

СРАВНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ДО ЛЕЧЕНИЯ И ПОСЛЕ КОНСТАТАЦИИ РЕЦИДИВА МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ (КРАТКИЙ ОБЗОР И ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ)

Сергеева А. М.^{1,*}, Абрамова Т. В.¹, Сурин В. Л.¹, Обухова Т. Н.¹, Довыденко М. В.¹, Сунцова М. В.^{2,3}, Буздин А. А.^{3,4}, Менделеева Л. П.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, 117198, Москва, Россия

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Множественная миелома (ММ) является лимфопролиферативным заболеванием, длительность ремиссии которого сложно прогнозировать.

Цель работы: проанализировать молекулярно-генетический статус опухоли у больного с коротким периодом ремиссии в дебюте и рецидиве ММ и сопоставить с клиническим течением заболевания.

Материалы и методы. Соматические мутации определяли методом секвенирования по Сэнгеру. Уровень экспрессии генов анализировали с помощью секвенирования РНК на платформе Illumina. Для изучения хромосомных перестроек проводили флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH-исследование).

Результаты. До начала лечения и в рецидиве заболевания у больного выявлена гетерозиготная клональная мутация с.182А>С (р.Q61P) в гене *N-RAS*, нарушающая регуляцию сигнального пути MAPK. Транскриптомный анализ, выполненный методом RNA-seq, показал резкое усиление экспрессии гена *Il6* при рецидиве (в 30 раз), которое могло послужить пусковым механизмом прогрессии множественной миеломы, поскольку этот цитокин стимулирует клеточную пролиферацию, активируя различные сигнальные пути (MAPK, JAK-STAT, PI3K). Прогрессия заболевания сопровождалась также усилением экспрессии ключевых регуляторных генов (*c-MYC*, *Notch2*, *MDM*, *RAF1*, *STAT4*, *mTOR*) и резким уменьшением экспрессии генов иммуноглобулинов, вызвавшим у больного глубокий иммунодефицит. При молекулярно-цитогенетическом исследовании (FISH) в дебюте заболевания была выявлена трисомия по хромосомам 5, 9, и 15. Рецидив заболевания сопровождался амплификацией локуса 1q21 при сохранении гипердиплоидии.

Заключение. Для прогноза длительности периода ремиссии необходимо проводить комплексный молекулярно-генетический скрининг.

Ключевые слова: множественная миелома, соматические мутации, экспрессия генов, цитогенетика

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Сергеева А.М., Абрамова Т.В., Сурин В.Л., Обухова Т.Н., Довыденко М.В., Сунцова М.В., Буздин А.А., Менделеева Л.П. Сравнение молекулярно-генетической структуры опухолевых клеток до лечения и после констатации рецидива множественной миеломы (краткий обзор и описание клинического случая). Гематология и трансфузиология. 2019; 64(3):362–374. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-3-362-374>

MOLECULAR GENETIC STRUCTURE OF MULTIPLE MYELOMA TUMOUR CELLS PRIOR TO TREATMENT AND AT THE TIME OF RELAPSE: SHORT REVIEW AND CASE REPORT

Sergeeva A. M.^{1,*} Abramova T. V.¹, Surin V. L.¹, Obukhova T. N.¹, Dovydenko M. V.¹, Suntsova M. V.^{2,3}, Buzdin A. A.^{3,4}, Mendeleeva L. P.¹

¹ National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

² Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, 117198, Moscow, Russian Federation

³ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 117997, Moscow, Russian Federation

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Multiple myeloma (MM) is a lymphoproliferative disorder, for which the duration of remission is hard to predict.

Aim. To analyse the molecular genetic status of the tumour of MM patient with a short remission period at the onset and relapse of the disease, as well as to conduct its comparison with the clinical course of the disease.

Materials and methods. Somatic mutations were detected through Sanger sequencing. The level of gene expression was analysed using RNA sequencing on the Illumina platform. In order to study chromosomal rearrangements, the authors performed fluorescence hybridisation in situ (FISH study).

Results. Prior to the treatment and during the relapse of the disease, the patient revealed a heterozygous clonal mutation p.182A>C (p.Q61P) in the *N-RAS* gene, which is known to hamper regulation of the MAPK signalling pathway. The transcriptome analysis performed using the RNA-seq method revealed a sharp increase in the expression of the *IL6* gene during relapse (by 30 times), which could have served as a trigger for the progression of multiple myeloma, given that this cytokine stimulates cell proliferation by activating various signalling pathways (MAPK, JAK- STAT, PI3K). The progression of the disease was also accompanied by an increased expression of key regulatory genes (*c-MYC*, *Notch2*, *MDM*, *RAF1*, *STAT4*, *mTOR*) and a sharp decrease in the expression of immunoglobulin genes, which caused deep immunodeficiency in the patient. A molecular cytogenetic study (FISH) revealed trisomy of chromosomes 5, 9 and 15 at the onset of the disease. Disease relapse occurred with the amplification of the 1q21 locus, with hyperdiploidy being preserved.

Conclusion. In order to predict the duration of the remission period, a complex molecular genetic screening is required.

Keywords: multiple myeloma, MM, somatic mutation, gene expression, cytogenetics

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Sergeeva A.M., Abramova T.V., Surin V.L., Obukhova T.N., Dovydenko M.V., Suntsova M.V., Buzdin A.A., Mendeleeva L.P. Molecular genetic structure of multiple myeloma tumour cells prior to treatment and at the time of relapse: Short review and case report. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2019; 64(3):362–374 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-3-362-374>

Введение

Множественная миелома (ММ) относится к злокачественным заболеваниям системы крови с клональной пролиферацией плазматических клеток. Патогенез ММ представляет собой многоступенчатый процесс трансформации генетического материала клетки, который изучен лишь частично [1]. Молекулярно-ци-

тогенетическое исследование клеток костного мозга у больных ММ является рутинным методом обследования, по результатам которого проводится стратификация больных на группы риска и стадирование ММ. При цитогенетическом исследовании определяются: транслокации с вовлечением локуса генов IGH

14-й хромосомы, наличие трисомий по целому ряду нечетных хромосом, делеция короткого плеча 17-й хромосомы, моносомия или делеция длинного плеча 13-й хромосомы (*del13q*) и амплификация локуса *1q21* (*amp1q21*) [2]. Наряду с этим для тестирования точечных мутаций в генах, ассоциированных с развитием ММ, широко используется метод секвенирования по Сэнгеру, позволяющий получать надежные результаты при анализе последовательности ДНК на предмет единичных нуклеотидных замен, микроделений и микроинсерций коротких участков длиной от одного нуклеотида до нескольких десятков оснований. Однако этот метод пригоден только для анализа мутаций, носящих клональный характер или присутствующих в субклонах, составляющих не менее 10 % от общей опухолевой массы. Исследования с использованием современных методов секвенирования показали высокую гетерогенность различных генетических нарушений при ММ [3, 4].

По данным, полученным на большой выборке больных с использованием секвенирования полного экзона (*whole exome sequencing*, WES), наиболее часто встречающимися нарушениями у больных ММ являются точечные мутации в генах сигнального MAPK-пути (*N-RAS*, *K-RAS*, *BRAF*) и онкосупрессора *TP53*, которые суммарно встречаются примерно у половины больных [5].

В патогенезе ММ нарушается регуляция транскрипции целого ряда генов, таких как *C-MYC*, *MMSET* (*NSD2*), *CCND1*, *CCND2*, *CKS1B*, *Notch2*, *IL-6*, *MDM2*. В результате появляется понятие «профиля» экспрессии генов, различные варианты которого могут иметь прогностическое значение, определяя характер течения заболевания и его резистентность к терапии [6].

Гены семейства RAS. Гены семейства *RAS* — наиболее часто мутирующие гены при ММ. В исследовании W. Chng и соавт. [7] частота встречаемости мутаций генов семейства *RAS* составила 23 % (102/561), из них у 74 (17 %) были выявлены мутации в гене *N-RAS*, у 28 (6 %) — в гене *K-RAS*. Большинство мутаций было детектировано в кодоне 61-го гена *N-RAS* (64 из 74). По данным литературы [8], активирующие миссенс-мутации в генах *N-RAS* и *K-RAS* изменяют свойства соответствующих белков и превращают протоонкогены в онкогены. Функциональная нагрузка таких мутаций заключается в том, что белки *RAS* теряют ГТФ-азную активность, вследствие чего нарушается их нормальная регуляция цитокинами в передаче митоген-активирующего сигнала к ядру, что приводит к повышенной пролиферации клеток [8]. Стадия, предшествующая ММ, моноклональная гаммапатия неясного генеза (МГНГ), на молекулярном уровне отличается от ММ отсутствием мутаций в генах семейства *RAS* [9]. Имеющиеся в литературе сведения о роли активирующих мутаций в генах *K-RAS* и *N-RAS* в патогенезе

ММ весьма противоречивы. По одним данным, они считаются фактором неблагоприятного прогноза, ассоциируются с прогрессией заболевания и меньшей общей выживаемостью, по другим — могут влиять только на резистентность к терапии определенными препаратами (например, бортезомибом) [7, 10, 11].

BRAF. Киназа *BRAF* передает сигнал от *RAS* белков к нижестоящим эффекторным белкам сигнального пути MAPK. Частота мутаций в гене *BRAF* при ММ варьирует от 4 до 14,9 % [12]. Чаще всего встречается активирующая мутация в 600-м кодоне с заменой валина на глютаминовую кислоту (V600E). Показано [13], что эта мутация ассоциируется с клинически более агрессивным течением ММ, более низкими показателями общей выживаемости, а также с высокой частотой (>50 %) выявления экстрамедуллярных очагов.

TP53. Опухолевый супрессор *p53* является транскрипционным фактором. Этот белок связывается с промоторами различных генов и может как активировать, так и ингибировать их транскрипцию. Белок *p53* вовлечен в репликацию и репарацию ДНК. Отсутствие гена *TP53* ведет к развитию синдрома Ли — Фраумени, проявляющегося предрасположенностью к отдельным новообразованиям и возникновению первично-множественных опухолей [14]. Известен спектр нарушений, ведущих к дисфункции белка *p53*. Сюда относятся мутации гена *TP53*, метилирование его регуляторных областей, нарушение транспорта белка *p53* в ядро, амплификация ингибитора *p53* белка *mdm2*, связывание с вирусным белком Е6, которое ведет к деградации *p53* [14]. Кроме того, при делеции короткого плеча хромосомы 17 (*p17del*) одна копия гена утрачивается полностью. Инактивация белка *p53* считается универсальным изменением в опухолевой клетке и встречается в 50–60 % новообразований. В основном генные нарушения встречаются в гетерозиготном состоянии, представлены миссенс-мутациями, приводящими к аминокислотным заменам, и затрагивают чаще всего ДНК-связывающий домен. В результате подобных мутаций происходит изменение вторичной структуры белка и появление новых свойств, таких как способность активировать экспрессию некоторых генов, к которым относятся *c-MYC*, *CCND1*, *MRD1*. Усиление экспрессии *MRD1* связано с появлением множественной лекарственной устойчивости у клеток опухоли [15].

c-MYC. Протоонкоген *c-MYC* задействован во многих путях передачи сигналов от рецепторных комплексов на поверхности мембраны клетки. Его экспрессия находится под контролем целого набора транскрипционных регуляторов [16]. Белок *c-myc* вовлечен в большое число внутриклеточных взаимодействий, его повышенная экспрессия ассоциирована с начальными стадиями неопластической трансформации клеток и усилением их пролиферации [17]. В спектр функций *c-myc*

входит регуляция внутриклеточных систем энергообеспечения — гликолиза, метаболизма глутамина и биогенеза митохондрий, которые приводят к аккумуляции энергии для репликации ДНК и деления клетки [18]. Повышенная экспрессия этого белка ассоциируется с геномной нестабильностью, вызываемой стимуляцией митохондрий, которая приводит к наработке активных форм кислорода [19], и в частности может быть связана с появлением транслокаций [20].

MMSET (NSD2). Белок MMSET (multiple myeloma SET domain) является гистонметилтрансферазой и принимает участие в реорганизации хроматина. Его повышенная экспрессия наблюдается на начальных стадиях патогенеза ММ. Транслокация с участием гена *MMSET* t(4;14) является фактором неблагоприятного прогноза. Искусственная репрессия белка MMSET приводит к пониженному темпу пролиферации, индукции апоптоза и клеточной адгезии [21].

CCND1 и CCND2. Высококонсервативные белки из семейства D-циклинов, CCND1 и CCND2, представляют собой регуляторные субъединицы киназ, необходимые для перехода клетки из G1 в S-фазу клеточного цикла. Эти белки взаимодействуют с опухолевым супрессором Rb, и их экспрессия положительно регулируется Rb. Результатом ранних событий в патогенезе множественной миеломы, таких как IGH-транслокации, появление гипердиплоидности и трисомии, является гиперэкспрессия этих циклинов [22].

CKS1B. Увеличение экспрессии гена субъединицы 1B циклинкиназы является фактором неблагоприятного прогноза при ММ. Функция *CKS1B* заключается в активации циклина через его фосфорилирование [23]. Ген расположен на длинном плече 1-й хромосомы, его амплификация регулярно встречается среди генетических нарушений множественной миеломы [24].

Notch2. Белки семейства Notch вовлечены в регуляцию гемопоэза. Отсутствие белков этого семейства ведет к нарушению поздних стадий дифференцировки В-клеток [25]. Нарушение регуляторных механизмов работы рецепторов или их лигандов, входящих в сигнальный путь Notch, исследовано в различных типах злокачественных солидных и гематологических опухолей, в том числе и при ММ. Ингибирование Notch индуцирует апоптоз в клетках опухоли, уменьшает устойчивость к лекарственным препаратам, изменяет характеристики миграции/рециркуляции плазматических клеток и их обновление [26]. Notch может участвовать в прогрессии ММ, увеличивая уровень интерлейкина-6 (IL-6), одного из ключевых факторов, стимулирующих клеточную пролиферацию [27].

Интерлейкин-6. Представляет собой цитокин плеiotропного действия. Он индуцирует дифференцировку и рост разных типов клеток, в том числе дифференцировку нормальных В-клеток в плазматические клетки, производящие антитела. Пролиферативная

активность клеток множественной миеломы зависит от IL-6, осуществляющего ее аутокринную регуляцию [28]. Экспрессия IL-6 ассоциирована с агрессивным течением заболевания, высоким пролиферативным индексом и устойчивостью к лекарственным препаратам, запускающим апоптоз [29]. Повышение активности IL-6 связано с остеодеструкцией — повышенной активностью и пролиферацией остеокластов и снижением количества остеобластов при ММ [30]. Высокий уровень экспрессии IL-6 является фактором плохого прогноза при ММ.

MDM2 (murine double minute 2) — белок ингибитор TP53. Изначально ген этого белка был идентифицирован в экстрахромосомной ДНК, образующейся в раковых клетках. Его взаимодействие с *TP53* ведет к тому, что комплекс *MDM2/TP53* направляется из ядра в цитоплазму, где подвергается убиквитинированию. В условиях стресса сайты связывания *MDM2* и *TP53* фосфорилируются, и комплекс, в котором *TP53* не активен, не образуется. В результате белок *TP53* переходит из латентной формы в активированную форму, запускает процессы остановки клеточного цикла и апоптоза. Гиперэкспрессия *MDM2* — типичный механизм разоружения раковой клетки, лишаящий ее защитных функций опухолевого супрессора *TP53* [31].

Цель исследования — проанализировать молекулярно-генетический статус опухоли у больного ММ с коротким периодом ремиссии в дебюте и рецидиве заболевания и сопоставить с клиническим течением заболевания.

Материалы и методы

Пункцию костного мозга для молекулярно-генетического скрининга (fluorescence *in situ* hybridization (FISH), измерение экспрессии и мутационный статус генов) проводили дважды — в дебюте и рецидиве ММ.

Для оценки значимости изменения величин экспрессии генов регуляторных белков у больного ММ в дебюте и рецидиве заболевания сравнивали их с соответствующими показателями для клеток CD138⁺, полученных от 10 доноров (5 женщин, 5 мужчин в возрасте от 25 до 41 года). Если значение экспрессии гена у больного вписывалось в диапазон значений, характерных для доноров, считали, что оно находится в пределах нормы.

Выделение мононуклеаров из костного мозга и CD138⁺-клеток. Используя градиент плотности фиколла (1,077 г/см³), из костномозговой взвеси выделяли фракцию мононуклеаров. В дальнейшем проводилась высокоактивная магнитная сепарация согласно протоколу Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec GmbH, Germany, <http://www.miltenyibiotec.com>) с использованием магнитного сепаратора OctoMacs, антител anti-CD138, конъюгированных с 50-нм частицами оксида железа и анти-

тел anti-CD138, конъюгированных с фикоэритрином. Чистота выделения моноклеаров, обогащенных CD138⁺-клетками, в дебюте (установка диагноза 29.05.2013) и прогрессии (констатация рецидива 01.08.2014) составила 80 и 70 % соответственно. В дальнейшем полученные моноклеары и CD138⁺-клетки использовали для проведения FISH-исследования, измерения уровня экспрессии генов и определения мутационного статуса генов.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Молекулярно-цитогенетическое исследование клеток костного мозга выполняли в лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. В дебюте заболевания FISH-исследование проводилось на моноклеарах костного мозга для выявления первичных (t(14q32)/*IGH*, множественные трисомии) и вторичных (del17p13/*TP53*, del13q14/-13, del1p32, amplq21 и t(8q24)/*cMYC*) хромосомных аномалий. В прогрессии заболевания на сепарированных CD138⁺-клетках проводился повторный FISH-анализ с ДНК-зондами для выявления del17p13/*TP53*, del13q14/-13, del1p32, amplq21, t(8q24)/*cMYC* и множественных трисомий. В работе использовали различные центромерные и локус-специфичные ДНК-зонды: XL *IGH plus*, XL P53, XL *cMYC* BA, XL 1p32/1q21, XL 5p15/9q22/15q22 Hyperdiploidy Amplification Probe (MetaSystems, Germany) и D13S25 (Cytocell, UK). Исследование проводили согласно протоколам производителей. Для каждого зонда анализировали по 200 интерфазных ядер с четкими сигналами. Результаты FISH-анализа описывали в соответствии с международной номенклатурой (International System for Cytogenetic Nomenclature, ISCN, 2013) [32].

Анализ экспрессии генов. Тотальную фракцию РНК выделяли из плазматических клеток костного мозга с поверхностным маркером CD138⁺ при помощи лизиса в гуанидин-изотиоцианатном буфере с последующей очисткой стандартным фенол-хлороформным методом. Полученную РНК хранили при температуре -70 °C в EtOH. Для анализа экспрессии генов использовали метод секвенирования РНК нового поколения (RNA-seq). Анализ проводили на приборе Illumina HiSeq (Illumina, США) с использованием наборов для подготовки библиотеки транскриптома тотальной РНК (Whole-transcriptome analysis with total RNA sequencing). Выравнивание полученных после секвенирования последовательностей на референсный геном и сборка транскриптома проводилось с помощью программного обеспечения STAR [33]. Пересчет уровня экспрессии генов был выполнен в программе DESeq2. Числовые значения экспрессии (normalized gene counts, ngc) представляют собой абсолютные значения, полученные при сборке и выравнивании транскрипта гена на последовательность референсного гена с последующим нормированием на глубину секвенирования [34]. Для определения значимости различий между экспрессией в опухолевых клетках

в дебюте и рецидиве заболевания полученные значения приведены с меньшим и большим диапазоном значений экспрессии в плазматических клетках 10 добровольцев (табл. 1).

Анализ соматических мутаций. Соматические мутации в геномной ДНК плазматических клеток CD138⁺ костного мозга анализировали методом секвенирования по Сэнгеру. В данной работе исследовались кодирующие области генов *N-RAS*, *K-RAS*, *TP53*, и экзон 15 гена *BRAF*. Геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Клетки лизировали в 1 мл STE (Sodium Chloride-Tris-EDTA) буфера, содержащего 1 % додецилсульфат натрия (SDS) и протеиназу К (200 мкг/мл), в течение ночи при 37 °C или двух часов при 60 °C с последующей фенольной экстракцией.

Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали смесь PCR Master Mix (2X) Thermo Scientific™, 0,01–0,02 мкг геномной ДНК и 10 пкмоль каждого из праймеров в усредненных условиях (94 °C — 1 мин., 60–62 °C — 1 мин., 72 °C — 1–2 мин., 30 циклов). Все праймерные системы и зонды являются оригинальными и разработаны в ходе проведения данного исследования. Для гена *BRAF* праймеры были синтезированы для 15-го экзона: прямой праймер *BRAF15D*: *gatctcttacctaaactcttca*; обратный праймер *BRAF15R*: *cttcaatgactttctagtaact*, для гена *NRAS* и *KRAS* праймеры были подобраны таким образом, чтобы амплифицировать 2, 3 и 4-й экзоны обоих генов: *RAS1D*: *atgtggtcgcgaattaacc* и *RAS1R* *tgggtaaatgatgacgacaa*; *RAS1*: *cccttaccctccacaccccc*; *RAS2* *ctcatttccccataaagattcag*; *NRAS3x*: *ttaagcagctgcctctct*; *NRAS4*: *aactgatgcaaaccttgcaca*; *KRAS1D*: *gatacagctgtgcagtcac*; *KRAS1R*: *tctgcaccagtaaatatgc*; *KRAS2D*: *ccagactgtgttctctctg*; *KRAS2R*: *ttactccactgctctaatccc*; *KRAS3*: *gacaaaagtggtgacaggtt*; *KRAS4*: *ggacactggattaagaagcaa*. Все кодирующие экзоны *TP53*, кроме 11-го, были включены в анализ и амплифицировались с использованием следующих праймеров: *TP53D1*: *gccgagctgtctcagacact*; *TP53R1*: *gaggaatcccaaatgtccaaacaa*; *TP53D2*: *acg ccaactctctctagctc*; *TP53R2*: *ggccactgacaaccaccctta*; *TP53D3*: *ggcctccctgtgttgcaca*; *TP53R3*: *caaccaccctgtgtcttct*; *TP53D4*: *ggttctctccacactact*; *TP53R4*: *gcaggctaggttaagctatga*; *TP53D5*: *catgtgtgtttgtaccgtca*; *TP53R5*: *cagctgcctttgacatgaa*.

Продукты ПЦР разделяли при помощи электрофореза в 6 % полиакриламидном геле (ПААГ) и визуализировали в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием. Для секвенирования ПЦР-продукты реакции очищали на колонках Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Promega.

Праймеры синтезировали в ООО «Синтол». Секвенирование проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3500 в ЦКП «Геном». Полученные с секвенатора электрофореграммы анализировали в программе Vector NTI.

Таблица 1. Изменения уровня экспрессии генов в дебюте ММ и при констатации рецидива у больного в сравнении со значениями экспрессии этих генов у доноров**Table 1.** Gene expression fold changes are at the time of diagnosis and progression in comparison with a range of gene expression values for a group of donors

Гены Genes	Доноры (n = 10) Donors (n = 10)		Больной Patient	
	минимальное значение, ngc min value, ngc	максимальное значение, ngc max value, ngc	дебют заболевания, ngc disease debut, ngc	рецидив заболевания, ngc disease relapse, ngc
c-тус	188	493	1374	2074
CCND1	5	981	117	12
CCND2	332	4592	4383	613
MMSET(NSD2)	611	1608	338	1195
Notch2	945	2276	1763	5805
CKS1B	4	40	17	29
IL6	2	41	33	953
TP53	166	479	237	210
MDM2	384	910	1821	4458
RAF1	706	1395	791	1710
STAT4	22	143	46	145
mTOR	456	723	625	1585
Клональные IGH/L Clonal IGH/L				
IGHG2	35146	280485	628255	67532
IGHM	46047	279812	2118	298
IGHV3-33	811	11080	13954	1246
IGLC2	25465	126208	242255	22381
IGLV1-44	1460	6682	21176	1491
Неклональные IGH Non-clonal IGH				
IGHV3-23	8970	48891	940	14
IGHV2-5	3204	15381	1613	36

Примечание. ngc — normalized gene counts, единица измерения экспрессии гена, выраженная в количестве прочтений гена, нормированного на общее число прочтений в образце.

Note. ngc — normalized gene counts (units of given values).

Результаты

Клиническое течение заболевания

Больной И. Ю. И., 1957 года рождения, наблюдался в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с мая 2013 г. с диагнозом ММ IIA ст. по Durie-Salmon, I ст. по ISS, I ст. по R-ISS. Диагноз был установлен в соответствии с критериями, разработанными Международной рабочей группой по изучению ММ (The International Myeloma Working Group — IMWG) [35]. На момент диагностики заболевания был выполнен первый молекулярно-генетический скрининг (FISH, определение экспрессии и мутационный статус генов). При проведении индукции ремиссии было выполнено пять курсов по программе PAD (бортезомиб + адриабластин + дексаметазон). После второго курса была достигнута частичная ремиссия (ЧР), а после пяти — очень хорошая частичная ремиссия (ОХЧР).

На фоне ОХЧР были выполнены мобилизация и сбор аутологичных стволовых клеток крови по схеме 4 г/м² и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор 5 мкг/кг. За две процедуры лейкофереза было заготовлено 13,0 × 10⁶/кг CD34⁺-клеток. В перерыве между сбором аутологичных стволовых клеток крови и выполнением трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) с целью сдерживания достигнутого противоопухолевого ответа проведено четыре бортезомиб-содержащих курса (VCD: бортезомиб + дексаметазон). По результатам обследования непосредственно перед ауто-ТГСК была констатирована полная строгая ремиссия заболевания (результаты иммунохимического исследования, данные костного мозга). Однако сохранялись остеодеструктивные очаги, замещенные содержимым жировой плотности. При обследовании на +100-й день после ауто-ТГСК была констатирована прогрессия заболевания (В-симптомы,

по данным иммунохимического исследования сыворотки крови и мочи помимо исходного парапротеина G-лямбда, впервые за весь период наблюдения была выявлена секреция парапротеина М-лямбда 5,3 г/л). Реиндукционные бортезомиб-содержащие курсы оказались неэффективными. Больной был переведен на вторую линию терапии иммуномодулирующими препаратами, на фоне которой удалось достичь лишь частичного противоопухолевого ответа. Спустя четыре месяца от момента констатации рецидива заболевания больной умер от тяжелых инфекционных осложнений.

Молекулярно-цитогенетическое исследование (FISH). При молекулярно-цитогенетическом исследовании (FISH) в дебюте заболевания был выявлен лишь гипердиплоидный тип ММ (трисомии 5, 9, 15) в 50 % ядер. При повторном цитогенетическом исследовании на фоне прогрессии заболевания сохранялся гипердиплоидный тип ММ, однако появилась *amp1q21* в 170 интерфазных ядрах из 200 исследованных, то есть в 85 % ядер. На рисунке 1 представлены результаты FISH-исследования мононуклеаров костного мозга в дебюте заболевания, а на рисунке 2 — результаты FISH *CD138*⁺-клеток костного мозга в рецидиве ММ.

Анализ экспрессии генов *c-MYC*, *MMSET*, *CCND1*, *CCND2*, *CKS1B*, *NOTCH2*, *IL-6*, *BCL2*, *TP53*, *MDM2*.

Анализ экспрессии гена *c-MYC* показал, что в рецидиве заболевания в плазматических клетках костного мозга больного незначительно повысилось количество мРНК *c-MYC* (в 1,5 раза по сравнению с моментом диагностики заболевания). Экспрессия *c-MYC* на момент диагностики была в 4,4 раза выше, чем сред-

нее значение, полученное в результате измерений для 10 доноров.

Значительное увеличение уровня экспрессии при развитии рецидива заболевания было выявлено для гена *Notch2*. Экспрессия *Notch2* увеличилась в 3,2 раза, причем в дебюте заболевания она не превышала верхние показатели, полученные для доноров, но была выше усредненного значения. Наиболее заметное повышение экспрессии наблюдалось для гена *IL-6* в рецидиве заболевания, его экспрессия увеличилась в 29 раз по сравнению с дебютом заболевания. Уже до начала лечения значение экспрессии гена *IL-6* было выше в три раза, чем среднее значение у доноров. Высокий уровень экспрессии гена *MDM2* — репрессора *p53* — был зарегистрирован в дебюте и при рецидиве заболевания, причем при рецидиве его количество возросло в 2,5 раза. Во время диагностики ММ его уровень был выше верхних показателей у доноров в два раза. Повышенное значение экспрессии в рецидиве по сравнению с дебютом заболевания можно также отметить у генов *MMSET* и *CKS1B* (в 3,5 и 1,8 раза соответственно). Значительное снижение экспрессии во время прогрессии ММ было детектировано у генов *CCND1* и *CCND2*. Однако ее значения находятся в диапазоне колебаний уровня экспрессии у доноров, и, вероятно, эти изменения не несут функциональной нагрузки. Экспрессия гена *TP53* у больного не выходила за рамки значений, полученных для доноров (166 и 479 *ngc* соответственно) и существенно не изменилась в рецидиве по сравнению с дебютом заболевания.

Отмечено снижение на порядок при рецидиве экспрессии генов клональных иммуноглобулинов, ха-

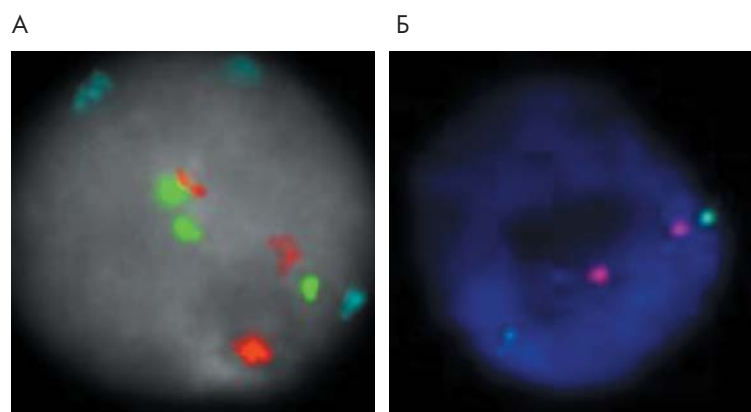


Рисунок 1. Результаты FISH-исследования мононуклеаров костного мозга в дебюте заболевания: А — гипердиплоидия (трисомии 5, 9, 15): три зеленых сигнала от локуса 5p12, три голубых сигнала от локуса 9q22/NR4A3 и три красных сигнала от локуса 15q22/SMAD6; Б — амплификация локуса 1q21 не выявлена: два зеленых сигнала от локуса 1p32/CDKN2C и два красных сигнала от локуса 1q21/CKS1B

Figure 1. Results of FISH-analysis mononuclear cells bone marrow at diagnosis: А — hyperdiploidy (trisomies 5, 9, 15): three green signals of 5p12 locus, three blue signals of 9q22/NR4A3 locus и three red signals of 15q22/SMAD6 locus; Б — Amplification of locus 1q21 was not found: two green signals of 1p32/CDKN2C locus and two red signals of 1q21/CKS1B locus

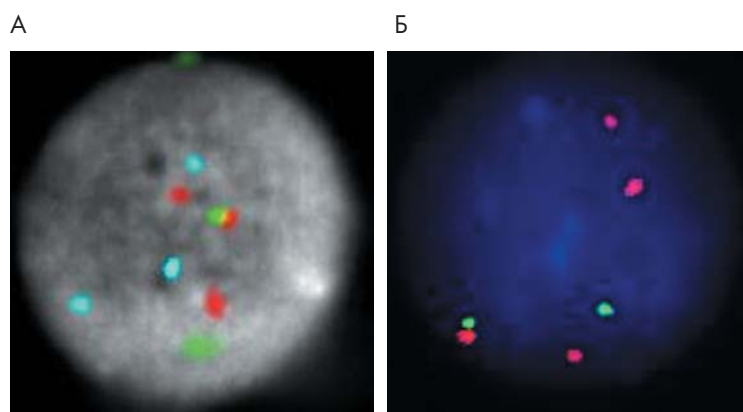


Рисунок 2. Результаты FISH-исследования *CD138*⁺-клеток костного мозга в рецидиве заболевания: А — гипердиплоидия (трисомии 5, 9, 15): три зеленых сигнала от локуса 5p12, три голубых сигнала от локуса 9q22/NR4A3 и три красных сигнала от локуса 15q22/SMAD6; Б — амплификация локуса 1q21: два зеленых сигнала от локуса 1p32/CDKN2C и четыре красных сигнала от локуса 1q21/CKS1B (два из них дополнительные)

Figure 2. Results of FISH-analysis *CD138*⁺ cells bone marrow at the time of relapse: А — hyperdiploidy (trisomies 5, 9, 15): three green signals of 5p12 locus, three blue signals of 9q22/NR4A3 locus и three red signals of 15q22/SMAD6 locus; Б — Amplification of locus 1q21: two green signals of 1p32/CDKN2C locus and four red signals of 1q21/CKS1B locus (two of them are additional)

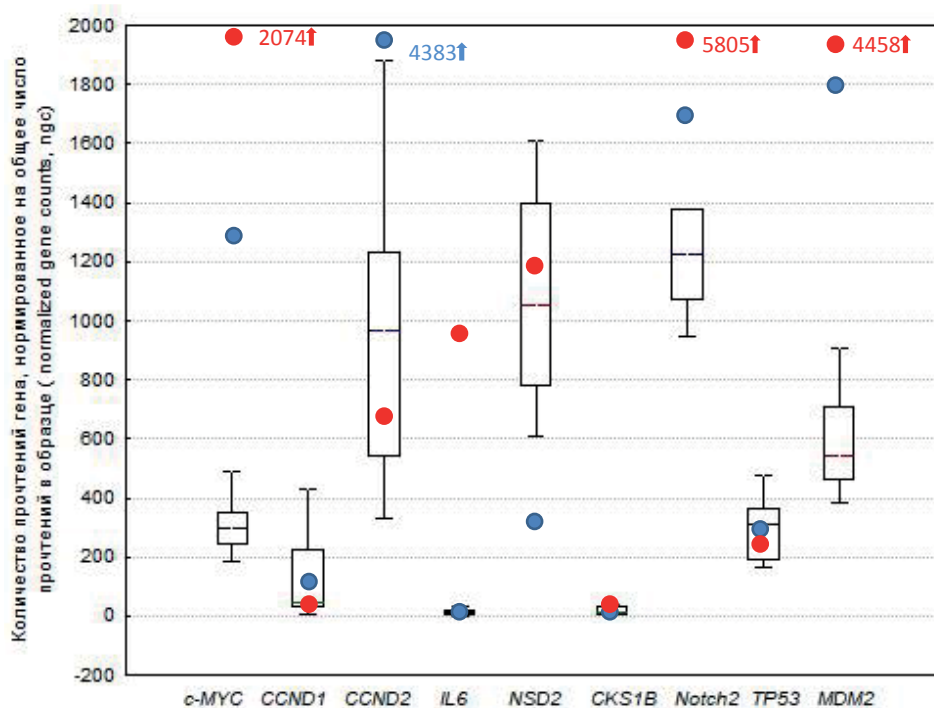


Рисунок 3. Изменение экспрессии генов в дебюте ММ и при констатации рецидива у больного в сравнении со значениями экспрессии этих генов у доноров. По оси абсцисс расположены гены, по оси ординат — значения их экспрессии, выраженной в количестве прочтений гена, нормированное на общее число прочтений (normalized gene counts, ngc). Уровень экспрессии генов проанализирован в дебюте (синие окружности) и рецидиве (красные окружности) заболевания. Диапазон значений экспрессии данных генов у здоровых людей представлен в виде прямоугольников с перцентилями. Перцентилями отображают разброс значений, где в верхнюю и в нижнюю перцентили попадает по 25 % крайних значений. Пересекающая прямоугольник линия — это медиана значений экспрессии для данного гена

Figure 3. Change in gene expression at the diagnosis of MM and at the time of relapse in comparison with the range expression of those genes in the group of donors. Axis X: genes, axis Y: gene expression values in normalized gene counts, ngc. Gene expression level (gene normalized counts) is analyzed at the diagnosis (blue circles) and at the time of relapse (red circles) of the patient with MM. Range of healthy people gene expression values are represented in the boxes with percentiles. The percentiles show the value below (lower percentiles) or above (upper percentiles) which 25 % of the observations may be found. The line which is crossing the box determines the median value of the expression of the gene

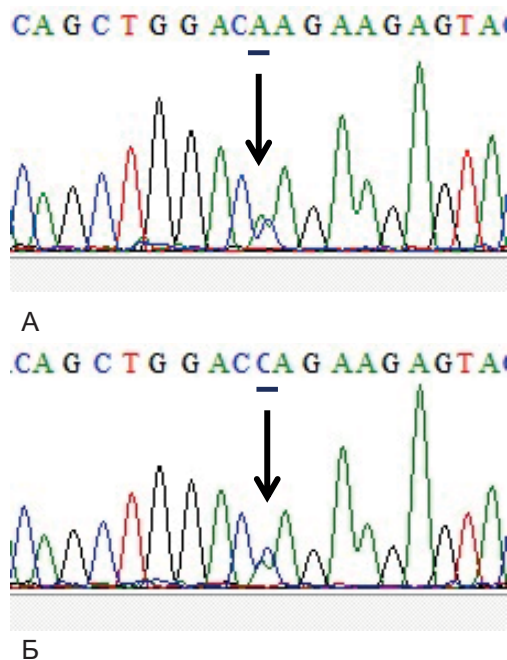


Рисунок 4. Активирующая мутация гена *N-RAS* в кодоне 61. Фрагменты электрофореграмм 3-го экзона гена *N-RAS*, содержащие миссенс-мутацию (замена аденина на цитозин в 61-м кодоне): А — дебют заболевания; Б — рецидив заболевания

Figure 4. Activating mutation of *N-RAS* gene in 61st codon. Fragment of the sequence electrophoregram of *N-RAS* gene 3rd exon containing missense mutation (replacement of adenine by cytosine in 61 codon): A — disease debut; Б — disease relapse

рактирующей опухолевые клетки (*IGHV3-33/IGHG2, IGLV1-44/IGLC2*), что соответствует выявленному при иммунохимическом исследовании уменьшению моноклональной секреции парапротеина G-лямбда с 23,8 до 5,4 г/л. В то же время экспрессия неклональных иммуноглобулинов (в таблице 1 для примера приведены *IGHV3-23* и *IGHV2-5*) снизилась почти на два порядка, что свидетельствует о наличии у больного с рецидивом заболевания глубокого иммунодефицита. Полученные результаты анализа экспрессии генов представлены на рисунке 3 и в таблице 1.

Мутационный статус генов *N-RAS*, *K-RAS*, *BRAF* и *TP53*

Секвенирование экзонов 2, 3 и 4 генов *N-RAS* и *K-RAS* выявило у больного активирующую соматическую миссенс-мутацию с.182A>C в кодоне 61-го гена *N-RAS* (p.Q61P). В материале, взятом у больного во время рецидива, диагностированная ранее мутация в той же позиции сохранилась (рис. 4). Соотношение нормального и мутантного пиков на электрофореграмме, близкое к 1, свидетельствует о клональном характере данного нарушения.

При параллельном секвенировании ДНК и РНК гена *N-RAS* в клетках CD138⁺ опухоли в дебюте и рецидиве

заболевания, электрофореграммы практически не отличались друг от друга (соотношение нормально-го и мутантного пиков 1:1), что свидетельствует об отсутствии различий в экспрессии мутантного аллеля и аллеля «дикого типа».

Секвенирование экзона 15 гена *BRAF*, в котором обычно локализуются активирующие соматические мутации, в том числе наиболее распространенная p.V600E, показало отсутствие каких-либо отклонений от референсной последовательности как в первичном, так и в рецидивном материале.

Была проанализирована также первичная структура всех функционально важных областей гена *TP53* в материале опухоли как при диагностике ММ, так и при рецидиве заболевания. Соматических мутаций найдено не было. Выявлен только полиморфный вариант (p.P72R, rs1042522 в базе данных NCBI/SNP) в гетерозиготном состоянии, не имеющий функционального значения [36].

Обсуждение

В работе был сопоставлен молекулярно-генетический статус опухолевых клеток у больного ММ в дебюте и при рецидиве заболевания. Исходно противоопухолевый ответ на индукционную терапию бортезомиб-содержащими курсами расценивался как полная иммунохимическая ремиссия, однако при рецидиве заболевания была констатирована резистентность к терапии бортезомибом. Рецидив заболевания сопровождался не только сохранением прежнего клонального парапротеина IgG-λ, но и появлением не выявлявшегося ранее парапротеина IgM-λ. Иммунохимический рецидив характеризовался появлением симптомокомплекса CRAB: включающего гиперкальциемию (Calcium), почечную недостаточность (Renal failure), анемию (Anemia) и остеолитическое поражение костей (Bone lesions). Больной умер в результате инфекционных осложнений через четыре месяца от момента диагностики прогрессии заболевания.

При молекулярно-цитогенетическом исследовании в дебюте и при рецидиве заболевания была выявлена трисомия хромосом 5, 9 и 15. Гипердиплоидия при ММ ассоциируется с благоприятным прогнозом и лучшей выживаемостью больных [37].

На фоне прогрессии ММ у больного возникла новая цитогенетическая абберация — амплификация локуса хромосомы 1 (amp1q21). Анализ экспрессии гена *CKS1B*, расположенного в этом локусе, показал ее возрастание при рецидиве примерно в два раза по сравнению с дебютом заболевания, что согласуется с увеличением его копиности. Данная хромосомная аномалия считается фактором плохого прогноза. Отчасти это может быть связано с увеличением числа копий гена *CKS1B* и усилением его экспрессии, которое может влиять на общую и без-

рецидивную выживаемость, а также резистентность к бортезомиб-содержащим курсам [38]. Показано [39] также, что amp1q21 значительно реже встречается при МГНГ, чем при ММ, и может способствовать прогрессии заболевания, однако авторы этой работы пришли к выводу о том, что уровень экспрессии гена *CKS1B* на этот процесс не влияет, и он обусловлен, скорее всего, генетической нестабильностью длинного плеча хромосомы 1 как таковой.

Анализ транскриптомных данных показал, что при рецидиве в сравнении с дебютом заболевания повышена экспрессия генов *c-MYC*, *Notch2*, *MDM2* и *IL-6*. Однако, если экспрессия первых трех генов повысилась всего в 1,5–3 раза, количество транскрипта гена *IL-6* возросло почти в 30 раз. Не исключено, что именно резкое усиление экспрессии этого цитокина послужило пусковым механизмом прогрессии ММ у больного, поскольку *IL-6* стимулирует клеточную пролиферацию, активируя различные сигнальные пути (MAPK, JAK-STAT, PI3K) [1, 40].

При рецидиве внутри каждого из этих путей наблюдалось повышение экспрессии по крайней мере одного гена регуляторного белка (*RAFI*, *STAT4* и *mTOR* соответственно). В свою очередь, индукция *IL-6* может, по крайней мере отчасти, объясняться усилением экспрессии гена *Notch2* (в 3,3 раза по сравнению с дебютом заболевания). *Notch2* активирует экспрессию *IL-6* в клетках костномозговых ниш (клетках стромы) и плазматических клетках костного мозга. Показано, что *IL6* является одним из ключевых факторов, влияющих на жизнеспособность и неконтролируемое деление миеломных клеток [30].

Экспрессия гена транскрипционного фактора *c-MYC* повысилась при рецидиве заболевания незначительно, всего в 1,5 раза, однако, как и в дебюте заболевания, была на существенно более высоком уровне, чем у доноров. Механизм повышенной экспрессии в данном случае остается не ясен, так как при FISH-исследовании ни транслокации с вовлечением локуса гена *c-MYC*, ни трисомия 8 не были выявлены. Возможно, имеет место эпигенетическая регуляция гена *c-MYC*. Клетки, конститутивно экспрессирующие высокий уровень *c-MYC*, обладают пониженной зависимостью от ростовых факторов и большей скоростью пролиферации. Таким образом, повышенный уровень *c-MYC* также мог быть одним из факторов, спровоцировавших прогрессию ММ.

Экспрессия гена *TP53* при рецидиве существенно не изменилась, оставаясь в пределах диапазона значений экспрессии гена *TP53* у доноров (табл. 1), и никаких мутаций в нем выявлено не было. При этом экспрессия гена белка mdm2, являющегося ингибитором *TP53*, увеличилась в 2,5 раза, что вполне могло повлечь за собой ослабление функции *TP53* при прогрессии заболевания.

Резкое снижение экспрессии всех генов иммуноглобулинов, в том числе и клональных, соответствующих парапротеину G-лямбда, свидетельствовало о наличии глубокого иммунодефицита при прогрессии ММ.

В дебюте заболевания больной не относился к группе высокого риска по клиническим и цитогенетическим данным, однако у него была выявлена клональная гетерозиготная мутация p.Q61P в гене *N-RAS*, благодаря которой происходит неконтролируемая активация сигнального пути МАРК, ведущая к повышению пролиферативного потенциала опухолевых клеток. После проведения курсов терапии при рецидиве заболевания мутация сохранилась в клональном состоянии. Влияние активирующих мутаций в генах семейства *RAS* на патогенез ММ исследуется давно и достаточно активно, однако результаты опубликованных работ приводят к противоречивым выводам об их значимости. В исследовании, посвященном изучению дифференциальной экспрессии мутантного и нормального аллелей

[11], было показано, что мутантный аллель экспрессируется слабее аллеля «дикого типа». У наблюдавшегося больного нормальная и мутантная копии гена *N-RAS* в дебюте и рецидиве ММ экспрессировались с одинаковой эффективностью. Оба варианта белка могли играть существенную роль в активации сигнального МАРК-пути при прогрессии заболевания: мутантный белок — за счет потери контроля над ним со стороны цитокинов, нормальный белок — вследствие стимуляции гиперэкспрессией *IL-6*.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что при ММ целесообразно выполнять комплексную молекулярную диагностику, включающую развернутое цитогенетическое исследование, анализ экспрессии и мутационный анализ широкого спектра генов регуляторных белков, так как единичная хромосомная или генная аномалия вряд ли может сама по себе служить определяющим фактором прогноза развития заболевания и его резистентности к применяемой терапии.

Литература

1. Prideaux S.M., Conway O'Brien E., Chevassut T.J. The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv. Hematol.* 2014; 864058. DOI: 10.1155/2014/864058
2. Fonseca R., Barlogie B., Bataille R. et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: A workshop report. *Cancer Res.* 2004; 64: 1546–58.
3. Maura F., Degasperi A., Nadeu F. et al. A practical guide for mutational signature analysis in hematological malignancies. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 2969. DOI: 10.1038/s41467-019-11037-8
4. 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): 2604–16. DOI: 10.1038/s41375-018-0037-9
5. Bolli N., Avet-Loiseau H., Wedge D.C. et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2014; 5: 2997. DOI: 10.1038/ncomms3997
6. Szalat R., Avet-Loiseau H., Munshi N.C. Gene Expression Profiles in Myeloma: Ready for the Real World? *Clin Cancer Res.* 2016; 22(22): 5434–42. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0867
7. Chng W.J., Gonzalez-Paz N., Price-Troska T. et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia.* 2008; 22: 2280–4. DOI: 10.1038/leu.2008.142
8. Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11: 761–74.
9. Rasmussen T., Kuehl M., Lodahl M. et al. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood.* 2005; 105(1): 317–23.
10. Kim S.J., Shin H.T., Lee H.O. et al. Recurrent mutations of MAPK pathway genes in multiple myeloma but not in amyloid light-chain amyloidosis. *Oncotarget.* 2016; 7(42): 68350–9. DOI: 10.18632/oncotarget.12029
11. Rashid N.U., Sperling A.S., Bolli N. et al. Differential and limited expression of mutant alleles in multiple myeloma. *Blood.* 2014; 124: 3110–7.
12. Hu Y., Chen E., Wang J. Progress in the identification of gene mutations involved in multiple myeloma. *Onco Targets Ther.* 2019; 12: 4075–80. DOI: 10.2147/OTT.S205922
13. Andrulis M., Lehnert N., Capper D. et al. Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov.* 2013; 3: 862–9. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0014

References

1. Prideaux S.M., Conway O'Brien E., Chevassut T.J. The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv. Hematol.* 2014; 864058. DOI: 10.1155/2014/864058
2. Fonseca R., Barlogie B., Bataille R. et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: A workshop report. *Cancer Res.* 2004; 64: 1546–58.
3. Maura F., Degasperi A., Nadeu F. et al. A practical guide for mutational signature analysis in hematological malignancies. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 2969. DOI: 10.1038/s41467-019-11037-8
4. 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): 2604–16. DOI: 10.1038/s41375-018-0037-9
5. Bolli N., Avet-Loiseau H., Wedge D.C. et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2014; 5: 2997. DOI: 10.1038/ncomms3997
6. Szalat R., Avet-Loiseau H., Munshi N.C. Gene Expression Profiles in Myeloma: Ready for the Real World? *Clin Cancer Res.* 2016; 22(22): 5434–42. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0867
7. Chng W.J., Gonzalez-Paz N., Price-Troska T. et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia.* 2008; 22: 2280–4. DOI: 10.1038/leu.2008.142
8. Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11: 761–74.
9. Rasmussen T., Kuehl M., Lodahl M. et al. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood.* 2005; 105(1): 317–23.
10. Kim S.J., Shin H.T., Lee H.O. et al. Recurrent mutations of MAPK pathway genes in multiple myeloma but not in amyloid light-chain amyloidosis. *Oncotarget.* 2016; 7(42): 68350–9. DOI: 10.18632/oncotarget.12029
11. Rashid N.U., Sperling A.S., Bolli N. et al. Differential and limited expression of mutant alleles in multiple myeloma. *Blood.* 2014; 124: 3110–7.
12. Hu Y., Chen E., Wang J. Progress in the identification of gene mutations involved in multiple myeloma. *Onco Targets Ther.* 2019; 12: 4075–80. DOI: 10.2147/OTT.S205922
13. Andrulis M., Lehnert N., Capper D. et al. Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov.* 2013; 3: 862–9. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0014

14. Levine A.J. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 1997; 88: 323–31.
15. Salmon S.E., Dalton W.S., Grogan T.M. et al. Multidrug-resistant myeloma: laboratory and clinical effects of verapamil as a chemosensitizer. *Blood*. 1991; 78: 44–50.
16. Brooks T.A., Hurley L.H. Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer*. 2010; 1(6): 641–9.
17. Dang C.V. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012; 149(1): 22–35. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.003
18. Gao P., Tchernyshyov I., Chang T.C. et al. c-myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009; 458(7239): 762–5. DOI: 10.1038/nature07823
19. Kuzyk A., Mai S. c-MYC-induced genomic instability. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4(4): a014373. DOI: 10.1101/cshperspect.a014373
20. Karlsson A., Giuriato S., Tang F. et al. Genomically complex lymphomas undergo sustained tumor regression upon MYC inactivation unless they acquire novel chromosomal translocations. *Blood*. 2003; 101(7): 2797–803.
21. Mirabella F., Wu P., Wardell C.P. et al. MMSET is the key molecular target in t(4;14) myeloma. *Blood Cancer J*. 2013; 3(5): 114. DOI: 10.1038/bcj.2013.9
22. Chesi M., Bergsagel P.L. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol*. 2013; 97(3): 313–23. DOI: 10.1007/s12185-013-1291-2
23. Zhan F., Colla S., Wu X. et al. CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood*. 2007; 109(11): 4995–5001.
24. Smol T., Dufour A., Tricot S. et al. Combination of t(4;14), del(17p13), del(1p32) and 1q21 gain FISH probes identifies clonal heterogeneity and enhances the detection of adverse cytogenetic profiles in 233 newly diagnosed multiple myeloma. *Mol Cytogenet*. 2017; 10: 26. DOI: 10.1186/s13039-017-0327-3
25. Lobry C., Oh P., Mansour M.R. et al. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood*. 2014; 123(16): 2451–9. DOI: 10.1182/blood-2013-08-355818
26. Colombo M., Mirandola L., Platonova N. et al. Notch-directed microenvironment reprogramming in myeloma: a single path to multiple outcomes. *Leukemia*. 2013; 27(5): 1009–18. DOI: 10.1038/leu.2013.6
27. Colombo M., Galletti S., Bulfamante G. et al. Multiple myeloma-derived Jagged ligands increases autocrine and paracrine interleukin-6 expression in bone marrow niche. *Oncotarget*. 2016; 7(35): 56013–29. DOI: 10.18632/oncotarget.10820
28. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989; 74: 1–10.
29. Frassanito M.A., Cusmai A., Iodice G., Dammacco F. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood*. 2001; 97(2): 483–9.
30. Gadó K., Domján G., Hegyesi H., Falus A. Role of interleukin-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cell Biol Int*. 2000; 24(4): 195–209.
31. Herrero A.B., Rojas E.A., Misiewicz-Krzeminska I. et al. Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(12): 2003. DOI: 10.3390/ijms17122003
32. Simons A., Shaffer L.G., Hastings R.J. Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition. *Cytogenet. Genome Res* 2013; 141: 1–6. DOI: 10.1159/000353118
33. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013; 29(1): 15–21. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts635
34. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15(12): 550.

35. Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014; 15(12): 538–48. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
36. Kodal J., Vedel-Krogh S., Kobylecki C. et al. TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals. *Sci Rep.* 2017; 7: 336. DOI: 10.1038/s41598-017-00427-x
37. Smadja N.V., Bastard C., Brigaudeau C. et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2001; 98(7): 2229–38.
38. Chen M.H., Qi C., Reece D., Chang H. Cyclin kinase subunit 1B nuclear expression predicts an adverse outcome for patients with relapsed/refractory multiple myeloma treated with bortezomib. *Hum Pathol.* 2012; 43(6): 858–64. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.07.013
39. Stella F., Pedrazzini E., Baialardo E. et al. Quantitative analysis of CKS1B mRNA expression and copy number gain in patients with plasma cell disorders. *Blood Cells Mol Dis.* 2014; 53(3): 110–7. DOI: 10.1016/j.bcmd.2014.05.006
40. Chauhan D., Uchiyama H., Akbarali Y. et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood.* 1996; 87(3): 1104–12.

Информация об авторах

Сергеева Анна Михайловна*, научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: curleww@gmail.com, тел.: +7 (495) 612-09-37; 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4863-4902>

Абрамова Татьяна Валерьевна, кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: abramova.blood@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3163-4930>

Довыденко Мария Вячеславовна, кандидат медицинских наук, врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с круглосуточным стационаром ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: nareyko@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6082-0110>

Сурин Вадим Леонидович, старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: vadsurin@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1890-4492>

Обухова Татьяна Никифоровна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией кариологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: obukhova_t@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1613-652X>

35. Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014; 15(12): 538–48. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
36. Kodal J., Vedel-Krogh S., Kobylecki C. et al. TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals. *Sci Rep.* 2017; 7: 336. DOI: 10.1038/s41598-017-00427-x
37. Smadja N.V., Bastard C., Brigaudeau C. et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2001; 98(7): 2229–38.
38. Chen M.H., Qi C., Reece D., Chang H. Cyclin kinase subunit 1B nuclear expression predicts an adverse outcome for patients with relapsed/refractory multiple myeloma treated with bortezomib. *Hum Pathol.* 2012; 43(6): 858–64. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.07.013
39. Stella F., Pedrazzini E., Baialardo E. et al. Quantitative analysis of CKS1B mRNA expression and copy number gain in patients with plasma cell disorders. *Blood Cells Mol Dis.* 2014; 53(3): 110–7. DOI: 10.1016/j.bcmd.2014.05.006
40. Chauhan D., Uchiyama H., Akbarali Y. et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood.* 1996; 87(3): 1104–12.

Information about the authors

Anna M. Sergeeva*, Researcher, Laboratory of Genetic Engineering, National Research Center for Hematology, e-mail: curleww@gmail.com, tel.: +7 (495) 612-09-37; 125167, Moscow, Novyy Zыkovskiy proezd, 4. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4863-4902>

Tatyana V. Abramova, Cand. Sci. (Med.), Pathologist, Laboratory of Karyology, National Research Center for Hematology, e-mail: abramova.blood@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3163-4930>

Mariya V. Dovydenko, Cand. Sci. (Med.), Hematologist, Department of Intensive High-dose Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology, e-mail: nareyko@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6082-0110>

Vadim L. Surin, Senior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering National Research Centre for Hematology, e-mail: vadsurin@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1890-4492>

Tatyana N. Obukhova, Cand. Sci. (Med.), Head of the Karyology Laboratory, National Research Centre for Hematology, e-mail: obukhova_t@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1613-652X>

Сунцова Мария Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории геномного анализа сигнальных систем клетки ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук,
e-mail: suntsova@oncobox.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1890-4492>

Буздин Антон Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клинической и геномной биоинформатики ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет),
e-mail: buzdin@oncobox.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9866-3424>

Менделеева Лариса Павловна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением высокодозной химиотерапии парпротеинемических гемобластозов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: Mendeleeva.L@blood.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4966-8146>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 19.03.2019

Принята к печати: 12.09.2019

Mariya V. Suntsova, Junior Researcher, Laboratory for the Genomic Analysis of Cell Signaling Systems, Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
e-mail: suntsova@oncobox.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1890-4492>

Anton A. Buzdin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Laboratory for Clinical and Genomic Bioinformatics, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
e-mail: buzdin@oncobox.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9866-3424>

Larisa P. Mendeleeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Head of the Department of High-dose Chemotherapy for Paraproteinemic Hemoblastoses, National Research Center for Hematology,
e-mail: Mendeleeva.L@blood.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4966-8146>

*** Corresponding author**

Received 19 Mar 2019

Accepted 12 Sep 2019