations in the *NRAS*, *FAT 1* and *ATM* genes had an adverse effect on the course of MM. Three-year OS in the group with high TMB (≥ 6.63) was 42.8% (95% CI: 22.6–81.0), in patients with low TMB (< 6.63) – 76.7% (95% ДИ: 22.6–81.0), $p = 0.041$

Conclusion. Mutations in the *NRAS*, *FAT 1* and *ATM* genes had an adverse effect. It has been established that a high tumor mutational burden is a significant negative prognostic factor in patients with MM. The presence of at least one pathogenic mutation worsens the prognosis of patients with MM.

Keywords: *multiple myeloma; chromosome rearrangements; mSMART; new generation sequencing*

Введение. ММ остается сложным гематологическим заболеванием, требующим постоянного изучения его биологии и поиска персонализированных терапевтических подходов. Мутагенные процессы, происходящие с высокой частотой в плазматических клетках (ПК), ассоциированы с накоплением значительного числа различных генетических поломок, таких как однонуклеотидные замены, инсерции, делеции, изменения копийности фрагментов и целых хромосом, хромосомные перестройки и изменение ploидности хромосомного набора. Секвенирование нового поколения (NGS—«next generation sequencing») — это многообещающий диагностический инструмент для выявления как соматических, так и герминальных мутаций при ММ.

В 2010 г. были проведены первые исследования экзосом плазматических клеток, в ходе которых не было выявлено специфичных для ММ нарушений [1]. Следует отметить, что во всех исследованных материалах был найден широкий диапазон генетических событий наряду с идентификацией многочисленных субклонов [2]. При этом высокая частота мутаций была отмечена в группе, состоящей из 10 генов. Согласно данным исследований, клональная гетерогенность может определяться уже на бессимптомной стадии болезни, несмотря на достаточно невысокий уровень мутационной нагрузки [3].

При ММ описано как минимум 63 драйверных генов, участвующих в канцерогенезе заболевания, однако применение этих данных в клинической практике представляет нерешенную задачу. В результате исследования генома у 1273 пациентов с впервые диагностированной ММ установлен ряд зависимостей, включающих в себя ассоциации $t(4;14)$ и мутациями в генах *FGFR3*, *DIS3* и *PRKD2*; $t(11;14)$ соответственно с мутациями с *CCND1* и *IRF4*, и аналогично $t(14;16)$ с мутациями в *MAF*, *BRAF*, *DIS3* и *ATM*; а также гипердиплоидию с делецией 11q с мутациями в *FAM46C* и перестройками *MYC*. Эти взаимосвязи указывают на то, что геномный ландшафт миеломы может быть предопределён первичными генетическими событиями, на основе которых выстраиваются дальнейшие перестройки, приводящие к

определенному накоплению генетических мутаций. Понимание этих зависимостей может объяснить на эволюционные закономерности патогенеза и привести к более эффективному прогнозированию генетических рисков у пациентов с ММ [4].

На сегодняшний день с помощью методов NGS расширены наши представления о патогенезе ММ, определена частота мутаций и вероятные механизмы резистентности, проанализированы вовлекаемые сигнальные клеточные пути, получены новые данные о прогностической роли мутаций генов и определены вероятные мишени для таргетной терапии. Наиболее рациональным методом оценки перспективных методов лечения при онкогематологических новообразованиях является использование методов биостатистики, которые лежат в основе накопления и сравнения данных о прогнозе течения заболевания, определения статистической значимости эффективности терапии и показателей выживаемости. В свою очередь методы биоинформатики проливают свет на молекулярно-генетические механизмы возникновения и прогрессирования заболевания на основе накопленных больших массивов данных.

В настоящей работе мы представляем результаты применения технологии NGS для выявления наследуемых и соматических мутаций, включая структурные изменения у группы пациентов с ММ. В статье проведен анализ данных NGS с учетом влияния генетического профиля на результаты лечения пациентов и потенциальный прогноз течения заболевания.

Цель работы. Изучить молекулярно-генетический ландшафт и прогностическую значимость выявленных мутаций генов у пациентов с ММ с применением NGS-анализа.

Материалы и методы. В проспективное исследование включены 22 женщины (50,0%) и 22 (50,0%) мужчины с ММ в возрасте от 38 до 81 года (медиана 60 лет), получавших лечение в гематологической клинике Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии ФМБА России (Санкт-Петербург) в период с 2011 г. по настоящее время. Длительность

наблюдения составила 32,8 месяцев с максимальным периодом наблюдения 13 лет. Множественная миелома была диагностирована в соответствии с критериями Международной рабочей группы по миеломе (IMWG) и текущими рекомендациями Европейского общества медицинской онкологии (2021). Стадирование и оценка риска проводились в соответствии с Международной системой стадирования множественной миеломы или пересмотренной Международной системой стадирования в зависимости от наличия исходных цитогенетических данных.

Для цитогенетического исследования использовались клетки аспирата костного мозга. Интерпретацию хромосомных нарушений и запись кариотипа выполняли согласно международной цитогенетической номенклатуре ISCN 2020. FISH осуществляли по протоколам производителей коммерческих ДНК-зондов.

Всем пациентам проведен мутационный скрининг с использованием NGS-панели зондов к 118 генам (лимфоидная таргетная NGS-панель, таблица 1) на платформе NextSeq Illumina методом парно-концевого чтения. Обработка данных секвенирования проведена с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (hg37), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов нуклеотидной последовательности (здесь и далее «варианты») и фильтрацию вариантов по качеству. Интерпретация клинической значимости предположительно соматических вариантов проводилась на основании рекомендаций AMP (Association for Molecular Pathology), герминальных вариантов на основании рекомендаций ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics). Выявленные варианты нуклеотидной последовательности распределяли на 5 групп: патогенный, вероятно патогенный, неопределенного значения, вероятно доброкачественный, доброкачественный. Попарное сравнение с герминальной ДНК не проводили.

Для определения прогностической значимости всех найденных мутаций у каждого пациента была рассчитана опухолевая мутационная нагрузка (TMB),

которая определялась как количество мутаций на 1 мегабазу (Mb) последовательности. Количественные переменные представлены в виде медианы квартилей (Me (Q3–Q1), частоты – в виде собственных значений с указанием 95 % доверительного интервала (ДИ).

Таблица 1.

Лимфоидная таргетная NGS панель

<i>ABL1</i>	<i>AKT3</i>	<i>ALK</i>	<i>APC</i>	<i>ARID1</i> A	<i>ASXL</i> 1	<i>ATM</i>	<i>ATRX</i>	<i>B2M</i>
<i>BCL2</i>	<i>BCOR</i>	<i>BCORL</i> 1	<i>BCR</i>	<i>BIRC3</i>	<i>BRAF</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BTK</i>
<i>CALR</i>	<i>CARD11</i>	<i>CBL</i>	<i>CCND</i> 1	<i>CD58</i>	<i>CD79</i> B	<i>CDKN2</i> A	<i>CDX2</i>	<i>CEBP</i> A
<i>CIITA</i>	<i>CREBB</i> P	<i>CSF3R</i>	<i>CUX1</i>	<i>DDX3X</i>	<i>DEK</i>	<i>DIS3</i>	<i>DNMT</i> 3A	<i>EP300</i>
<i>ETV6</i>	<i>EZH2</i>	<i>FAT1</i>	<i>FBXW</i> 7	<i>FLT3</i>	<i>GATA</i> 1	<i>GATA2</i>	<i>GJB2</i>	<i>GNA1</i> 3
<i>GNAS</i>	<i>H1-1</i>	<i>HRAS</i>	<i>ID3</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>IKZF1</i>	<i>IKZF3</i>	<i>IRF4</i>
<i>ITPK</i> B	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>KDM6</i> A	<i>KDR</i>	<i>KIT</i>	<i>KLF2</i>	<i>KMT2A</i>	<i>KMT2</i> C
<i>KMT2</i> D	<i>KRAS</i>	<i>MAP2</i> K1	<i>MEF2</i> B	<i>MGA</i>	<i>MPL</i>	<i>MSN</i>	<i>MYC</i>	<i>MYD8</i> 8
<i>NF1</i>	<i>NOTCH</i> 1	<i>NOTC</i> H2	<i>NPM1</i>	<i>NRAS</i>	<i>NSD2</i>	<i>PDGF</i> RA	<i>PHF6</i>	<i>PIK3C</i> B
<i>PIM1</i>	<i>PKHD1</i>	<i>PLCG2</i>	<i>POT1</i>	<i>PRDM</i> 1	<i>PTC</i> H1	<i>PTEN</i>	<i>PTPN1</i> 1	<i>PTPR</i> D
<i>RAD2</i> 1	<i>RB1</i>	<i>RHOA</i>	<i>RPS15</i>	<i>RUNX1</i>	<i>RYR1</i>	<i>SAMH</i> D1	<i>SETBP</i> 1	<i>SF3B1</i>
<i>SH2B</i> 3	<i>SMARC</i> A4	<i>SMC1A</i>	<i>SMC3</i>	<i>SOCS1</i>	<i>SRSF</i> 2	<i>STAG2</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT6</i>

<i>SUZ1</i> 2	<i>SYK</i>	<i>TENT5</i> C	<i>TET2</i>	<i>TNFAI</i> P3	<i>TP53</i>	<i>U2AF1</i>	<i>WT1</i>	<i>XPO1</i>
<i>ZRSR</i> 2								

Данные анализировались с использованием Jamovi 2.4.8.0 (macOS). Анализ данных выполнен на языке статистического программирования R v4.2.2. Сравнение данных категориальных переменных производилось методом хи-квадрат. Анализ выживаемости выполнен методом Каплана-Мейера, Статистически значимыми считались различия со значением $p < 0,05$. Различия в группах оценивались методом Лог-Ранг. Общую выживаемость (ОВ) определяли со дня верификации диагноза до даты смерти от любой причины. Точкой отсчета для беспрогрессивной (ВБП) и бессобытийной (БСВ) выживаемости считали дату первого дня первого цикла терапии, для безрецидивной выживаемости (ВБР) – дату достижения полной ремиссии. В анализе БСВ событием считали прогрессирование, рецидив, трансформацию или смерть от любой причины.

Результаты. Диагноз был морфологически подтвержден у 30 пациентов. Медиана количества плазматических клеток, определяемых при проточной цитометрии, составила 15,8% (3,9–31,0%), а по данным трепанобиопсии и миелограммы – 30,0% (17,2–60,0) и 32,6% (16,5–54,5) соответственно. Медиана значения М-компонента была 28,7 г/л (6,65–41,5). Среди пациентов преобладали больные, относящиеся к III стадии по системе B. Durie, S. Salmon– 75,0%, а к группе высокого цитогенетического риска согласно классификации mSMART3.0 были отнесены 34,1% больных. Характеристика пациентов представлена в таблице 2.

Таблица 2.

Характеристика пациентов (n=44)

Характеристика	Всего (n=44)
Пол	
Женский	22 (50,0%)
Мужской	22 (50,0%)
Возраст, лет	60 (38-81)
Индекс коморбидности Чарлсона (Charlson comorbidity index), баллы	5 (2-13)
Медиана возраста на момент наблюдения, лет	58 (38 – 81)
Лабораторные данные	
ЛДГ, Ед/л	180 (136–202)
Бета-2 микроглобулин, мг/л	4,12 (2,58–6,01)
Альбумин, г/л	37,2 (34,0–40,1)
М-компонент, г/л	28,7 (6,65–41,4)
СКФ по формуле MDRD, мл/мин на 1,73 м ²	76,3 (54,3–90)
Плазматические клетки (ПК) (миелограмма), %	32,6 (16,5–54,5)
Плазматические клетки (трепанобиопсия), %	30 (17,2–60,0)
Плазматические клетки (ИФТ), %	15,8 (3,9– 31,0)
Соотношение kappa/lambda	4,5 (0,6–79,5)
Инструментальные исследования	
Метаболическая активность по ПЭТ-КТ	31 (70,45%)
Плазмоцитомы	20 (45,5%)
Мягкотканное поражение	11 (25,0%)
Молекулярно-цитогенетические исследования	

Аномалии высокого риска, выявленные по результатам FISH- исследования t(4;14) t(14;20) del17p amp1q	4 (9,0%) 2 (4,5%) 5 (11,4%) 4 (9,0%)
Аномалии стандартного риска, выявленные по результатам FISH- исследование t(11;14) t(6;14)	8 (18,2%) 3 (6,8%)
Цитогенетическое исследование Нормальный кариотип Аберрантный кариотип (сочетание 2-х аномалий не из группы высокого риска) Double Hit (2 аномалии высокого риска) Комплексный кариотип Не получены митозы	33 (75%) 1 (2,3%) 2 (4,5%) 3 (6,8%) 5 (11,4%)
Стадирование	
ISS I стадия II стадия III стадия	13 (29,6%) 15 (33,3%,) 16 (37,1%)
Стадия по Durie Salmon I сстадия II стадия	1 (2,3 %) 10 (22,7 %)

III стадия	33 (75,0 %)
Стадия по mSMART3.0	
Группа стандартного риска	29 (65,9%)
Группа высокого риска	15 (34,1%)

Медиана времени наблюдения (с момента постановки диагноза до начала терапии 1 линии) составила 1,8 (1,4-3,7) месяца. Кандидатами для проведения высокодозной химиотерапии были 63,6% (n=28) пациентов. В качестве режима терапии 1-й линии проведены курсы терапии по протоколам CVD (циклофосфамид, бортезомиб, дексаметазон) – 47,7% (n =21), даратумумаб-содержащие режимы – 13,6 % (n=6), VD (бортезомиб, дексаметазон) – 18,2% (n=8), VMP (бортезомиб, мелфалан, дексаметазон) – 9,1% (n=4), PAD (бортезомиб, доксорубин, дексаметазон) – 4,4% (n=2). Большинство пациентов после проведения 1-й линии терапии достигли частичного ответа – 51,6% (n=23) (частота объективного ответа составила 79,3%), рецидив после проведенного лечения отмечался у 27,3% (n=12) пациентов, прогрессирование – у 34,8% (n=15). В качестве терапии 2 линии у большинства пациентов использовались леналидомид-содержащие (25,0%, n=11) и даратумумаб-содержащие (22,7%, n=10) программы. Характеристика проведенных линий терапии представлена в таблице 3.

Таблица 3.

Характеристика проведенной терапии (n=44)

Режим терапии	Терапия 1 линии	Терапия 2 линии	Терапия 3 линии	Терапия 4 линии	Терапия 5 линии
Леналидомид- содержащие программы	1	11	2	2	2
Даратумумаб- содержащие программы	6	10	8	2	
EloPomD ¹			1	1	
EloVD ²		1			
IsaKD ³		1			
IxaPomD ⁴			1		2
IxaCD ⁵		1			
CVD ⁶	21	3	1		
KD ⁷		1		1	
KRD-PACE ⁸				1	
MOCCA ⁹					1
PAD ¹⁰	2				
PomVD ¹¹			1		
VD ¹²	8	1	1		
VD-PACE ¹³	1	1	1	2	1
VMP ¹⁴	4				
Вемурафемиб					1
Другие варианты	1	14	27	35	37

Примечание. EloRomD¹ – элотузумаб, помалидомид, дексаметазон; EloVD² – элотузумаб, бортезомиб, дексаметазон; IsaKD³ – изатуксимаб, карфилзомиб, дексаметазон; IxaRomD⁴ – изатуксимаб, помалидомид, дексаметазон; IxaCD⁵ – изатуксимаб, циклофосфамид, дексаметазон; CVD⁶ – циклофосфамид, бортезомиб, дексаметазон; KD⁷ – карфилзомиб, дексаметазон; KRD-PACE⁸ – карфилзомиб, леналидомид, дексаметазон; МОССА⁹ – мелфалан, винкристин, циклофосфамид, ломустин, метилпреднизолон; PAD¹⁰ – бортезомиб, доксорубицин, дексаметазон; RomVD¹¹ – помалидомид, бортезомиб, дексаметазон; VD¹² – бортезомиб, дексаметазон; VD-PACE¹³ – бортезомиб, дексаметазон; VMP¹⁴ – бортезомиб, мелфалан, преднизолон.

В нашем исследовании преобладали пациенты с нормальным кариотипом 75% (n=33), аномалии высокого цитогенетического риска были выявлены у 13,6% (n=6) больных. Среди данной группы пациентов преобладали больные с del17p14 – 11,4% (n=5), t(4;14) – 9% (n=4), amp1q – 9% (n=4).

Согласно литературным данным, делеция локуса гена 17p13/*TP53* (del17p13/*TP53*) у первичных больных ММ составляет 7-13%, однако при развитии рецидива достигает 70%. В работе Hager К. с соавторами описаны неканонические свойства гена *TP53*, среди которых влияние на клеточный метаболизм, аутофагию и некроз. Этот факт указывает на то, что подавляющие рост опухоли эффекты *TP53* выходят за пределы его способности останавливать клеточный цикл или обуславливать запрограммированную гибель клеток [10]. Del17p13/*TP53* при ММ ассоциируется с крайне низкими показателями ОВ и частотой достижения полных ремиссий. Более того, del17p13/*TP53* связана с резистентностью к химиотерапии и ранним возникновением экстрамедуллярных очагов [11].

Частота выявления t(4;14)(p16.3;q32) среди пациентов с ММ составляет 10-15%. Результатом этой генетической аномалии является дисрегуляция двух потенциальных онкогенов – *MMSET* (multiple myeloma SET domain, *MMSET*) и рецептора фактора роста фибробластов-3 (fibroblast growth factor receptor 3,

FGFR3). У 100% пациентов с ММ было верифицировано нарушение регуляции гена *MMSET* и у 70% больных гиперэкспрессия *FGFR3*. Протеины, кодируемые этими генами, не экспрессируются нормальными ПК [12]. *MMSET* относится к семейству генов, обладающих гистонметилтрансферазной активностью. Данный ген стимулирует клональный рост плазматических клеток и способствует их адгезии. Также следует отметить, что и *FGFR3*, и *MMSET* способствуют активации *CCND2*, однако механизм активации последнего окончательно не определен [13,14].

Структурные аномалии хромосомы 1 являются наиболее распространенными при ММ. Taniwaki M. с соавторами, а затем и Shaughnessy J. показали, что короткое плечо хромосомы 1 (1p) преимущественно вовлекается в делеции, тогда как длинное плечо (1q), как правило, амплифицируется [15]. По данным разных авторов частота встречаемости амплификации 1q21 (*amp1q21*) варьирует в пределах 21-40% при впервые диагностированной ММ, в прогрессии заболевания частота выявления амплификации возрастает до 70%. В регионе 1q21 находится большое количество генов, однако наиболее вероятным кандидатным геном, участвующим в патогенезе ММ, является ген *CKS1B* (CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B). Белок *CKS1B* относится к группе малых протеинов (9-18 kDa), которые взаимодействуют с циклин-зависимыми киназами (Cyclin-dependent kinases, Cdk), играющими важную роль в регуляции клеточного цикла. *CKS1B* взаимодействует с циклин-зависимым комплексом p27kip1-Cdk/cyclin, который индуцирует формирование убиквитин-зависимого комплекса p27kip1-SCF [16]. Деграция p27Kip1 является важным шагом в развитии опухолевого процесса, так как в норме p27Kip1 является опухолевым супрессором. Увеличение копий 1q21 приводит к гиперэкспрессии гена *CKS1B* [17]. По данным литературы, гиперэкспрессия гена *CKS1B* ассоциируется с плохим прогнозом при различных онкологических заболеваниях, в том числе и ММ. Chang H. с соавторами показали, что медиана ОВ у больных с гиперэкспрессией *CKS1B* и без неё составила 44,5 месяцев и 89,3 месяца, соответственно ($p < 0,0001$) [18].

При проведении NGS было выявлено 500 мутаций; 2,0% мутаций (n=10) - вероятно патогенные, 1,2% мутаций генов (n=6) - патогенные, большинство выявленных мутаций были с неизвестным клиническим значением 66.4% (n=332). Наибольшая частота мутаций отмечалась в генах: *KMT2C* – 50 %, *KMT2D* – 50 %, *CREBBP* – 31 %, *NOTCH2* – 31 %, *GNAS* – 23 %, *FAT1*, *ITPKB* и *KDR* – по 19 %, *ATM* – 15 %, *ARID1A* – 12 %. Мутационный ландшафт исследованной популяции генов представлен на рисунке 1.

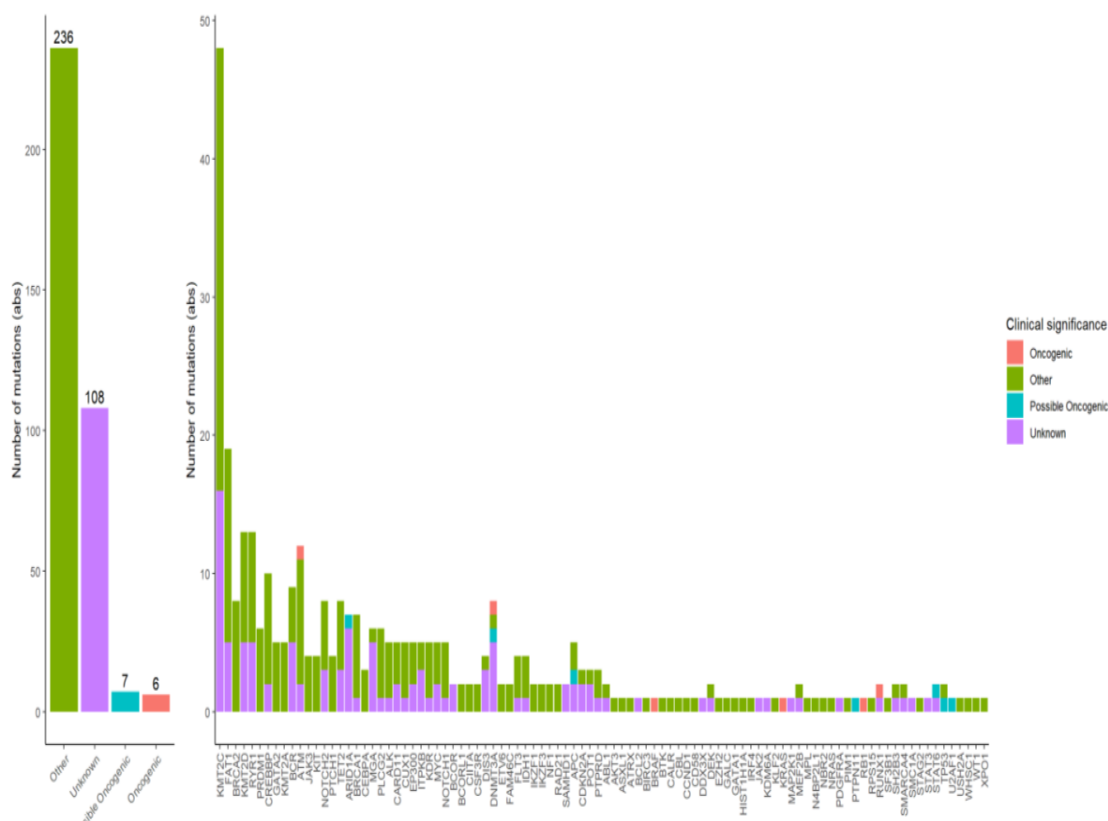


Рисунок 1. Мутационный ландшафт исследованной популяции (n=44)

В группе пациентов, погибших в первые три года наблюдения (n=10), наиболее часто встречались мутации генов *KMT2C*– 40%, *ATM* – 30%, *NRAS* – 20%, *KMT2D*–20%, *EZH2*– 20% (рисунок 2). Примечательно, большинство из перечисленных генов участвуют в модификации гистонов (*EZH2*, *KMT2C*, *KMT2D*– метилирование гистонов) и формировании апоптотического ответа на повреждение ДНК (*ATM*). Также согласно имеющимся данным именно мутации генов *RAS*, нарушение MAPK- и NFkB- клеточных сигнальных путей играют центральную роль в развитии ММ. Таким образом, именно совокупность

мутаций приводит к нарушениям сразу в нескольких внутриклеточных процессах, опосредуя более сложные молекулярные и генетические трансформации при ММ. Следует также подчеркнуть, что в данной группе больных ни у одного пациента не были выявлены часто встречающиеся мутации, такие как в генах *TP53*, *KRAS*, *BRAF*, *DNMT3A*, *RB1*.

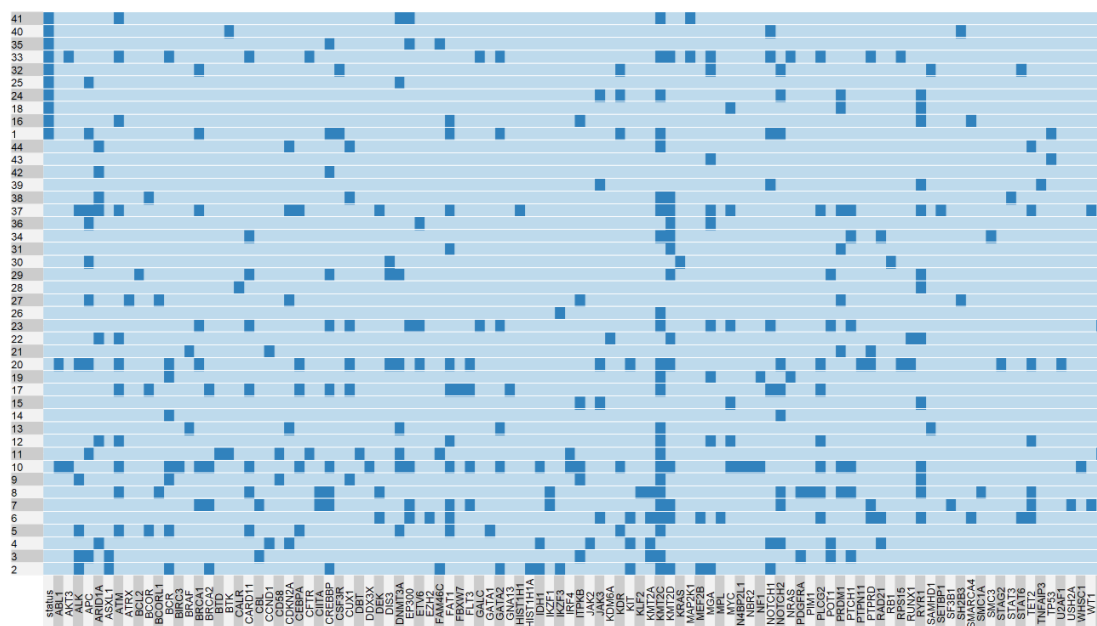


Рисунок 2. Тепловая карта мутаций относительно выживаемости

Было установлено, что наличие патогенных мутаций является неблагоприятным прогностическим параметром: 1-летняя (медиана наблюдения 12,9 месяцев) БСВ у пациентов с патогенными мутациями составила 66,7% (95% ДИ 42,0–100,0), 2-летняя БСВ у больных без патогенных мутаций – 88,2% (95% ДИ 76,3–100,0), $p = 0,078$ (рисунок 3).

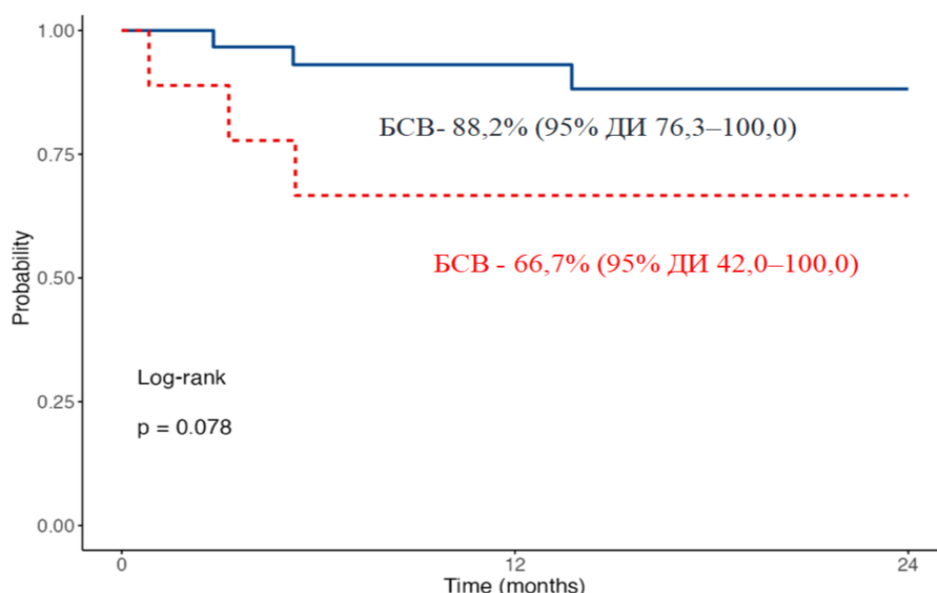


Рисунок 3. Однолетняя ОВ пациентов с ММ в зависимости от патогенных мутаций (красный – наличие патогенных мутаций, синий – отсутствие патогенных мутаций)

Среди всех выявленных мутаций, неблагоприятное влияние на течение ММ оказывали мутации в генах *FAT1*, *NRAS* и *ATM*. При анализе выживаемости 3-летняя ОВ у пациентов с мутацией *FAT1* составила 37.5% (95% ДИ 8,4–100,0), в группе дикого типа – 77,6% (61,6–97,7), $p = 0,0039$ (рисунок 4).

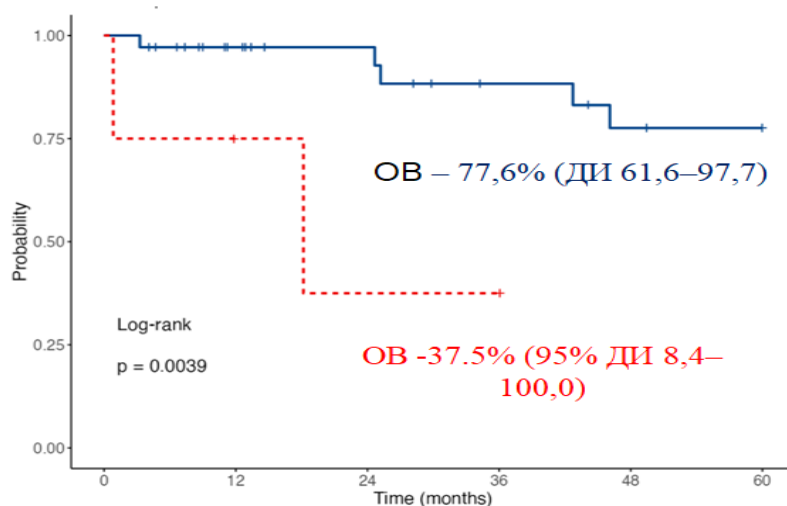


Рисунок 4. Трехлетняя ОВ пациентов с ММ в зависимости от

Примечание. *FAT1*(красный – *FAT1* мутирован, синий – *FAT1* не мутирован)

У пациентов с мутацией гена *NRAS* 3-летняя ОВ составила 50,0% (95% ДИ 12,5–100), в группе дикого типа – 74,8%, $p = 0,0043$ (рисунок 5).

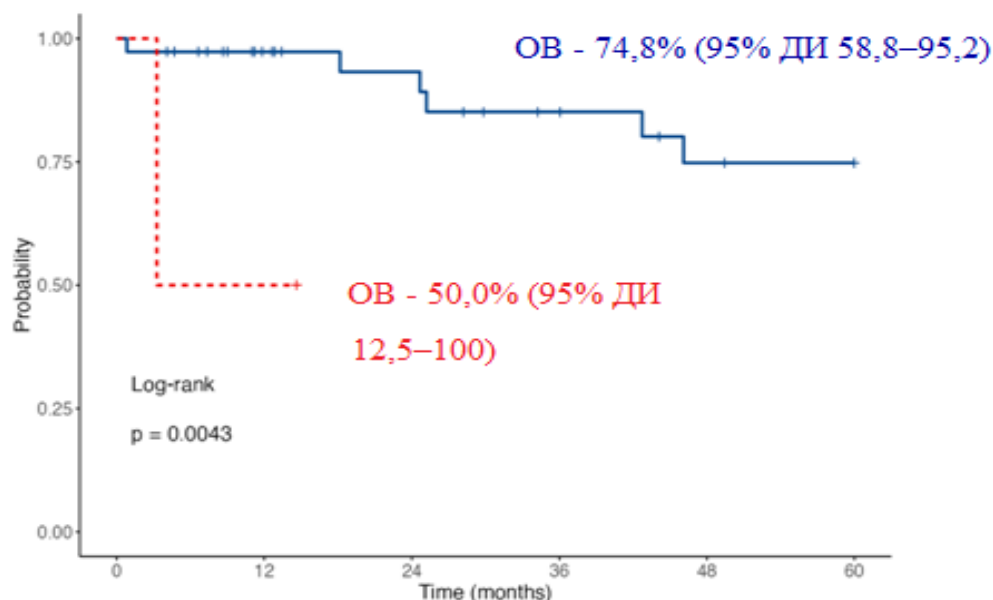


Рисунок 5. Трехлетняя ОВ пациентов с ММ в зависимости от *NRAS*.

(красный – *NRAS* мутирован, синий – *NRAS* не мутирован)

А для пациентов с мутацией гена *ATM* 5-летняя ОВ - 33,6% (95% ДИ 6,7–100,0) и была значимо ниже, чем в группе дикого типа – 76,9%, $p < 0,0001$ (рисунок 6).

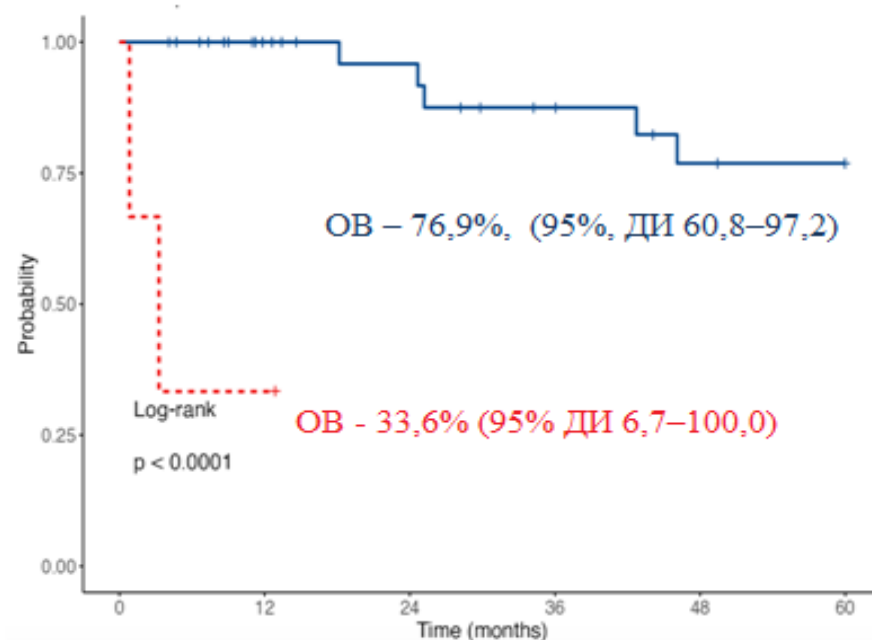


Рисунок 6. Пятилетняя ОВ пациентов с ММ в зависимости от *ATM*.

Примечание. (красный – *ATM* мутирован, синий – *ATM* не мутирован)

Медиана VAF составила 45,91% (10,0–50,38), медиана TMB – 5,0 мутаций/Мб. Проведенный анализ в отношении 2-летней БСВ в зависимости от величины TMB (≤ 5 мутаций/Мб и > 5 мутаций/Мб) продемонстрировал достоверные различия в группах: у пациентов с высокой TMB (≤ 5) 2-летняя БСВ составила 69,6% (95% ДИ 50,3–96,5), у больных с низкой TMB (> 5) – 95,0% (95% ДИ 85,9–100), $p = 0,046$ (рисунок 7). С другой стороны, при проведении анализа БСВ для количественных переменных (в нашем случае значение TMB для каждого пациента) точка отсечения составила 6,63 мутации/Мб, которая также продемонстрировала прогностическую значимость TMB у пациентов с ММ. Трехлетняя БСВ в группе с высокой TMB ($\geq 6,63$) составила 42,8% (95% ДИ:22,6–81,0), у пациентов с низкой TMB ($< 6,63$) – 76,7%, (95% ДИ:22,6–81,0), $p = 0,041$.

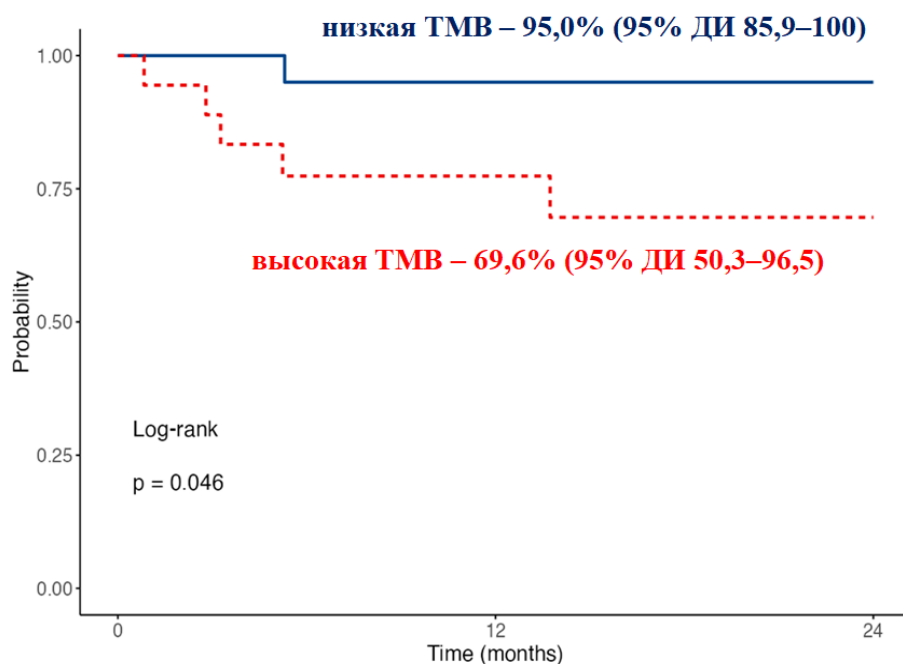


Рисунок 7. Двухлетняя БСВ пациентов с ММ в зависимости от TMB

Обсуждение. В нашей работе не выявлено каких-либо серьезных отклонений касательно мутационного ландшафта и частоты распределения мутаций у пациентов с ММ относительно ранее опубликованных данных. На основании результатов трех крупных исследований последних лет с использованием методики NGS было идентифицировано 15 наиболее часто встречающихся соматических мутаций у пациентов с ММ (таблица 5). Эти и

другие исследования показали, что путь митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), который включает в себя гены *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, является наиболее часто мутировавшим сигнальным путем при ММ. Мутации, влияющие на сигнальный путь ядерного фактора κB (*NF- κB*), регуляция которых часто нарушена при В-лимфоидных злокачественных новообразованиях, также распространены при ММ [5].

Таблица 5.

Прогностическое значение мутаций

Сигнальный путь	% пациентов с нарушением регуляции сигнального пути	Ген	Частота (%)	Интерпретация прогностического фактора
МАРК	40%	<i>KRAS</i>	23	Промежуточный
		<i>BRAF</i>	20	
		<i>NRAS</i>	8	
<i>NF-κB</i>	20%	<i>TRAF</i>	3	Промежуточный
		<i>CYLD</i>	2	
		<i>LTB</i>	3	
Репарация ДНК	10%	<i>TP53</i>	9	Негативный
		<i>ATM</i>	3	
		<i>ATR</i>	1	
Метаболизм РНК	15%	<i>FAM463</i>	9	Промежуточный
		<i>DIS3</i>	7	
Дифференцировка плазматических клеток	10%	<i>IRF4</i>	3	Благоприятный
		<i>EGR1</i>	5	

Так, согласно данным исследований мутации процессов репарации ДНК (*TP53*, *ATM*, *ATR* и *ZNFHX4*) связаны с плохим прогнозом [7]. Мы показали, что мутации в гене *ATM* сопряжены с худшим прогнозом. При анализе ОБ для пациентов с мутацией гена *ATM* 5-летняя ОБ составила 33,6% (95% ДИ 6,7–100,0) и была значительно ниже, чем в группе дикого типа – 76,9%, $p < 0,0001$.

Существуют некоторые расхождения в отношении влияния мутаций *NRAS* и *KRAS* на исход заболевания. В то время как более ранние работы, изучающие влияние мутаций семейства *RAS* (*NRAS* и *KRAS*) на БСВ и ОБ при ММ, предполагали отрицательную прогностическую значимость мутаций *KRAS*, недавнее исследование небольшой группы пациентов показало, что мутации в гене *NRAS* скорее можно рассматривать как благоприятный прогностический биомаркер. В этих исследованиях, очевидно, есть несколько ограничений, в том числе малое количество участников, смешанные группы пациентов, отсутствие длительного периода наблюдения. Примечательно, что именно мутации генов *KRAS* и *NRAS* являются наиболее распространенными при ММ и первыми проявляются при моноклональной гаммапатии неясного значения. Также представляются интересными результаты исследования группы исследователей из Онкологического центра MDACC, где было показано, что активированная передача сигналов МАРК-пути может повышать активность протеасом в неопластических плазматических клетках, тем самым усиливая резистентность к лечению ингибиторами протеинкиназы. В другой недавней публикации было описано активирующее взаимодействие между мутировавшими *KRAS* и *NRAS* и сигнальным путём мишени рапамицина у млекопитающих (MTOR) при ММ. Таким образом, добавление ингибиторов MTOR к схемам на основе ингибиторов протеинкиназы может быть ещё одним возможным вариантом преодоления резистентности к стандартным тройным комбинациям при ММ [7].

В нашем исследовании представлена популяция пациентов, получавших стандартные схемы терапии, мутация в гене *NRAS* была ассоциирована с отрицательным влиянием на ОБ: в группе больных с мутацией гена *NRAS3-*

летняя ОВ составила 50,0% (95% ДИ 12,5–100), в группе дикого типа – 74,8%, $p = 0,0043$.

Атипичный кадгерин 1 (*FAT1*) — один из наиболее часто мутирующих генов при многих видах рака. Наибольшая частота мутаций наблюдается при плоскоклеточной карциноме головы и шеи, при которой *FAT1* является вторым по частоте мутирующим геном. При многих видах рака потеря функции *FAT1* способствует эпителиально-мезенхимальному переходу и образованию мезенхимальных стволовых клеток. На сегодняшний день роль *FAT1* в патогенезе ММ недостаточно изучена [8]. По результатам нашего исследования было установлено негативное влияние данной мутации на прогноз течения заболевания пациентов. Так при анализе выживаемости 3-летняя ОВ у пациентов с мутацией *FAT1* составила 37,5% (95% ДИ 8,4–100,0), в группе дикого типа – 77,6% (61,6–97,7), $p = 0,0039$.

С введением NGS в клиническую практику появилась необходимость в поиске стандартизированного показателя, определяющего прогностическую значимость не отдельных мутаций, а целой совокупности мутированных генов, возникающих при канцерогенезе и некоторых других заболеваниях [19]. Таким показателем является мутационная опухолевая нагрузка. Мутационная нагрузка — это мера измерения, определяющая число мутаций на единицу генома, измеряемую в мегабазах, содержащуюся в опухолевых клетках. 10 лет назад впервые у пациентов с немелкоклеточным раком легкого было показано, что высокая мутационная нагрузка является значимым фактором, влияющим на эффективность терапии ингибиторами иммунных контрольных точек: пациенты с высокой мутационной нагрузкой лучше отвечали на специфическую терапию в сравнении с пациентами с низкой ТМВ [9]. В нашем исследовании оценка ТМВ проводилась в расчете на длину кодирующей последовательности исследуемых генов. Мы использовали панель из 118 генов, мутации которых высокоспецифичны для лимфопролиферативных новообразований. Длина всех экзонов исследуемых генов равнялась 602917 пар оснований или 0,603 мегабаз (Mb). Медиана ТМВ составила 5,0 мутаций/Mb. В нашем исследовании показано

что высокая опухолевая мутационная нагрузка является значимым негативным прогностическим фактором у пациентов с ММ. При анализе выживаемости в группе с высокой ТМВ трехлетняя БСВ ($\geq 6,63$) составила 42,8% (95% ДИ:22,6–81,0), у пациентов с низкой ТМВ ($< 6,63$) – 76,7% (95% ДИ:22,6–81,0), $p = 0,041$. Однако следует отметить, что наше исследование имеет несколько ограничений. Во-первых, это малый размер выборки ($n = 44$), во-вторых – использование таргетной панели, содержащей всего 118 генов вместо полногеномного секвенирования. Применение таргетных панелей может не отражать реальную мутационную нагрузку, так как в анализ включаются гены, мутации в которых будут характерны для конкретной нозологии.

Заключение. За последние 20 лет отмечено значительное расширение арсенала диагностических методов и внедрение инновационных подходов к анализу генома и транскриптома опухолевых клеток. Исследования нового уровня все точнее раскрывают сложный патогенез ММ, в частности, принципиальную связь между генетикой, эпигенетикой, абберрантными сигнальными путями, механизмами метаболизма клетки и микроокружением. Полное понимание генетического профиля делает возможным поиск новых таргетных препаратов и алгоритмов персонализированного лечения. ММ является динамичным заболеванием, как в генетическом аспекте, так и в вопросах меняющихся подходов по оценке прогноза и выбору лечения согласно биологической эволюции опухоли.

Продемонстрированные в настоящей работе результаты, утверждают, что опухолевая мутационная нагрузка как унифицированный маркер, отражающий мутационный профиль опухоли, является статистически значимым прогностическим фактором у пациентов с ММ. Было установлено, что наличие хотя бы одной патогенной мутации ухудшает прогноз пациентов с ММ. В исследовании показано, что ряд отдельных мутаций (*NRAS*, *FAT1* и *ATM*) оказали значимое влияние на патогенез ММ, приводя к дисрегуляции сигнального пути МАРК. Кроме того, указанные мутации опосредовали нарушения репарации ДНК и процессы клеточного метаболизма. Было установлено негативное

влияние перечисленных мутаций на выживаемость пациентов с множественной миеломой. Результаты нашего исследования выглядят особенно актуальными в контексте растущего числа разрабатываемых терапевтических ингибиторов сигнального пути MAPK (ингибиторы *BRAF* и *MEK*), которые могут быть добавлены к основным препаратам противомиеломной терапии.

Список литературы

1. Treon S., Xu L., Yang G. et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012; 367(9): 826–833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200710>.
2. Bolli N., Biancon G., Moarii M. et al. Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia*. 2018; 32(12): 2604–2616. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0037-9>.
3. Raab M., Lehnert N., Xu J. et al. Spatially divergent clonal evolution in multiple myeloma: overcoming resistance to BRAF inhibition. *Blood*. 2016; 127(17): 2155–2157. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-686782>.
4. Паива Б., Видриалес М., Алмейда Х. и др. Оценка эффекта лечения при множественной миеломе: клиническое значение мониторинга МОЗ. *Иммунология гемопоэза*. 2012; 10(1): 34–77.
5. Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Ругаль В.И. Биология ниши гемопоэтических стволовых клеток. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2014; 7(4): 501–510.
6. Perroud C., Thurian D., Andres M. et al. Effect of MAPK activation via mutations in NRAS, KRAS and BRAF on clinical outcome in newly diagnosed multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2023; 41(5): 912-921. <https://doi.org/10.1002/hon.3208>.
7. Jelinek T., Zihala D., Sevcikova T. et al. Beyond the marrow: insights from comprehensive next-generation sequencing of extramedullary multiple myeloma tumors. *Leukemia*. 2024; 38(6): 1323-1333. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02206-w>.

8. Morawska M., Kielbus M., Paziewska M. et al. Mutations of ARID1B, PIK3C2B, KMT2B, and FAT1 genes influence clinical outcome in newly diagnosed myeloma. *Cancer Genet.* 2024; 118(125): 288-289. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen>.
9. Rizvi N., Hellmann M., Snyder A. et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015; 348(6230):124–128. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>.
10. Соловьев М.В., Менделеева Л.П., Алексеева А.Н. и др. Эффективность терапии множественной миеломы в России (результаты многоцентрового проспективного исследования). *Гематология и трансфузиология.* 2020; 65(1): 103–104.
11. Jimenez-Zepeda V. H., Neme-Yunes Y., Braggio E. Chromosome abnormalities defined by conventional cytogenetics in plasma cell leukemia: What have we learned about its biology? *Eur. J. Haematol.* 2011; 87(1): 20-27.
12. Chesi M., Nardini E., Lim R. S. et al. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood.* 1998; 92(9): 3025-3034.
13. Bergsagel P., Kuehl W., Zhan F. et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood.* 2005; 106(1): 296-303.
14. Brito J., Walker B., Jenner M. et al. MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica.* 2009; 94(1): 78-86.
15. Shaughnessy J., Zhan F., B. Burington B. et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood.* 2007; 15: 2276-2284.
16. Denicourt C., Saenz C., B. Datnow B. et al. Relocalized p27Kip1 Tumor Suppressor Functions as a Cytoplasmic Metastatic Oncogene in Melanoma. *Cancer Res.* 2007; 67(19): 9238-9243.
17. Zhang Y. CKS1B (CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B). *Atlas Genet Cytogenet Oncol. Haematol.* 2011; 14(7): 676-678.

18. Chang H., Jiang N., Jiang H. et al. CKS1B nuclear expression is inversely correlated with p27Kip1 expression and is predictive of an adverse survival in patients with multiple myeloma. *Hematologica*. 2010; 95(9): 1542-1547.
19. Каргин В.Д., Солдатенков В.Е., Капустин С.И. и др. Генетические маркеры и биохимическая характеристика коморбидности у больных гемофилией, ассоциированные с оксидативным стрессом. *Medline.ru*. 2017; 18(22): 362-381.

References

1. Treon S., Xu L., Yang G. et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012; 367(9):826–833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200710>.
2. Bolli N, Biancon G, Moarii M. et al. Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia*. 2018; 32(12):2604–2616. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0037-9>.
3. Raab M., Lehnert N., Xu J. et al. Spatially divergent clonal evolution in multiple myeloma: overcoming resistance to BRAF inhibition. *Blood*. 2016; 127(17): 2155–2157. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-686782>.
4. Paiva B., Vidriales M., Almeida J. et al. Treatment response assessment in multiple myeloma: clinical significance of MRD monitoring. *Immunologiya gemopoeza*. 2012; 10(1):34–77. (In Russian)
5. Semenova N.Ju., Bessmeltsev S.S., Rugal' V. I. Biologiya nishi gemopojeticheskikh stvolovyh kletok. *Klinicheskaja onkogematologija. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaja praktika*. — 2014. — T. 7, № 4. — S. 501–510. (In Russian)
6. Perroud C., Thurian D., Andres M. et al. Effect of MAPK activation via mutations in NRAS, KRAS and BRAF on clinical outcome in newly diagnosed multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2023; 41(5): 912-921. <https://doi.org/10.1002/hon.3208>.
7. Jelinek T., Zihala D., Sevcikova T. et al. Beyond the marrow: insights from comprehensive next-generation sequencing of extramedullary multiple myeloma tumors. *Leukemia*. 2024; 38(6): 1323-1333. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02206-w>.

8. Morawska M., Kielbus M., Paziewska M. et al. Mutations of ARID1B, PIK3C2B, KMT2B, and FAT1 genes influence clinical outcome in newly diagnosed myeloma. *Cancer Genet.* 2024; 118(125): 288-289. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen>.
9. Rizvi N.A., Hellmann M.D., Snyder A. et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015; 348(6230):124–128. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1348>.
10. Solov'ev M.V., Mendeleeva L.P., Alekseeva A.N. i dr. Jefferktivnost' terapii mnozhestvennoj mielomy v Rossii (rezul'taty mnogocentrovogo prospektivnogo issledovanija). *Gematologija i transfuziologija.* 2020; 65(1):103–4.
11. Jimenez-Zepeda V., Neme-Yunes Y., Braggio E. Chromosome abnormalities defined by conventional cytogenetics in plasma cell leukemia: What have we learned about its biology? *Eur. J. Haematol.* 2011; 87(1): 20-27.
12. Chesi M., Nardini E., Lim R. et al. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood.* 1998; 92(9): 3025-3034.
13. Bergsagel P., Kuehl W., Zhan F. et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood.* 2005; 106(1): 296-303.
14. Brito J., Walker B., Jenner M. et al. MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica.* 2009; 94(1): 78-86.
15. Shaughnessy J., Zhan F., B. Burington B. et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood.* 2007; 15: 2276-2284.
16. Denicourt C., Saenz C., Datnow B. et al. Relocalized p27Kip1 Tumor Suppressor Functions as a Cytoplasmic Metastatic Oncogene in Melanoma. *Cancer Res.* 2007; 67(19): 9238-9243.
17. Zhang Y. CKS1B (CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B). *Atlas Genet Cytogenet Oncol. Haematol.* 2011; 14(7): 676-678.

18. Chang H., Jiang N., Jiang H. et al. CKS1B nuclear expression is inversely correlated with p27Kip1 expression and is predictive of an adverse survival in patients with multiple myeloma. *Hematologica*. 2010; 95(9): 1542-1547.
19. Kargin V.D., Soldatenkov V.E., Kapustin S.I. et.al. Genetic markers and biochemical characteristics of comorbidity in patients with hemophilia associated with oxidative stress. *Medline.ru*. 2017; 18(22): 362-381 (In Russian).