

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Оценка потери гетерозиготности в STR-локусах опухолевой ДНК у пациентов с плазмоцитомами при множественной миеломе на основе молекулярного анализа сложных архивных образцов опухоли

Evaluation of Heterozygosity Loss in STR-Loci of Tumor DNA in Multiple Myeloma Patients with Plasmacytoma Based on the Molecular Analysis of Complex Archival Tumor Samples

Е.Е. Никулина¹, М.В. Фирсова¹, Н.В. Рисинская¹, Я.А. Кожевникова², М.В. Соловьев¹, Т.В. Абрамова¹, Т.Н. Обухова¹, А.М. Ковригина¹, А.Б. Судариков¹, Л.П. Менделеева¹

EE Nikulina¹, MV Firsova¹, NV Risinskaya¹, YaA Kozhevnikova², MV Solov'ev¹, TV Abramova¹, TN Obukhova¹, AM Kovrigina¹, AB Sudarikov¹, LP Mendeleeva¹

¹ ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

¹ National Research Center for Hematology, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

² Факультет фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ломоносовский пр-т, д. 27-1, Москва, Российская Федерация, 119192

² Faculty of Fundamental Medicine, MV Lomonosov Moscow State University, 27-1 Lomonosovskii pr-t, Moscow, Russian Federation, 119192

РЕФЕРАТ

Актуальность. Множественная миелома (ММ) — злокачественная опухоль системы крови, субстратом которой являются плазматические клетки. Иногда при ММ отмечается появление костных и внекостных опухолей — плазмоцитом. Парафиновый блок, содержащий субстрат плазмоцитомы, — ценный материал, который можно использовать для изучения молекулярно-биологических характеристик опухоли. Методом, позволяющим одновременно оценить степень деградации ДНК и дать интегральную оценку стабильности генома опухоли, является STR-профилирование.

Цель. Дать характеристику STR-профилей ДНК плазмоцитом, выделенной из архивных образцов, оценить интегральную стабильность генома опухоли относительно контрольной ДНК пациентов.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование включено 10 пациентов с ММ, осложненной плазмоцитомой (7 женщин, 3 мужчины), в возрасте 34–62 года (медиана 53,5 года), которые находились на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ с 2013 по 2021 г. У всех 10 пациентов удалось выделить парные образцы ДНК опухоли/контроля.

Результаты. В работе сделан первый шаг к масштабному молекулярно-генетическому исследованию ММ, собраны первые данные о потере гетерозиготности (ПГ) в геноме плазмоцитом. У всех 10 пациентов выявлены варианты ПГ с разной аллельной нагрузкой, которые предполагают делецию/количественно нейтральную ПГ либо дупликацию одного из двух аллелей, затрагивающие 1–8 STR-локусов. Наблюдалась тенденция к большему числу локусов с ПГ в субстрате плазмоци-

ABSTRACT

Background. Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy with plasma cells as substrate. Sometimes MM is characterized by plasmacytomas, i.e., intra- and extraosseous tumors. A paraffin block containing plasmacytoma substrate provides valuable material to be used for analyzing the molecular biological characteristics of tumor. STR-profiling is a method for simultaneous evaluation of DNA degradation and integral assessment of tumor genome stability.

Aim. To describe STR-profiles of plasmacytoma DNA isolated from archival samples and to assess the integral stability of tumor genome against control DNA of patients.

Materials & Methods. The retrospective study enrolled 10 MM patients with plasmacytoma (7 women and 3 men) aged 34–62 years (median 53.5 years) who were treated at the National Research Center for Hematology from 2013 to 2021. Paired tumor/control DNA samples were obtained from all 10 patients.

Results. The present paper takes the first step in attempting a large-scale molecular genetic study of MM and provides first findings on the loss of heterozygosity (LOH) in plasmacytoma genome. All 10 patients showed LOH variants with different allelic loads having either deletion/quantitatively neutral LOH or duplication of one of the two alleles and involving 1–8 STR-loci. In plasmacytoma substrate the number of loci with LOH tended to be higher in the group with MM relapses compared with plasmacytomas identified at disease onset. According to the data analysis, LOH was frequently (in 4 out of 10 cases) detected on chromosomes 1 (1q42), 6 (6q14), 7 (7q21.11), 13 (13q31.1), and 21 (21q21.1).

том из группы с рецидивами ММ по сравнению с плазмоцитомами, выявленными в дебюте заболевания. При анализе данных отмечена часто встречающаяся ПГ (4 из 10 случаев) на следующих хромосомах: 1 (1q42), 6 (6q14), 7 (7q21.11), 13 (13q31.1), 21 (21q21.1).

Заключение. Представленная работа демонстрирует эффективность молекулярного анализа ДНК, выделенной из сложного архивного материала парафиновых блоков плазмоцитом.

Ключевые слова: множественная миелома, плазмоцитома, потеря гетерозиготности, STR-профиллирование.

Получено: 25 октября 2021 г.

Принято в печать: 28 января 2022 г.

Для переписки: Елена Евгеньевна Никулина, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167; e-mail: lenysh2007@rambler.ru

Для цитирования: Никулина Е.Е., Фирсова М.В., Рисинская Н.В. и др. Оценка потери гетерозиготности в STR-локусах опухолевой ДНК у пациентов с плазмоцитомами при множественной миеломе на основе молекулярного анализа сложных архивных образцов опухоли. Клиническая онкогематология. 2022;15(2):156–66.

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-156-166

Conclusion. The present paper shows the effectiveness of molecular analysis of DNAs being isolated from complex archival material consisting of paraffin blocks with plasmacytomas.

Keywords: multiple myeloma, plasmacytoma, loss of heterozygosity, STR-profiling.

Received: October 25, 2021

Accepted: January 28, 2022

For correspondence: Elena Evgen'evna Nikulina, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; e-mail: lenysh2007@rambler.ru

For citation: Nikulina EE, Firsova MV, Risinskaya NV, et al. Evaluation of Heterozygosity Loss in STR-Loci of Tumor DNA in Multiple Myeloma Patients with Plasmacytoma Based on the Molecular Analysis of Complex Archival Tumor Samples. Clinical oncohematology. 2022;15(2):156–66. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-156-166

ВВЕДЕНИЕ

Множественная миелома (ММ) — это злокачественное лимфопролиферативное заболевание, субстратом которого являются плазматические клетки. Согласно современным критериям, диагноз симптоматической ММ ставят при выявлении не менее 10 % плазматических клеток в костном мозге (КМ) и/или гистологически подтвержденной плазмоцитоме в сочетании с признаками симптомокомплекса CRAB (С — гиперкальциемия, R — нарушение функции почек, A — анемия, B — поражение костей скелета) либо маркерами активности опухоли [1]. Плазмоцитома — это состоящее из опухолевых плазматических клеток новообразование, которое может формироваться в любых органах и тканях. Существует два типа плазмоцитом в зависимости от локализации опухоли: костная и экстрамедуллярная. Костная плазмоцитома диагностируется в случае, если опухоль разрушает корковый слой кости и выходит за ее пределы. В дебюте ММ костная плазмоцитома обнаруживается у 7–35 % больных [2–4]. При гематогенной диссеминации опухолевые плазматические клетки из КМ попадают в различные органы и ткани, формируя в них экстрамедуллярный очаг, т. е. экстрамедуллярную плазмоцитому. Данный вид поражения встречается реже (около 2–5 % случаев в дебюте ММ) и служит фактором неблагоприятного прогноза, маркером агрессивного течения опухоли [2, 4]. Нередко у одного больного наблюдается одновременное развитие нескольких костных и экстрамедуллярных плазмоцитом. Высока частота развития плазмоцитомы при рецидивах ММ, особенно если в дебюте заболевания имело

место экстрамедуллярное поражение. Плазмоцитома при рецидиве ММ может появиться на месте ранее выявленной опухоли или же локализоваться в других органах и тканях. Согласно данным литературы, частота развития костных плазмоцитом в дебюте и при рецидивах ММ совпадает [2]. Экстрамедуллярные плазмоцитомы при рецидивах ММ встречаются несколько чаще и составляют 3–10 % наблюдений [2].

Механизмы патогенеза плазмоцитом изучены недостаточно. При ММ пролиферация опухолевых плазматических клеток в КМ зависит от микроокружения [5]. Микроокружение в КМ — сложная система, состоящая из стромы и межклеточного матрикса. Стромальные клетки КМ участвуют в выработке факторов роста, цитокинов. Межклеточный матрикс состоит из протеогликанов, различных типов коллагена, адгезивных белков. Передача сигналов к плазматическим клеткам происходит в межклеточном матриксе. Костномозговое микроокружение регулирует сигнальные каскады, запускающие основные звенья канцерогенеза. Вопрос, почему опухолевая плазматическая клетка в ряде случаев покидает КМ и формирует внекостномозговую «автономную» опухоль, остается открытым. Считается, что развитию плазмоцитом способствует разобщение опухолевой плазматической клетки с микроокружением КМ посредством утраты молекул клеточной адгезии (CD56, VLA-4, CD44), дерегуляции хемокиновых рецепторов (CCR1, CCR2, CXCR4). Мембранные белки тетраспанины (CD81, CD82) принимают участие в процессах миграции и инвазии миеломных клеток, соответственно предполагается их участие в распространении опухолевых плазмоцитов за пределы КМ

[6–8]. Снижению адгезии клеток к строме КМ может способствовать избыток гепараназы-1, которая разрушает гепарансульфат — компонент межклеточного матрикса. Плазматические клетки плазмоцитомы приобретают свойства, позволяющие им выживать вне КМ. Опухолевые клетки плазмоцитомы усиливают неоангиогенез. Так, при иммуногистохимическом исследовании биоптатов экстрамедуллярных очагов выявляется высокая экспрессия опухолевыми клетками фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [9].

В 2017 г. представлены результаты секвенирования генома плазматических клеток, взятых из различных локусов у одного и того же больного (КМ, плазмоцитомы, очаг деструкции в кости), а также проанализировано множество образцов тканей у 51 пациента с ММ [10]. Авторы продемонстрировали пространственную геномную гетерогенность у более 75 % больных. В очагах поражения, отдаленных от КМ, могут существовать субклоны, которые отличаются от родоначального клона костномозговых опухолевых клеток. В очагах плазмоцитомы могут наблюдаться новые хромосомные аномалии и мутации, что свидетельствует о необходимости прицельного изучения субстрата плазмоцитомы для понимания биологии экстрамедуллярного поражения.

В научной литературе представлены результаты исследований плазмоцитомы в малых выборках больных [7, 11, 12]. Сложности в исследовании патогенеза плазмоцитомы обусловлены рядом факторов. Прежде всего стоит отметить, что опухоли, возникающие вследствие гематогенного распространения плазматических клеток, крайне редки. При отсутствии сомнений в диагнозе ММ выполнение биопсии экстрамедуллярного новообразования не является обязательным. При ММ хирургическое вмешательство не применяется в качестве метода лечения. По этой причине при отсутствии необходимости биопсии новообразования с диагностической целью субстрат плазмоцитомы не исследуется. Кроме того, возможны технические сложности в выполнении биопсии опухоли, обусловленные труднодоступной локализацией плазмоцитомы. Таким образом, комплексное (гистологическое, иммуногистохимическое, молекулярное, цитогенетическое) исследование субстрата плазмоцитомы у значительной когорты больных лимитировано малым объемом диагностического материала. Исследование субстрата плазмоцитомы выполняется в тех случаях, когда именно после биопсии новообразования подтверждается плазматическая природа опухоли и дальнейший поиск приводит к диагностике ММ. Как правило, парафиновый блок, содержащий субстрат плазмоцитомы, является ценным материалом, который можно использовать для прицельного изучения молекулярно-биологических характеристик опухоли. В связи с этим актуально исследование опухолевого субстрата плазмоцитомы, представленного в парафиновых блоках. В ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ собрана коллекция блоков костных и экстрамедуллярных плазмоцитом, выявленных в дебюте и при рецидивах ММ.

В диагностике онкогематологических заболеваний большое значение имеют молекулярные методы исследований, основу которых составляет

полимеразная цепная реакция (ПЦР) и последующий анализ ПЦР-продуктов. Молекулярно-генетические исследования позволяют выявить участки генома, которые часто претерпевают изменения при неоплазиях; они способствуют поиску ключевых генов, играющих причинную роль в онкогенезе [13]. В процессе диагностики часто возникает необходимость экстракции генетического материала не только из периферической крови (ПК) и пунктата КМ, но и из сред организма, содержащих малое количество ДНК: сыворотка, буккальный эпителий, стекловидное тело, ликвор, плевральная жидкость и др. Кроме того, в гематологической лабораторной практике нередко приходится проводить ПЦР-диагностику на архивных препаратах с низким содержанием клеток, таких как мазки ПК, КМ. Наконец, цитологические образцы бывают необходимы при отсутствии иного альтернативного исходного материала.

Задачами данной работы были выделение ДНК из парафиновых блоков костных и экстрамедуллярных плазмоцитом, выявленных в дебюте и при рецидивах ММ, а также выделение контрольной ДНК из архивных цитологических препаратов КМ и оценка полученного генетического материала на пригодность к дальнейшим молекулярным исследованиям. С учетом сложности и малого объема опухолевого субстрата плазмоцитомы мы выбрали и применяли оптимальные методики выделения ДНК из образцов разного типа. Методом, позволяющим одновременно оценить степень дегградации ДНК и дать интегральную оценку стабильности генома опухоли, является STR-профилирование.

Короткие tandemные повторы (STR), также известные как микросателлиты, представляют собой повторяющиеся последовательности ДНК длиной 1–9 пар нуклеотидов, составляют около 3 % генома человека, стабильны в течение жизни индивидуума и в силу высокой полиморфности аллелей в популяции представлены у человека преимущественно в гетерозиготной форме. Уникальность STR-профиля каждого человека позволяет использовать STR-анализ для определения родства, идентификации личности в криминалистике, а также для мониторинга химеризма после трансплантации аллогенного КМ. При сравнении STR-профилей ДНК лимфоцитов и опухолевой геномной ДНК пациента при разных нозологиях часто наблюдается потеря гетерозиготности (ПГ) в локусах исследуемых микросателлитов, связанная с хромосомными aberrациями, характерными для данного вида опухоли.

Цель настоящей работы — дать характеристику STR-профилей ДНК плазмоцитомы, выделенной из архивных и фиксированных образцов, а также оценить интегральную стабильность генома опухоли относительно контрольной ДНК пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование включено 10 пациентов с диагнозом ММ (7 женщин, 3 мужчины) в возрасте 34–62 года (медиана 53,5 года), которые находились на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ

РФ с 2013 по 2021 г. У всех больных выявлены плазмоцитомы (у 3 — костные, у 7 — экстрамедуллярные). У 5 пациентов плазмоцитомы обнаружены в дебюте ММ, у других 5 — появление плазмоцитом зафиксировано при рецидивах заболевания. У 7 пациентов одновременно отмечалось несколько плазмоцитом различных органов и тканей. Костные плазмоцитомы выявлены в черепе, позвонках; локализация экстрамедуллярных плазмоцитом была разнообразной и включала специфическое поражение плевры, ткани яичка, яичника, небной миндалины, желудка, мягких тканей грудной стенки, лимфатических узлов шеи. ММ устанавливали в соответствии с критериями Международной рабочей группы по изучению ММ (IMWG) 2014 г. [1].

Всем больным выполнялся полный спектр необходимых лабораторных исследований: гемограмма, биохимический анализ крови, иммунохимический анализ белков сыворотки и суточной мочи, цитологическое исследование миелограммы, гистологическое исследование трепанобиоптата КМ. Стандартное цитогенетическое исследование клеток КМ проводилось 6 больным. Всем пациентам выполнена биопсия плазмоцитомы с целью подтвердить плазмоклеточную природу опухоли. Инструментальная диагностика включала выполнение КТ костей скелета (череп, позвоночника, таза). У большинства пациентов имели место распространенные стадии болезни по классификации Durie—Salmon. У 4 больных наблюдалась моноклональная секреция парапротеина G, у 2 — парапротеинемия A, у 2 — выявлена миелома Бенс-Джонса (BJ), в 2 наблюдениях констатирована не-секретирующая форма ММ. У 4 из 6 больных, которым проводилось цитогенетическое исследование клеток КМ, выявлены аномалии высокого риска: t(4;14) у 3 пациентов, del(17p13) — у 2. Клинико-лабораторная характеристика больных представлена в табл. 1.

Молекулярные исследования проводились с использованием следующих биологических материалов: пунктат КМ, клетки крови, цитологический препарат (мазки КМ, ПК), опухолевая ткань лимфатического узла, фиксированный биопсийный материал из парафинового блока. ДНК выделяли из свежзамороженной ткани и фиксированного материала. Материал в парафиновых блоках отличался разнообразием: костная ткань черепа, позвонка, таза, биоптаты лимфатического узла, желудка. Фрагменты ткани заливали насыщенным 25% раствором аммиака и растворяли в течение 2 дней в термостате при температуре 56 °С с последующей нейтрализацией уксусной кислотой и одновременным высаливанием белков образующимся раствором ацетата аммония. Далее осаждали ДНК изопропиловым спиртом и отмывали от солей 96% этиловым спиртом [14]. В работу для постановки ПЦР брали 4 мкл ДНК, растворенной в воде.

ДНК с цитологических окрашенных препаратов ($n = 3$) выделяли методом прямого лизиса клеток с протеиназой К. На цитологические мазки наносили 1 каплю (20 мкл) буфера, затем клетки снимали пипетированием с поверхности стекла и переносили в пробирки типа «Эппендорф». Клетки суспендировали в 20 мкл лизисного буфера (0,5% NP40, 50 ммоль Трис (pH 8,3), 75 ммоль калия хлорида, 20 мкг протеиназы К),

инкубировали при температуре 56 °С в течение 60 мин с последующим нагреванием в течение 15 мин до 100 °С (для инактивации протеиназы К). Лизаты подвергали центрифугированию в центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) в течение 1 мин при 13 000 об/мин. Для каждой реакции использовали по 4 мкл супернатанта (2/10 от общего количества) [15]. ДНК из клеток крови ($n = 4$) и КМ ($n = 3$) выделяли модифицированным методом солевой экстракции, основу которого составляет осаждение белков насыщенным раствором аммония хлорида с последующим осаждением ДНК изопропиловым спиртом и промывкой от солей 70% этиловым спиртом [16].

Оценку STR-профиля проводили с использованием наборов COrDIS (ООО «Гордиз», Россия). При этом осуществляли сравнение контрольных образцов цитологических препаратов в виде мазков ПК или пунктата КМ с опухолевыми субстратами различных локализаций (костная ткань черепа, таза, позвонка, биоптаты лимфатического узла, желудка). STR-профили для каждой пары образцов (опухоль/контроль) оценивали с помощью ПЦР с праймерами к 19 тетрауклеотидным STR-маркерам и маркеру амелогенина, доступным в мультиплексном наборе COrDIS Plus (ООО «Гордиз», Россия). Условия ПЦР, рекомендованные производителем набора COrDIS Plus: 94 °С (3 мин); 4 цикла: 98 °С (30 с), 59 °С (120 с), 72 °С (90 с); 6 циклов: 94 °С (30 с), 59 °С (120 с), 72 °С (90 с); 18 циклов: 90 °С (30 с), 59 °С (120 с), 72 °С (75 с); 68 °С (10 мин). Фрагментный анализ ПЦР-продуктов выполняли на генетическом анализаторе «Нанофор-05» («СИНТОЛ», Россия). Флюоресценцию амплификатов и их профиль (распределение по длинам) анализировали с помощью программного обеспечения GeneMapper v.4 (Applied Biosystems, США). У всех пациентов с изменением аллельного баланса в гетерозиготных STR-локусах опухолевой ДНК по сравнению с контрольной рассчитывали относительное снижение уровня флюоресцентного сигнала минорного аллеля в процентах (рис. 1).

При потере аллеля на 80–90 % событие рассматривали равновероятно как делецию или количественно нейтральную ПГ (см. рис. 1). При снижении доли аллеля до 40–50 % событие рассматривали как дупликацию мажорного аллеля в опухолевых клетках (отношение аллелей 2:1 и примесь небольшого количества здоровых клеток). Такое предположение представляется корректным, поскольку в биоптате опухоли доля здоровых клеток мала и практически у всех пациентов ее можно было определить, ориентируясь на локусы с высокими показателями ПГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У всех 10 пациентов удалось выделить парные образцы ДНК опухоли/контроля. STR-анализ показал существенную деградацию ДНК, выделенной из парафиновых блоков костной ткани («возраст» блоков 91 мес. у пациентки № 8 и 54 мес. у пациента № 9) (рис. 2). В то же время деградация ДНК, выделенной из парафиновых блоков мягких тканей, даже из блока «возрастом» 96 мес. (пациентка № 5) была незначительной.

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с ММ, осложненной развитием плазмцитом

Показатель	Пациент №									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Пол	Ж	М	Ж	М	Ж	Ж	Ж	Ж	М	Ж
Возраст, лет	55	53	62	62	47	50	34	43	59	54
Тип плазмцитомы	Э	Э	Э	К	Э	Э	Э	К	К	Э
Локализация	Плевра	Яичко	Нёбная миндалина	Клиновидная кость	Желудок	Мягкие ткани грудной стенки	Яичник	Позвонок С _{III}	Лобная кость	Лимфатические узлы шеи
Время формирования плазмцитомы	Дебют	Дебют	Дебют	Дебют	Дебют	Рецидив	Рецидив	Рецидив	Рецидив	Рецидив
Наличие плазмцитомы иной локализации	Ребро, таз	Нет	Нет	Нет	Грудина, ребра, лопатка, череп	Череп, таз, позвонки, лопатка (дебют)	Позвонки Th _I , Th _{IX} (дебют)	Череп (рецидив)	Грудина, ребра (рецидив)	X ребро (дебют)
Плазматические клетки в миелограмме, %	58	1,5	4	12	25	41	58	Нет данных	20	3,4
Цитогенетические аномалии	t(4;14), амплификация 1q21 (+1 дополнительный сигнал)	Делеция в регионе 14q32?	Нет данных	Амплификация 1q21 (+1 дополнительный сигнал)	Нет данных	t(4;14), del(17p13), del(13q), del(1p32), амплификация 1q21 (+1 дополнительный сигнал), трисомия 5, 1 дополнительный сигнал от локуса 8q24 гена <i>cMUS</i>	t(4;14), амплификация 1q21 (+1 дополнительный сигнал)	del(17p13) (рецидив)	Нет данных	Нет данных
Тип секреции	Гк + ВJк	Несекретирующая	Несекретирующая	Ак + СЛЦ к	ВJк	Гк + ВJк	Ак + ВJк	Гк + ВJк	ГЛ	ВJк
Стадия по Durie—Salmon	IIIB	IIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA	IIIA	IIA	IIA
Стадия по ISS	III	I	I	I	II	III	II	Нет данных	III	Нет данных

ВJ — Бенс-Джонса; ISS — Международная прогностическая система; К — костная; ММ — множественная миелома; СЛЦ — свободные легкие цепи; Э — экстрамедуллярная.

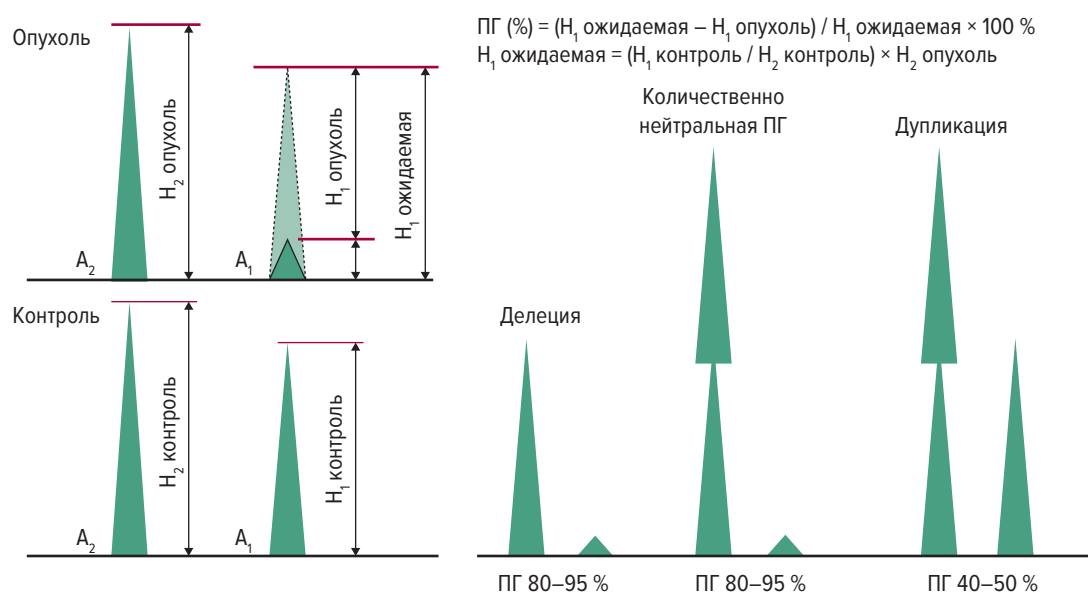


Рис. 1. Расчет относительной величины (%) потери гетерозиготности в исследуемых локусах STR

H — высота пика флуоресценции ампликона исследуемого гетерозиготного STR-локуса; контроль — ДНК из лимфоцитов периферической крови или костного мозга; опухоль — ДНК из образцов плазмцитомы; ПГ — потеря гетерозиготности.

Fig. 1. Calculation of relative (%) loss of heterozygosity in STR-loci under analysis

H — fluorescence peak height of heterozygous STR-locus amplicon; контроль — DNA from peripheral blood lymphocytes or bone marrow; опухоль — DNA from plasmacytoma samples; ПГ — loss of heterozygosity.

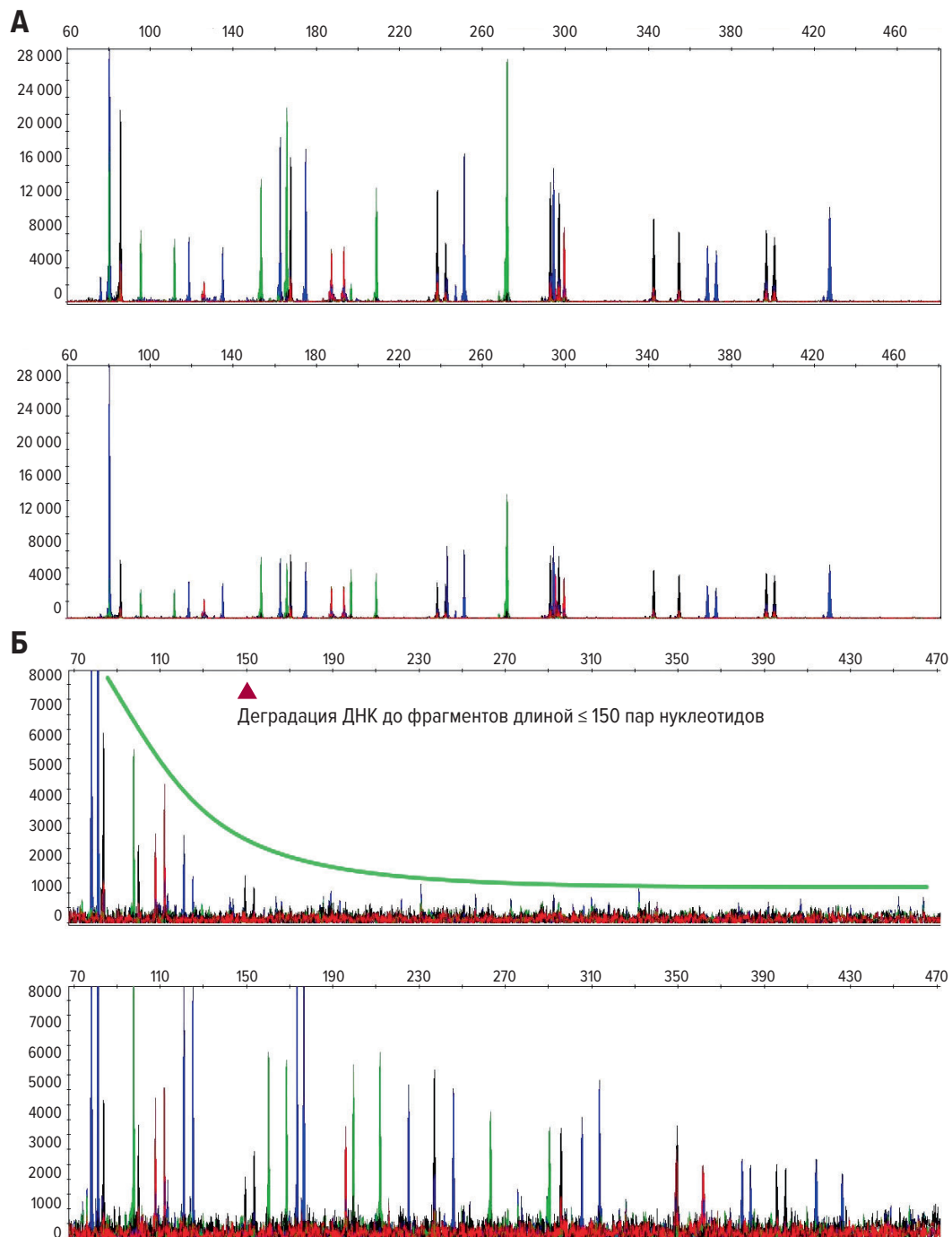


Рис. 2. Примеры STR-профиля опухолевой ДНК, выделенной из (А) нефиксированного или свежемороженого биоптата плазмоцитомы и (Б) парафинового блока («возраст» блока 54 мес.). Верхняя электрофореграмма на каждом рисунке — STR-профиль опухоли, нижняя электрофореграмма — контрольный STR-профиль

Fig. 2. STR-profiles of tumor DNA isolated from (A) non-fixed or fresh frozen plasmacytoma biopsy sample and (B) paraffin block (stored for 54 months). On each image, the upper electropherogram shows the tumor STR-profile, and the lower electropherogram shows the control STR-profile

Не удалось получить ПЦР-продукт только с самых длинных ДНК-мишеней (350–450 пар нуклеотидов).

В процессе дальнейшей работы предполагается использование более эффективных методик для выделения и очистки ДНК из костной ткани. Выделение нуклеиновых кислот из парафиновых блоков — в принципе один из самых сложных этапов данной работы, т. к. блоки имеют ряд особенностей при приготовлении и хранении [17–19]. Блоки могут храниться десятилетиями в сухом и темном месте, при температуре до 23–25 °С. При нарушении данных ус-

ловий, особенно при воздействии на блок различных температур (высокая ≥ 50 °С или низкая; при высокой температуре парафин плавится, при низкой — крошится), происходит разрушение и деградация ДНК. В связи с этим «возраст» блока всегда учитывается при работе с ним. На этапах приготовления блока ткань фиксируется, затем проходит промывку ткани водой, далее — обезвоживание и уплотнение фиксированного материала и, наконец, заливка ткани в парафиновый блок и изготовление срезов. Все эти процедуры влияют на качество и дальнейшую

очистку ДНК. На этапе фиксации ткани происходит коагуляция белков, слипание ДНК молекул друг с другом и с близлежащими белками. Естественно, если нарушена методика изготовления блока или допущены ошибки на этапах фиксации (плохо отмыта ткань или избыточное время фиксации в формалине), качество выделенной ДНК ухудшается независимо от выбранного метода экстракции нуклеиновых кислот. Учитывая всю сложность материала, с которым мы работали (костная ткань в парафиновом блоке), мы дали удовлетворительную оценку STR-профилям образцов на коротких недеградированных участках ДНК. У всех 10 пациентов выявлены варианты ПГ с разной аллельной нагрузкой, предполагающей либо делецию/количественно нейтральную ПГ, либо дупликацию 1 из 2 аллелей, затрагивающие 1–8 STR-локусов (табл. 2).

Особое внимание обращено на 2 больных, у которых наблюдалось максимальное число вовлеченных локусов с наличием ПГ: пациент № 4 (7 локусов) и пациентка № 7 (8 локусов) (рис. 3).

Пациент № 4 с ММ, 62 года, у которого в дебюте заболевания отмечена плазмоцитома клиновидной кости. Начало заболевания характеризовалось выраженной неврологической симптоматикой, обусловленной сдавлением плазмоцитомой структур головного мозга. Отмечались и иные факторы неблагоприятного прогноза: секреция парапротеина типа А, наличие плазматических клеток в ПК, по данным цитогенетического анализа КМ выявлена амплификация 1q21 (+1 дополнительный сигнал). Терапия первой линии, включавшая 6 курсов со схемой VCD (бортезомиб, циклофосфамид, дексаметазон), привела к достижению иммунохимической ремиссии, хотя размеры плазмоцитомы уменьшились всего в 2 раза. Полученный результат позволяет говорить лишь о достигнутой частичной ремиссии заболевания. В настоящее время больному проводится высокодозный этап, включающий трансплантацию аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК).

Пациентка № 7 с ММ, 34 года, у которой рецидив болезни сопровождался экстрамедуллярной плазмоцитомой яичника (в дебюте заболевание протекало с наличием костных плазмцитом с поражением грудных позвонков). У этой больной также выявлялась секреция парапротеина типа А, по данным цитогенетического анализа клеток КМ в дебюте ММ определена аномалия высокого риска — $t(4;14)$ и амплификация 1q21 (+1 дополнительный сигнал). Пациентке проводится специфическая противоопухолевая терапия следующей линии по схеме VRD (бортезомиб, леналидомид, дексаметазон). При достижении противоопухолевого ответа планируется обсуждение возможности высокодозной химиотерапии с последующей аутоТГСК ввиду множественных факторов крайне неблагоприятного прогноза и возраста (< 60 лет).

В субстрате плазмоцитом, обнаруженных при рецидивах ММ ($n = 5$), по сравнению с плазмоцитомами, выявленными в дебюте заболевания ($n = 5$), наблюдалась тенденция к большему числу локусов с ПГ.

В опухолевом субстрате плазмоцитом, выявленных при рецидиве ММ, часто встречается ПГ в локусах SE33 (6q14) (4 из 5 случаев) и VWA (12p13.31) (3 из 5 случаев). При этом в субстрате плазмоцитом, диагностированных в дебюте ММ, подобные события не отмечены ни в одном наблюдении. ПГ в локусе SE33 в 2 случаях рассматривалась как делеция или количественно нейтральная ПГ (90 %, пациентки № 6 и 8), в 2 наблюдениях — как дупликация одного аллеля (46 и 49 % соответственно, пациентки № 7 и 10).

В работе Y. Liu и соавт. молекулярно-цитогенетическое исследование (SNP-array), выполненное 3 больным ММ, в 1 случае выявило делецию 6q в ДНК, выделенной из субстрата плазмоцитомы. При этом в ДНК, выделенной из клеток КМ этого больного, данное генетическое событие не определялось [20]. Плазмоцитома у этого пациента обнаружена при рецидиве болезни, как и в случаях, представленных нами.

Y. Liu и соавт. применили комплексный подход к изучению опухоли с использованием всего арсенала современных методов исследований (цитогенетический анализ, хромосомный микроматричный анализ, секвенирование нового поколения). Изучался опухолевый субстрат КМ и плазмоцитомы. Авторы показали, что по сравнению с КМ более сложные геномные нарушения выявлялись в плазмоцитомах — еще одно свидетельство клональной эволюции. Так, по данным молекулярно-генетического исследования во всех 3 случаях в субстрате плазмоцитом наблюдалась гипердиплоидия с приростом нечетных хромосом (хромосомы 3, 5, 7, 9, 11, 15 и 19). В 1 наблюдении авторы отметили количественно-нейтральную ПГ большинства хромосом, что является крайне редким генетическим событием при ММ [20].

В настоящей работе сделан первый шаг к подобному масштабному молекулярно-генетическому исследованию ММ. Показано, что возможен молекулярный анализ ДНК, выделенной из сложных архивных образцов, и собраны первые данные о ПГ в геноме плазмоцитом.

Одним из хорошо изученных сигнальных путей, участвующих в канцерогенезе в общем и в патогенезе ММ в частности, является многокомпонентный Ras-Raf-MAP-киназный путь. Сигналы, передаваемые по пути RAS/MAPK, усиливаются при прогрессировании заболевания, что определяет способность опухолевой клетки к росту, метастазированию, уходу от апоптоза. По литературным данным, мутации в генах семейства RAS (*NRAS*, *KRAS*, *BRAF*) встречаются менее чем в 10 % случаев при моноклональной гаммапатии неясного значения (МГНЗ), в 50 % — при симптоматической ММ и более чем в 70 % случаев плазмноклеточного лейкоза, что указывает на активацию этого пути на разных этапах прогрессирования опухоли [21–24]. По данным секвенирования нового поколения, выполненного 6 больным ММ (при этом в 4 наблюдениях проведено парное исследование: ДНК опухолевых клеток КМ и плазмоцитомы), мутации в генах семейства RAS выяв-

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на малую выборку настоящего пилотного исследования, отмечены следующие особенности.

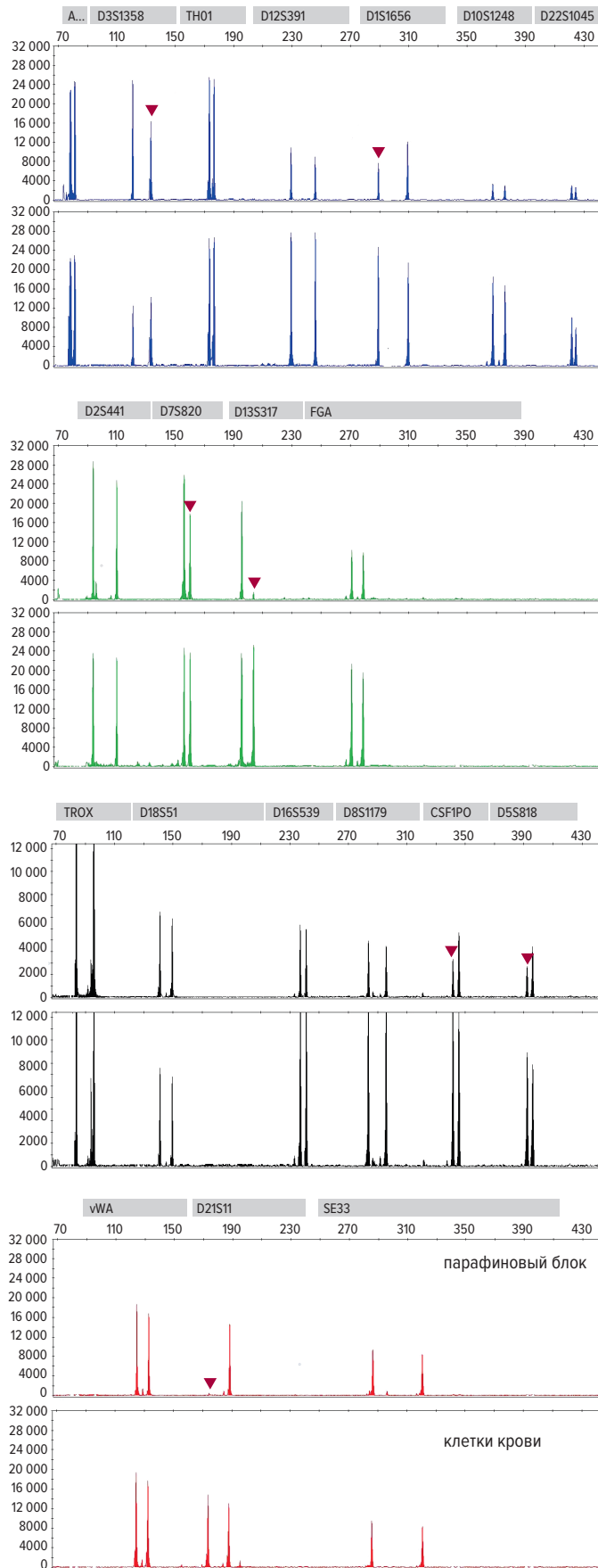
Таблица 2. Распределение локусов STR с аллельным дисбалансом (результаты STR-анализа)

Показатель	Пациент №									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Плевральный выпот/КМ	Парафиновый блок П. яичка/КМ	Парафиновый блок П. яичка/КМ	Парафиновый блок П. яичка/КМ	Парафиновый блок П. яичка/КМ	Парафиновый блок П. желудка/цитологический препарат КМ	Биопат П. мягкой тканой грудной стенки/клетки крови	Биопат П. яичника / цитологический препарат КМ	Парафиновый блок П. позвонка С _{III} /клетки крови	Парафиновый блок П. лобной кости/цитологический препарат КМ	Парафиновый блок П. лимфатических узлов шеи/клетки крови
Материал/контроль	Парафиновый блок П. миндалина/КМ	Парафиновый блок П. миндалина/КМ	Парафиновый блок П. миндалина/КМ	Парафиновый блок П. костной ткани/клетки крови	Парафиновый блок П. желудка/цитологический препарат КМ	Парафиновый блок П. желудка/цитологический препарат КМ	Парафиновый блок П. желудка/цитологический препарат КМ	Парафиновый блок П. желудка/цитологический препарат КМ	Парафиновый блок П. желудка/цитологический препарат КМ	Парафиновый блок П. желудка/цитологический препарат КМ
«Возраст» блока	13 мес.	13 мес.	13 мес.	7 мес.	96 мес.	—	—	91 мес.	54 мес.	8 мес.
ПГ	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
D1S1656 (1q42)	—	49 %	—	42 %	40 %	Гз	85 %	Дег	Дег	—
D2S441 (2p14)	—	Гз	—	—	—	—	—	—	Гз	78 %
D3S1358 (3p21.31)	—	—	—	40 %	—	—	—	39 %	44 %	—
D5S818 (5q23.2)	—	Гз	—	44 %	Дег контроля	—	—	Дег	Дег	Дег
D7S820 (7q21.11)	29 %	46 %	—	31 %	—	41 %	—	—	Дег	—
D8S1179 (8q24.13)	Гз	—	—	—	—	—	—	Дег	Дег	Дег
D10S1248 (10q26.3)	—	—	—	—	—	—	Гз	Дег	Дег	Гз
D12S391 (12p13.2)	—	Гз	Гз	—	—	89 %	72 %	—	Дег	Гз
D13S317 (13q31.1)	Гз	45 %	—	92 %	—	91 %	90 %	—	Дег	Гз
D16S539 (16q24.1)	—	49 %	Гз	—	96 %	45 %	Гз	—	Дег	Дег
D18S51 (18q21.33)	—	Гз	—	—	—	Гз	—	—	—	—
D21S11 (21q21.1)	Гз	45 %	—	90 %	—	—	40 %	53 %	Дег	—
D22S1045 (22q12.3)	—	—	—	—	Дег	Гз	—	Дег	Дег	—
CSF1PO (5q33.1)	—	Гз	66 %	45 %	—	—	—	Дег	Дег	Дег
FGA (4q31.3)	—	—	—	—	—	Гз	41 %	38 %	Дег	Дег
SE33 (6q14)	—	—	—	—	—	90 %	46 %	90 %	Дег	49 %
TH01 (11p15.5)	37 %	—	—	—	—	—	47 %	—	Дег	38 %
TPOX (2p25.3)	—	—	—	—	Гз	Гз	—	—	49 %	—
VWA (12p13.31)	—	—	—	—	—	Гз	51 %	—	33 %	85 %
Амелогенин X (Xp22.1–22.3)	—	—	—	—	—	—	—	—	29 %	—
Всего локусов с ПГ	2	5	1	7	2	5	8	4	4	4
Информативные локусы	18	16	19	21	18	15	19	15	6	13
ПГ, % локусов	11 %	31 %	5 %	33 %	11 %	33 %	42 %	27 %	67 %	31 %

Дег — деградация ДНК; Гз — гомозиготный локус в контрольной ДНК; информативный локус — гетерозиготный, есть амплификация; КМ — костный мозг; контроль — ДНК из лимфоцитов периферической крови или костного мозга; нет — нет ПЦР-продукта по данному локусу; П — плазмоцитома; ПГ — потеря гетерозиготности.

А

STR- локус	D3S1358 (3p21.31)	D1S1656 (1q42)	D7S820 (7q21.11)	D13S317 (13q31.1)	CSF1PO (5q33.1)	D5S818 (5q23.2)	D21S11 (21q21.1)
ПГ, %	40	42	31	92	45	44	96



Б

STR- локус	TH01 (11p15.5)	D12S391 (12p13.2)	D1S1656 (1q42)	D13S317 (13q31.1)	FGA (4q31.3)	VWA (12p13.31)	D21S11 (21q21.1)	SE33 (6q14)
ПГ, %	47	72	85	90	41	50	40	46

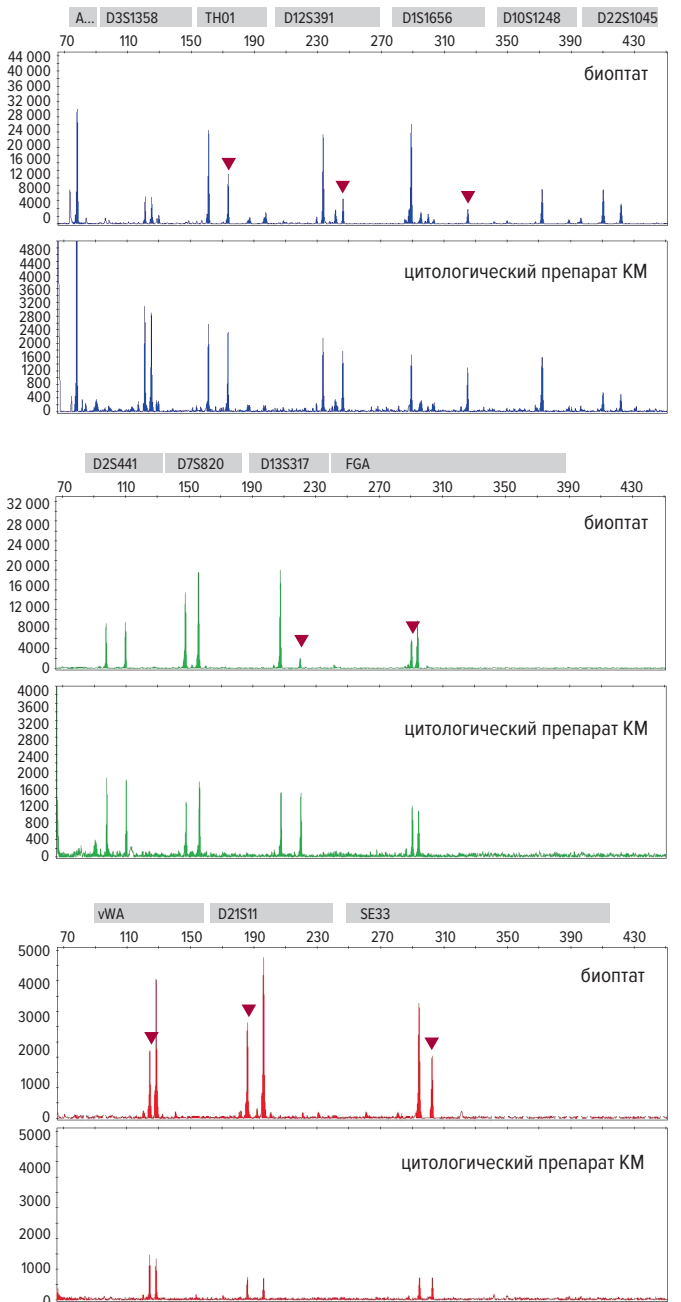


Рис. 3. Пример потери гетерозиготности с разной нагрузкой минорного аллеля в ряде STR-локусов у (А) пациента № 4 и (Б) пациентки № 7. Верхняя электрофореграмма на каждом рисунке — STR-профиль опухоли, нижняя электрофореграмма — контрольный STR-профиль. Данные в таблицах представлены в том же порядке, в каком показаны вовлеченные STR-локусы на электрофореграммах
КМ — костный мозг; ПГ — потеря гетерозиготности.

Fig. 3. Loss of heterozygosity with different loads of the minor allele in a line of STR-loci in (A) male patient No. 4 and (B) female patient No. 7. On each image, the upper electropherogram shows the tumor STR-profile, and the lower electropherogram shows the control STR-profile. Tables provide the data in the same order as the involved STR-loci are shown on electropherograms
КМ — bone marrow; ПГ — loss of heterozygosity.

лены у всех них. Чаще всего обнаруживались мутации в гене *KRAS* (3/6), мутации в генах *NRAS* и *BRAF* наблюдались в единичных случаях, причем как в КМ, так и в плазмцитоме [20]. Локализация гена *KRAS* — 12p12.1. В исследовании, проведенном нами, у 4 пациентов из группы с рецидивами ММ с плазмцитомой выявлены варианты ПГ в STR-локусах из соседних пробандов — D12S391 (12p13.2) (пациентки № 6 и 7) и VWA (12p13.31) (пациенты № 7, 9 и 10). Обычно ПГ в STR-локусах отражает хромосомные события на значительных участках ДНК, но иногда бывает вовлечено целое плечо хромосомы или даже вся хромосома. Скорее всего, не только мутации в гене *KRAS*, но и изменение числа копий этого гена влияют на агрессивное течение заболевания, а маркером изменения количества копий может быть именно ПГ в ближних к гену-мишени локусах STR.

Кроме того, мы отметили, что ПГ в локусе D3S1358 (3p21.31) выявлена в 3 из 10 проанализированных образцов плазмцитом (все плазмцитомы были костными). Обращаясь к основным генетическим нарушениям, характерным для ММ, можно отметить, что на хромосоме 3 (3p22.1) расположены гены *ULK4* (unc-51 like kinase 4) и *TRAK1* (trafficking kinesin protein 1). Активация этих генов (наряду с генами, находящимися в областях 2p и 7p) является ранним событием, повышающим риск развития МГНЗ и риск прогрессирования МГНЗ в симптоматическую ММ. Это стало известно благодаря результатам молекулярно-эпидемиологических исследований [25, 26]. Безусловно, требуется детальное изучение функциональной роли каждого гена. Выявленные ПГ в D3S1358 (3p21.31) с аллельной нагрузкой 39–44 % у 3 пациентов предполагают дупликацию участка хромосомы, возможно включающего и гены *ULK4*, *TRAK1*. Даже если в генах нет мутаций, увеличение количества копий этих генов тоже является неблагоприятным событием.

При анализе данных мы заметили часто встречающуюся ПГ (4 из 10 случаев) на следующих хромосомах: 1 (1q42), 6 (6q14), 7 (7q21.11), 13 (13q31.1), 21 (21q21.1). В.А. Walker и соавт. в своей работе также часто наблюдали ПГ на хромосомах 1, 6, 13. Кроме того, исследователи отнесли к частым событиям ПГ в регионах 8p и 16q при ММ [27].

Применительно к исследованию ПГ необходимо отметить, что у пациентов с ММ и высокой частотой ПГ в геноме показатели общей и бессобытийной выживаемости статистически значимо хуже, чем у пациентов с низким уровнем ПГ, согласно исследованию С. Pawlun и соавт. [28]. В другой работе авторы указали на корреляцию между количеством и долей выявленных аномалий генома и достижением противоопухолевого ответа, а также отметили, что прогрессирование ММ было связано со сложным кариотипом и увеличением копий 3q [29].

Возможно, исследование STR-профилей позволит разработать дополнительные прогностические критерии для выбора терапии ММ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстрамедуллярное поражение при ММ является фактором крайне неблагоприятного прогноза. Эта

редко встречающаяся патология мало изучена и трудно курабельна, несмотря на широкий спектр противоопухолевых лечебных подходов в современной гематологии. Ввиду того, что биопсия плазмцитомы не всегда выполняется, исследования субстрата опухоли ограничены. Известным считается тот факт, что ММ — клонально гетерогенное заболевание, а нестабильность генома является основой опухолевой прогрессии. В субстрате экстрамедуллярного очага определяются более сложные по сравнению с КМ геномные нарушения, что диктует необходимость углубленного изучения плазмцитом для лучшего понимания биологии ММ. В настоящей работе мы продемонстрировали возможность выделения ДНК из сложного архивного материала парафиновых блоков плазмцитом для последующего детального молекулярно-генетического анализа.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. А.М. Ковригина, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовала в рецензировании рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: все авторы.

Сбор и обработка данных: Е.Е. Никулина, Я.А. Кожевникова, Н.В. Рисинская, М.В. Фирсова.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: Е.Е. Никулина, Н.В. Рисинская, М.В. Фирсова.

Подготовка рукописи: Е.Е. Никулина, М.В. Фирсова, Н.В. Рисинская, А.Б. Судариков.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538–e548. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
2. Rosinol L, Beksac M, Zamagni E, et al. Expert review on soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: definition, disease assessment and treatment considerations. *Br J Haematol.* 2021;194(3):496–507. doi: 10.1111/bjh.17338.
3. Blade J, de Larrea FC, Rosinol L, et al. Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. *J Clin Oncol.* 2011;29(28):3805–12. doi: 10.1200/JCO.2011.34.9290.
4. Weinstock M, Ghobrial IM. Extramedullary multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(6):1135–41. doi: 10.3109/10428194.2012.740562.
5. Mitsiades CS, McMillin DW, Klippel S, et al. The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007;21(6):1007–34. doi: 10.1016/j.hoc.2007.08.007.
6. Vande Broek I, Vanderkerken K, Van Camp B, Van Riet I. Extravasation and homing mechanisms in multiple myeloma. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25(4):325–34. doi: 10.1007/s10585-007-9108-4.

7. Dahl IM, Rasmussen T, Kauric G, Husebekk A. Differential expression of CD56 and CD44 in the evolution of extramedullary myeloma. *Br J Haematol*. 2002;116(2):273–7. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03258.x.
8. Фирсова М.В., Менделеева Л.П., Ковригина А.М. и др. Экспрессия молекулы адгезии CD56 на опухолевых плазматических клетках в костном мозге как фактор прогноза при множественной миеломе. *Клиническая онкогематология*. 2019;12(4):377–84. doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-377-384.
[Firsova MV, Mendeleeva LP, Kovrigina AM, et al. Expression of Adhesion Molecule CD56 in Tumor Plasma Cells in Bone Marrow as a Prognostic Factor in Multiple Myeloma. *Clinical oncohematology*. 2019;12(4):377–84. doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-377-384. (In Russ)]
9. Paydas S, Zorludemir S, Baslamisli F, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in plasmacytoma. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(1):139–43. doi: 10.1080/10428190210203.
10. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*. 2017;8(1):1–11. doi: 10.1038/s41467-017-00296-y.
11. Weinstock M, Aljawai Y, Morgan EA, et al. Incidence and clinical features of extramedullary multiple myeloma in patients who underwent stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2015;169(6):851–8. doi: 10.1111/bjh.13383.
12. Firsova MV, Mendeleeva LP, Kovrigina AM, et al. Plasmacytoma in patients with multiple myeloma: morphology and immunohistochemistry. *BMC Cancer*. 2020;20(1):346. doi: 10.1186/s12885-020-06870-w.
13. Veroukhim R, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899–905. doi: 10.1038/nature08822.
14. Sidorova JV, Biderman BV, Nikulina EE, Sudarikov AB. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Exp Dermatol*. 2012;21(1):57–60. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01375.x.
15. Григорук О.Г., Пупкова Е.Э., Базулина Л.М., Лазарев А.Ф. Проведение молекулярно-генетических исследований с использованием ДНК клеток опухоли, полученных из цитологических препаратов. *Лабораторная служба*. 2017;6(1):23–8. doi: 10.17116/labs20176123-28.
[Grigoruk OG, Pupkova EE, Bazulina LM, Lazarev AF. The execution of molecular genetic tests using DNA of tumor cells obtained from cytologic preparations. *Laboratory Service*. 2017;6(1):23–8. doi: 10.17116/labs20176123-28. (In Russ)]
16. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В. и др. Определение минимальной остаточной болезни у больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом методом пациент-специфичной ПЦР. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011;12:22–35.
[Sidorova YuV, Sorokina TV, Biderman BV, et al. Minimal residual disease detection in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia by patient-specific PCR. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2011;12:22–35. (In Russ)]
17. Вязовская Н.С., Русина Г.Г., Азизова Т.В. и др. Возможность выделения ДНК из архивных тканей, полученных при аутопсии, для молекулярно-генетических исследований. *Архив патологии*. 2014;76(2):46–7.
[Vyazovskaya NS, Rusinova GG, Azizova TV, et al. Possibility of DNA isolation from archived autopsy tissues for molecular genetic studies. *Arkhiv patologii*. 2014;76(2):46–7. (In Russ)]
18. Ваганова А.Н. Гистотехнические решения для повышения качества препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из парафиновых блоков. *Гены и клетки*. 2014;9(2):96–101.
[Vaganova AN. Histotechnical solutions for quality improvement of nucleic acid specimens isolated from paraffin blocks. *Geny i kletki*. 2014;9(2):96–101. (In Russ)]
19. Gouveia GR, Ferreira SC, Ferreira JE, et al. Comparison of two methods of RNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens. *Biomed Res Int*. 2014;2014:151724. doi: 10.1155/2014/151724.
20. Liu Y, Jelloul F, Zhang Y, et al. Genetic Basis of Extramedullary Plasmablastic Transformation of Multiple Myeloma. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(6):838–48. doi: 10.1097/PAS.0000000000001459.
21. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471(7339):467–72. doi: 10.1038/nature09837.
22. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(1):91–101. doi: 10.1016/j.ccr.2013.12.015.
23. 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. doi: 10.1182/blood-2004-03-0833.
24. Hu Y, Chen W, 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.
25. Broderick P, Chubb D, Johnson DC, et al. Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet*. 2011;44(1):58–61. doi: 10.1038/ng.993.
26. Barwick BG, Gupta VA, Vertino PM, Boise LH. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Front Immunol*. 2019;10:1121. doi: 10.3389/fimmu.2019.01121.
27. Walker BA, Leone PE, Jenner MW, et al. Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2006;108(5):1733–43. doi: 10.1182/blood-2006-02-005496.
28. Pawlyn C, Loehr A, Ashby C, et al. Loss of heterozygosity as a marker of homologous repair deficiency in multiple myeloma: a role for PARP inhibition? *Leukemia*. 2018;32(7):1561–6. doi: 10.1038/s41375-018-0017-0.
29. Kim M, Lee SH, Kim J, et al. Copy number variations could predict the outcome of bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(1):20–7. doi: 10.1002/gcc.22213.