

## ОБЗОРЫ

## REVIEWS

## Молекулярное профилирование и мониторинг минимальной остаточной болезни у больных множественной миеломой: обзор литературы

## Molecular Profiling and Minimal Residual Disease Monitoring in Multiple Myeloma Patients: A Literature Review

А.В. Семьянихина<sup>1,2</sup>, Е.Э. Толстых<sup>1</sup>

AV Semyanikhina<sup>1,2</sup>, EE Tolstykh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

<sup>1</sup> NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

<sup>2</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», ул. Москворечье, д. 1, Москва, Российская Федерация, 115522

<sup>2</sup> NP Bochkov Research Centre for Medical Genetics, 1 Moskvorech'e str., Moscow, Russian Federation, 115522

## РЕФЕРАТ

Персонализированный подход выступает многообещающим инструментом в терапии злокачественных новообразований (ЗНО). Достижение успехов и оценка преимуществ такого подхода были значительно форсированы внедрением омиксных технологий, позволяющих получать полную информацию о состоянии генома и транскриптома опухоли с выявлением потенциальных биомаркеров и мишеней для направленного лекарственного воздействия. Несмотря на экспоненциальный рост секвенированных опухолевых геномов, ряд ЗНО остается вне активной фазы клинических исследований при очевидных и растущих потребностях в оптимизации существующих схем лечения. Одной из таких патологий является множественная миелома (ММ). Значительные достижения в диагностике и лечении ММ позволили существенно повысить показатели выживаемости при этой злокачественной опухоли. Однако исключить ММ из списка неизлечимых заболеваний пока не удается. ММ остается неоплазией, требующей разработки и внедрения новых лечебных подходов, большинство из которых будет базироваться на фено- и генотипических особенностях опухолевых клеток. Настоящий обзор посвящен современному состоянию изучения молекулярно-генетического профиля ММ, мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ), а также возможностей секвенирования нового поколения для диагностики, прогноза, оценки МОБ и поиска предикторов с целью оптимизации противоопухолевого лечения.

**Ключевые слова:** множественная миелома, секвенирование нового поколения, минимальная остаточная болезнь.

## ABSTRACT

A personalized approach is a promising tool for malignant neoplasm (MN) treatment. Gaining success and benefit assessment of this approach were considerably facilitated by the implementation of omix techniques which allow to obtain comprehensive information on the tumor genome and transcriptome state with identifying potential biomarkers and targets for directed drug action. Despite the exponential growth in the number of sequenced tumor genomes, some of them are not subject of active clinical studies, although obviously and increasingly require optimization of current treatment regimens. One of these pathologies is multiple myeloma (MM). Considerable advances in its diagnosis and treatment have substantially increased survival rates. However, MM cannot be removed from the list of fatal diseases, yet. It is a neoplasm which needs to be further studied and explored for implementation of new treatment strategies, most of which would be based on pheno- and genotypic characteristics of tumor cells. The present review deals with the state of the art in the study of the MM molecular genetic profile, minimal residual disease (MRD) monitoring as well as potentials of the new generation sequencing for MRD diagnosis, prognosis, estimation, and search for predictors aimed at chemotherapy optimization.

**Keywords:** multiple myeloma, new generation sequencing, minimal residual disease.

Получено: 21 мая 2021 г.

Received: May 21, 2021

Принято в печать: 29 августа 2021 г.

Accepted: August 29, 2021

Для переписки: Александра Владимировна Семьянихина, канд. мед. наук, Каширское ш., д. 23, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: +7(926)371-21-56; e-mail: alexandra\_silina@mail.ru

Для цитирования: Семьянихина А.В., Толстых Е.Э. Молекулярное профилирование и мониторинг минимальной остаточной болезни у больных множественной миеломой: обзор литературы. Клиническая онкогематология. 2021;14(4):436–43.

DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-4-436-443

For correspondence: Aleksandra Vladimirovna Semyanikhina, MD, PhD, 23 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: +7(926)371-21-56; e-mail: alexandra\_silina@mail.ru

For citation: Semyanikhina AV, Tolstykh EE. Molecular Profiling and Minimal Residual Disease Monitoring in Multiple Myeloma Patients: A Literature Review. Clinical oncohematology. 2021;14(4):436–43. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-4-436-443

Множественная миелома (ММ) — злокачественное В-клеточное лимфопролиферативное генетически и фенотипически гетерогенное неизлечимое заболевание, характеризующееся мультифокальной пролиферацией зрелых опухолевых плазматических клеток, продуцирующих моноклональный иммуноглобулин. На долю ММ приходится до 1 % всех злокачественных новообразований и до 15 % от общего числа опухолей системы крови [1]. ММ чаще регистрируется у мужчин, никогда — у детей. Заболеваемость возрастает в старшей возрастной группе, достигая среднего статистического значения приблизительно в 65 лет, при этом более 90 % случаев диагностируется у пациентов старше 50 лет [1, 2]. Актуальная 5-летняя выживаемость больных ММ не достигает и 50 % [3].

Развернутой клинической картине ММ предшествует многоэтапный процесс генетической трансформации плазматических клеток от неопухолевого пролиферирующего клона до злокачественного пула В-клеток. Подавляющее большинство случаев ММ связано с предшествующей болезни моноклональной гаммапатией неясного генеза (МГНГ) вследствие хронической антигенной стимуляции различного этиопатогенеза [1]. К инициирующим молекулярным событиям относят хромосомные транслокации, вовлекающие гены, кодирующие тяжелые цепи иммуноглобулинов (IGH), и нарушения ploидности хромосомного набора (чаще анеупло-

идии) [4], выявляемые уже на этапе МГНГ. Последующие генетические события, определяющиеся уже в злокачественном клоне зрелых плазмочитов, включают изменение числа копий генов, аномальное метилирование и генные мутации, потенцирующие опухолевую прогрессию [4, 5].

Генетическая гетерогенность ММ обуславливает вариабельность клинических проявлений от асимптомного течения до высокоагрессивных форм заболевания [1]. Инфильтрация опухолевыми клетками костного мозга — главного продуцента патологического пула плазматических клеток — приводит к гипоплазии других ростков кроветворения, влекущей за собой развитие анемического и геморрагического синдромов, аномальная секреция парапротеина — к специфическому поражению почек (миеломной нефропатии), снижению продукции нормальных иммуноглобулинов, амилоидозу, гиперкальциемии и др. [6].

С расширением спектра диагностических методик и внедрением инновационных методов анализа генома и транскриптома опухолевых клеток — от кариотипирования и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) до высокопроизводительных технологий (табл. 1), таких как экспрессионное профилирование, секвенирование нового поколения (NGS), с начала 2000-х годов отмечается активное накопление данных о молекулярной природе ММ [4]. Геномные и

Таблица 1. Молекулярно-генетическое тестирование при множественной миеломе (цит. по [7])

|                       | Полногеномное исследование (WGS)                              | Полноэкзомное исследование (WES)                                                                           | Таргетное секвенирование                                                                                                                          | FISH                                                                                       |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Объект исследования   | Геном (все последовательности нуклеотидов в молекулах ДНК)    | Экзом (кодирующие последовательности генома)                                                               | Заданная панель генов/локусов                                                                                                                     | Заданная панель локусов                                                                    |
| Определяемые варианты | Геномные, хромосомные, генные мутации                         | Генные, в т. ч. протяженные, мутации, анеуплоидии, изменение копийности генов                              | Генные, в т. ч. протяженные, мутации, анеуплоидии, изменение копийности генов                                                                     | Хромосомные aberrации                                                                      |
| Стоимость             | ~1500 евро/образец                                            | ~500 евро/образец                                                                                          | Вариабельно                                                                                                                                       | ~100 евро/зонд                                                                             |
| Преимущества          | Полная характеристика генома                                  | Меньшая стоимость и трудоемкость, чем у WGS, результат содержит большую часть клинически важной информации | Оптимальный требуемый набор генов/локусов, меньшая стоимость и облегченный анализ результатов, меньше выходных данных для хранения, чем у WGS/WES | Быстрый и доступный для рутинной практики метод                                            |
| Недостатки            | Стоимость, сложные анализ и логистика данных, низкое покрытие | Отсутствие информации о некодирующих участках                                                              | Заданная панель — ограничение для исследовательских подходов                                                                                      | Отсутствие выявления генных мутаций, оптимально в случае небольшого числа требуемых зондов |

**Таблица 2.** Цитогенетическая классификация плазмноклеточной миеломы, разработанная Международной рабочей группой по миеломе (цит. по [14])

| Цитогенетическая группа                                                               | Относительная частота, % |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Гипердиплоидные                                                                       | 45                       |
| Диплоидные                                                                            | 40                       |
| Транслокации с вовлечением локусов генов <i>CCND1</i> , <i>CCND2</i> , <i>CCND3</i> : | 18                       |
| t(11;14)(q13;q32)                                                                     | 16                       |
| t(6;14)(p25;q32)                                                                      | 2                        |
| t(12;14)(p13;q32)                                                                     | < 1                      |
| Транслокации <i>NSD2</i> ( <i>MMSET</i> ):                                            | 15                       |
| t(4;14)(p16;q32)                                                                      | 15                       |
| Транслокации <i>MAFA</i> :                                                            | 8                        |
| t(14;16)(q32;q23)                                                                     | 5                        |
| t(14;20)(q32;q11)                                                                     | 2                        |
| t(12;14)(p13;q32)                                                                     | 1                        |
| Неклассифицируемые опухоли                                                            | 15                       |

**Таблица 3.** Прогностические группы больных множественной миеломой (стратификация Mayo; цит. по [1])

| Группа риска              | Цитогенетические данные                                                     | Прогноз общей выживаемости, годы |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Стандартный риск (60 %)   | Гипердиплоидия<br>t(11;14)<br>t(6;14)                                       | 8–10                             |
| Промежуточный риск (20 %) | Гиподиплоидия<br>t(4;14)<br>del(13)                                         | 4–5                              |
| Высокий риск (20 %)       | del(17p)<br>t(14;16)<br>t(14;20)<br>Высокий риск по экспрессионному профилю | 3                                |

хромосомные мутации, определяемые в клетках ММ, выступают независимыми прогностическими факторами и наряду с генными мутациями служат потенциальными предиктивными маркерами эффективности противоопухолевой терапии.

Примерно в  $1/3$  случаев ММ при кариотипировании и более чем в 90 % случаев с применением FISH диагностируются нарушения числа хромосом, их качественные изменения [8, 9], а также комбинированные мутации, т. е. сложный кариотип. На ранних этапах канцерогенеза транслокации в подавляющем большинстве случаев вовлекают локус, несущий ген *IDH* (14q32.33), на хромосоме 14, и одну из частых хромосом-партнеров 4, 6, 11, 14 или 20, реже — 8 или 12 [4]. Ранние трисомии, в свою очередь, с большей вероятностью определяются по нечетным хромосомам 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 и/или 21, что приводит к гипердиплоидному кариотипу [10, 11]. Вторая чередя цитогенетических событий, характеризующая развернутую стадию болезни, включает моносомию хромосомы 13 и делецию ее длинного плеча, определяющиеся у 35–40 и 6–10 % больных соответственно [12, 13], а также изменение числа копий хромосомы 1, моносомию хромосомы 17 и делеции ее короткого плеча [5, 10]. В табл. 2 представлена цитогенетическая классификация плазмноклеточной миеломы, разработанная Международной рабочей группой по миеломе [14].

Специфические трисомии, повторяющиеся транслокации и экспрессия генов *CCND1*, *CCND2*, *CCND3* легли в основу одной из первых скоринговых моделей оценки риска у больных ММ, которая позволила выделить 7 молекулярных подгрупп ММ с определенными нарушениями (11q13, 6p21, 4p16, MAF, D1, D1+D2 и D2) [15]. В результате исследований, посвященных оценке комбинации молекулярных (платформы UAMS-70, UAMS-17 и EMC-92) и клинических (по Международной системе стадирования, ISS) параметров в качестве эффективного инструмента стратификации больных ММ в прогностические группы, получены убедительные данные. Продемонстрированы статистически значимые различия в общей выживаемости в подгруппах, выделенных с учетом предложенной прогностической модели [16, 17]. Несмотря на достигнутые результаты, ни одна из предложенных комбинированных сигнатур не валидирована для клинического применения, а стандартное кариотипирование и гибридизация *in situ* остаются одними из самых надежных предикторов исхода болезни. Актуальное распределение больных ММ в группы с различным прогнозом с учетом основных цитогенетических аномалий и результатов экспрессионного профилирования представлено в табл. 3.

Первые исследования экзоза плазматических клеток в 2010 г. не выявили нарушений, специфичных для ММ, как, например, в случае макроглобулинемии Вальденстрема [18, 19]. Более того, во всех исследованных образцах продемонстрирован широкий спектр генетических событий наряду с выявлением многочисленных субклонов [20]. При этом немногим более 10 генов могут считаться генами с высокой частотой мутаций. Генетическая гетерогенность ММ наблюдается не только внутри группы пациентов, нередко у одного больного определяются различные генотипы плазматических опухолевых клеток в зависимости от анатомической локализации очагов поражения [21]. Олигоклональность ММ прослеживается на всем протяжении заболевания, при этом численный и качественный составы, а также доминантность опухолевых клонов могут меняться [4], обуславливая резистентность к ранее проводимому лечению. Чем к более прогностически неблагоприятной группе по клинко-лабораторным данным отнесен пациент, тем выше степень клональной гетерогенности ММ. Так, в исследовании J.J. Keats и соавт. пациенты из группы низкого риска ( $1/3$  когорты) характеризовались стабильным генотипом весь период специфической терапии, тогда как у больных со стандартным или высоким риском субклональность нарастала прямо пропорционально агрессивности заболевания [22].

Анализ полноэкзомных данных показал вариабельную степень спонтанной эволюции генных мутаций, цитогенетических и хромосомных нарушений [23, 24], что в целом характеризует особенность течения ММ, при которой увеличение мутационной нагрузки в опухолевых клетках прямо коррелирует с повышением степени тяжести заболевания [7].

В среднем у 1 пациента при профилировании опухолевого экзоза выявляется около 60 соматических миссенс-мутаций, что значительно уступает по частоте многим опухолям [22, 25]. Данный факт отчасти

объясняет низкую эффективность иммунотерапии ингибиторами контрольных точек, при которой иммунное распознавание опухолевых антигенов цитотоксическими Т-лимфоцитами играет определяющую роль [26]. По данным одного из крупных исследований экзоса ММ, включавшем 463 пациентов, к генам с высокой частотой мутаций отнесены *IRF4*, *KRAS*, *NRAS*, *MAX*, *HIST1H1E*, *RBI*, *EGR1*, *TP53*, *TRAF3*, *FAM46C*, *DIS3*, *BRAF*, *LTB*, *CYLD* и *FGFR3* (табл. 4) [27]. Соматические мутации в гене *FGFR3* определены только у больных с транслокацией t(4;14), в гене *EGR1* — исключительно в гипердиплоидных образцах. В данной когорте самым часто вовлеченным сигнальным путем с наибольшей частотой мутаций был MAPK-каскад, на долю которого пришлось 43,2 % всех событий. В 17 % случаев наблюдалась активация сигнального пути NFκB. Единственным значимым повторяющимся событием, значительно ухудшающим прогноз у больных ММ, являются мутации в гене *TP53*, которые в 25–40 % случаев сочетаются с потерями на хромосоме 17 (del17p). Делеции короткого плеча хромосомы 17 диагностируются у 10 % больных с впервые выявленной ММ и у 80 % пациентов при прогрессировании болезни [4]. В указанных случаях потеря гетерозиготности по locus, кодирующему ген *TP53*, — кульминация прогрессирования заболевания, приводящая к исключению из противоопухолевой защиты клетки главного «стража» клеточного генома — гена *TP53*.

Еще меньшее число генетических событий выявлено при изучении экзоса и транскриптома образцов тлеющей миеломы (ТМ), в т. ч. при исследовании парных образцов ТМ и ММ [28]. Несмотря на низкую мутационную нагрузку, клональная гетерогенность определялась уже на бессимптомной стадии болезни. Подробный анализ данных NGS определил два возможных механизма прогрессирования ТМ. Первый включает развитие активной фазы заболевания на фоне пролиферации минорных или новых субклонов, часто без резких колебаний количества парапротеина. Второй механизм менее изученный, при котором клиническое прогрессирование не связано с накоплением молекулярно-генетических нарушений [23, 24]. В последнем случае возможны следующие патогенетические пути реализации заболевания: либо за счет изменения опухолевого микроокружения, либо, что более вероятно, речь идет о случаях исходно истинной ММ, требующей определенного времени для накопления опухолевой массы и развертывания картины специфического органного поражения, чтобы отвечать критериям прогрессирования болезни [29].

В целом генетический ландшафт ТМ высокого риска и симптоматическая ММ характеризуются высокой степенью конкордантности. К возможным молекулярным маркерам перехода ТМ в симптомную фазу относятся хромосомные транслокации с вовлечением гена *MYC* [30]. Как и в случае с ММ, профилирование генома ТМ наряду с поиском хромосомных aberrаций может выступать важным инструментом стратификации пациентов, определения стратегии их наблюдения и времени начала специфического лечения.

За два последних десятилетия разработка и внедрение технологий NGS открыли новые возможности

**Таблица 4.** Перечень генов с высокой частотой мутаций в опухолевых клетках множественной миеломы (цит. по [12])

| Ген           | Частота, % | Функция                                                                      |
|---------------|------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <i>KRAS</i>   | 20–25      | МАРК-сигнальный путь (рост и выживание клетки)                               |
| <i>NRAS</i>   | 23–25      | МАРК-сигнальный путь (рост и выживание клетки)                               |
| <i>TP53</i>   | 8–15       | Супрессор опухолевого роста, вовлеченный в процессы репарации ДНК и апоптоза |
| <i>DIS3</i>   | 11         | Эндорибонуклеаза                                                             |
| <i>FAM46C</i> | ~11        | Регуляция процессов трансляции                                               |
| <i>BRAF</i>   | 6–15       | МАРК-сигнальный путь (рост и выживание клетки)                               |
| <i>TRAF3</i>  | 3–6        | NFκB-сигнальный путь (рост и выживание клетки)                               |
| <i>ROBO1</i>  | 2–5        | Трансмембранный рецептор (клеточный рост)                                    |
| <i>CYLD</i>   | 2–3        | NFκB-сигнальный путь (рост и выживание клетки)                               |
| <i>EGR1</i>   | 4–6        | Транскрипционный фактор                                                      |
| <i>SP140</i>  | 5–7        | Антигензависимое созревание В-клеток                                         |
| <i>FAT3</i>   | 4–7        | Семейство кадгеринов (клеточная адгезия)                                     |
| <i>CCND1</i>  | 3          | Регуляция клеточного цикла                                                   |

в диагностике, лечении и мониторинге гематологических опухолей. Современные NGS-платформы второго и последующего поколений позволяют успешно определять как непротяженные мутации, так и химерные транскрипты, структурные перестройки хромосом, а также нарушения ploидности генома [7] даже в минорных клеточных популяциях. Высокие чувствительность, специфичность, производительность NGS при оптимизированном и стандартизированном подходе в будущем станут залогом замещения FISH-диагностики и других рутинных методик и закономерно обозначат технологии NGS новым «золотым стандартом» молекулярного профилирования.

Несмотря на активное внедрение высокопроизводительных технологий в диагностические и лечебные алгоритмы, NGS-методики крайне медленно вводятся в клиническую практику ведения ММ. FISH и кариотипирование остаются главными инструментами для молекулярной характеристики ММ. Однако, рассматривая вопрос прогностической стратификации и специфического лечения больных ММ, необходимо учитывать, что классификация R-ISS включает не все предикторы высокого риска, а риск-адаптированной терапии до настоящего времени не разработано. В этом контексте NGS выступает эффективным инструментом как для поиска новых мишеней таргетного лечения, так и прогнозирования течения заболевания. Учитывая нарастаемые фармацевтическими компаниями темпы разработки новых лекарственных препаратов, точкой приложения которых в большинстве случаев являются уникальные молекулярно-генетические и фенотипические черты опухоли, в ближайшем будущем, возможно, произойдет модификация текущих схем лечения и для пациентов с ММ.

Современные возможности NGS не ограничены профилированием генома. Активными объектами для изучения являются эпигенетические процессы, такие как ДНК-метилирование, модификация гистонов, экспрессия некодирующих РНК, неотъемлемая роль

Таблица 5. Критерии оценки МОБ Международной рабочей группы по ММ (цит. по [2, 47])

| Уровень оценки                       | Определение                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Устойчивый МОБ-отрицательный статус  | Отсутствие МОБ в костном мозге при исследовании с помощью NGS и/или EuroFlow, а также отсутствие очагов поражения по данным ПЭТ/КТ, подтвержденные как минимум в течение года                                  |
| МОБ-отрицательный статус по EuroFlow | Отсутствие фенотипически aberrантных клонов плазматических клеток в костном мозге по данным EuroFlow                                                                                                           |
| МОБ-отрицательный статус по NGS      | Отсутствие aberrантных клонов плазматических клеток в костном мозге по данным NGS                                                                                                                              |
| МОБ- и ПЭТ/КТ-отрицательный статус   | Отсутствие МОБ по данным NGS и/или EuroFlow, а также отсутствие визуализации ранее регистрировавшихся очагов накопления по данным ПЭТ/КТ или снижение активности накопления, сравнимое с нормальным окружением |

NGS — секвенирование нового поколения; МОБ — минимальная остаточная болезнь; ПЭТ/КТ — позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией.

которых в патогенезе и прогнозе при ММ считается доказанным фактом [31, 32]. Так, тотальное ДНК-гипометилирование коррелирует с опухолевым прогрессированием и плохим прогнозом [31, 32]. Аномальное метилирование выступает и важным регулятором экспрессии микроРНК, принимающих активное участие в инициации, прогрессировании и метастазировании опухоли [33]. Изучение транскриптома ММ лежит в основе современных прогностических моделей, включающих специфические экспрессионные сигнатуры (GEP70, SKY92), разработанные для независимой от клинико-патологических и молекулярно-генетических характеристик оценки риска течения болезни [17, 34]. Отсутствие консенсуса в отношении единой сигнатуры панели изучаемых маркеров, диагностического стандарта при процессинге образцов и интерпретации результатов, пока еще существующая трудоемкость метода обуславливают медленное внедрение в клиническую практику прогностических генно-экспрессионных скорингов [7].

Главным приложением высокопроизводительных технологий в отношении ММ в настоящее время является оценка минимальной остаточной болезни (МОБ), основанная на секвенировании IGH/IGK/IGL-локусов [7]. NGS в измерении МОБ выступает мощным инструментом, занявшим важную нишу в клинических исследованиях. Самой важной предпосылкой для поиска новых методик оценки МОБ является тот факт, что у большинства больных ММ с полным ответом после специфического лечения регистрируется возврат болезни [5]. В ряде независимых исследований подтверждено наличие МОБ, не определенное стандартными критериями оценки полного эффекта у значительной когорты больных ММ [35–37], но выявленное новыми высокочувствительными методиками, такими как проточная цитофлуориметрия (ПЦ) в рамках протокола EuroFlow и высокопроизводительное секвенирование. Метаанализ результатов данных работ свидетельствует о статистически значимом снижении медианы времени до прогрессирования у МОБ-положительных пациентов в сравнении с МОБ-отрицательными по данным NGS [38]. При этом показатели как общей, так и выживаемости без прогрессирования с учетом МОБ-статуса по результатам NGS не зависели от стандартной стратификации с учетом цитогенетических данных. Одинаковая точность была показана как в группах молодых пациентов, так и больных старшей возрастной категории на этапе ремиссии и при прогрессировании заболе-

вания, с включением высокодозной химиотерапии в план лечения или без нее [39–41].

Как правило, МОБ на молекулярном уровне оценивается либо путем мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с консенсусными праймерами с последующей оценкой продуктов амплификации различными методами (способ, не отличающийся высокой чувствительностью за счет разбавления ДНК «дикого типа», выделенной из здоровых В-лимфоцитов) [42, 43], либо путем аллель-специфической ПЦР с пациент-специфическими праймерами (технологии с гораздо более высокой точностью определения МОБ — до 1 клональной клетки на 100 000 проанализированных) [44]. Однако и второй метод позволяет оценить МОБ только у 50–60 % больных ввиду быстрого накопления и высокой частоты соматических мутаций в опухолевых клетках ММ. Кроме того, возможности количественной ПЦР ограничивают оценку клональной эволюции у пациентов с рецидивами заболевания, что приводит к ложноотрицательным результатам [45]. Трудности выявления IGH-перестроек заключаются и в том, что зачастую требуется оценивать не один локус, а два и более, что повышает трудоемкость и стоимость исследования. Технологии NGS лишены указанных недостатков, позволяют получить полный и точный перечень нарушений IGH/IGK/IGL в каждом конкретном случае [46] как на момент постановки диагноза, так и при достижении ремиссии заболевания. Их разрешающая способность — 1 клетка на более 1 млн исследованных. Очевидные преимущества NGS в определении МОБ учтены в пересмотренных в 2016 г. Международной рабочей группой по ММ критериях оценки МОБ (табл. 5) [2, 47].

ПЦ в рамках протокола EuroFlow выступает надежным, чувствительным, стандартизованным, автоматизированным, быстрым, не требующим данных исходного фенотипирования, универсальным и доступным методом определения МОБ, используемым в большинстве профильных онкогематологических лабораторий, что пока не распространяется на технологии NGS с лимитированным применением только в научно-исследовательских целях либо в рамках клинических исследований (табл. 6) [47]. Метод ПЦ позволяет различать аномальные, нормальные и реактивные плазматические клетки, несмотря на низкий уровень этих клеток в костном мозге. Это уникальное качество, присущее только ПЦ, поскольку ни стандартные морфологические, ни молекулярные подходы по отдельности или вместе не обладают

Таблица 6. Основные методы диагностики МОБ у больных ММ (цит. по [47])

| Характеристика                             | кПЦР                                                              | ПЦ                                                                                        | NGS                                                                                  |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Применимость метода                        | 60–70 %                                                           | ~100 %                                                                                    | ≥ 90 %                                                                               |
| Наличие первичного образца                 | Требуется для дизайна пациент-специфических праймеров/зондов      | Не требуется                                                                              | Требуется                                                                            |
| Требования к образцу                       | < 10 <sup>6</sup> клеток                                          | > 5 × 10 <sup>6</sup> клеток                                                              | < 10 <sup>6</sup> клеток, большее количество клеток повышает чувствительность метода |
| Первичная пробоподготовка                  | Может быть отложена; применимы как свежие, так и архивные образцы | Только свежие образцы, оценка в течение 24–48 ч                                           | Может быть отложена; применимы как свежие, так и архивные образцы                    |
| Контроль качества образца                  | Невозможен                                                        | Немедленный, с оценкой клеточности костного мозга                                         | Невозможен                                                                           |
| Чувствительность                           | ≥ 1/10 <sup>5</sup>                                               | ≥ 1/10 <sup>5</sup>                                                                       | ≥ 1/10 <sup>5</sup>                                                                  |
| Качественный/количественный состав образца | Не требуется                                                      | Требуется                                                                                 | Не требуется                                                                         |
| Трудоемкость и времязатратность            | Трудоемкий метод, время исследования — несколько дней             | Время исследования — несколько часов, доступно автоматизированное программное обеспечение | Трудоемкий метод с биоинформатическим этапом, время исследования — несколько дней    |
| Стандартизация                             | Для ММ отсутствует                                                | Есть, EuroFlow                                                                            | В разработке                                                                         |
| Доступность                                | Да                                                                | Да                                                                                        | Лимитированная                                                                       |

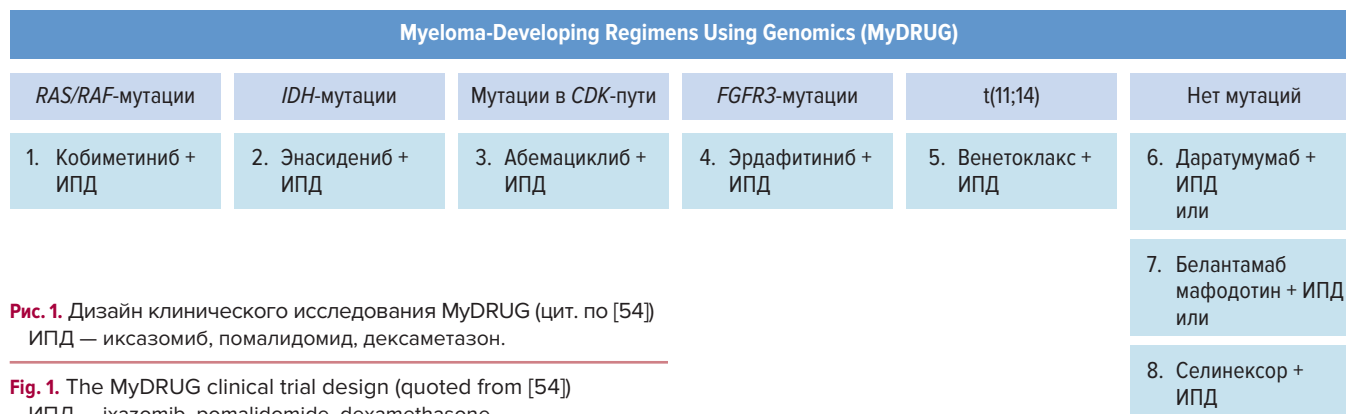
NGS — секвенирование нового поколения; кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция; ММ — множественная миелома; МОБ — минимальная остаточная болезнь; ПЦ — проточная цитофлуориметрия.

способностью различать клональные и нормальные плазматические клетки. Существенным дополнением к мониторингу опухолевых клеток является тот факт, что иммунофенотипирование позволяет отслеживать восстановление нормальных плазматических клеток, что служит важным прогностическим признаком.

Для всех существующих методов диагностики МОБ в качестве объекта исследования выступают плазматические клетки костного мозга. Одними из важных потенциальных мишеней для мини-инвазивных подходов к оценке МОБ могут выступать циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) и свободно циркулирующая ДНК (СЦД). На момент постановки диагноза данный подход продемонстрировал высокую надежность с одинаковой точностью определения всех возможных вариантов генетических нарушений в образцах ММ [48–50]. Возможность применения методики жидкостной биопсии в оценке МОБ и риска прогрессирования заболевания остается предметом активных научных исследований. Несмотря на высокую чувствительность ПЦ- и ПЦР-технологий, использование одного локуса при заборе материала костного мозга при таком крайне гетерогенном заболевании, как ММ, в определенном смысле дискредитирует статус МОБ-негативности у больного [7]. Одним из доказательств данного постулата выступает обнаружение моноклонального белка в сыворотке у пациентов без признаков болезни в костном мозге [51], наблюдающееся хотя и у немногочисленной группы МОБ-отрицательных пациентов с ПЭТ-положительным статусом, но значительно ухудшающее прогноз по возможному развитию рецидива заболевания [51]. Определение МОБ по ЦОК и СЦД с помощью адаптированных NGS-технологий, нивелирующих привязанность к локальному забору костномозгового материала, — технология будущего, пока еще не позволяющая достигать желаемой чув-

ствительности 10<sup>-6</sup> клеток ввиду низкого числа ЦОК и эквивалентных количеств СЦД для мониторинга IGH-перестроек, генных мутаций, а также вариаций числа копий гена [7, 50]. Следует, однако, отметить, что выявление моноклонального белка в сыворотке у больных с МОБ-отрицательным статусом ни в коей мере не снижает роли МОБ-негативности по ПЦ, т. к. этот белок еще некоторое время циркулирует даже при полной эрадикации злокачественных плазмочитов из костного мозга [52].

В эпоху персонализированной медицины большинство клинических исследований посвящено оценке эффективности препаратов направленного действия, где специфическими мишенями служат молекулярно-генетические изменения в опухоли. Так, для большинства солидных злокачественных новообразований за последние два десятилетия развернуты исследования таргетных препаратов, многие из которых завершены, а соответствующие коррективы в лекарственную терапию и минимальные диагностические требования внесены в клинические рекомендации по лечению соответствующей нозологии. В отношении ММ все не так оптимистично. Ряд клинических исследований оказался безуспешным прежде всего из-за формирования исследуемых когорт за счет пациентов с поздней стадией заболевания и, соответственно, высоким показателем поликлональности [53]. Одним из крупных проспективных исследований в настоящее время является открытое нерандомизированное клиническое исследование MyDRUG (Myeloma-Developing Regimens Using Genomics, № NCT03732703), инициированное Консорциумом по изучению ММ [54] и базирующееся на профилировании генома и FISH-диагностике с поиском частых мутаций и транслокаций у пациентов с рецидивами и рефрактерным течением ММ. На основании статуса генов *CDKN2C*, *FGFR3*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAFV600E*, *IDH2* и



**Рис. 1.** Дизайн клинического исследования MyDRUG (цит. по [54])  
ИПД — иксазомиб, помалидомид, дексаметазон.

**Fig. 1.** The MyDRUG clinical trial design (quoted from [54])  
ИПД — ixazomib, pomalidomide, dexamethasone.

транслокации t(11;14) все больные распределяются в соответствующие группы для последующего лечения (рис. 1). Первые промежуточные результаты исследования следует ожидать в феврале 2022 г.

Внедрение технологий высокопроизводительного секвенирования значительно расширило наши представления о геномном ландшафте ММ. Высокая гетерогенность заболевания, сложность клональной эволюции, необратимая резистентность к системному противоопухолевому лечению объясняют, с одной стороны, недостаточные успехи в применении молекулярно-направленной терапии у больных ММ, а с другой — потенцируют дальнейшее изучение как генома патологических плазматических клеток, так и опухолевого, в т. ч. иммунного, микроокружения. Реальность современного типирования ММ и контроля болезни сводится к применению доступных, валидированных, быстрых, менее трудоемких и менее затратных технологий, демонстрирующих при этом высокую точность, однако имеющих ряд недостатков. Разработка и валидация NGS-панелей позволит в будущем характеризовать молекулярно-генетический профиль ММ, с высокой прогностической точностью формировать группы риска, мониторировать МОБ, а выявленные специфические нарушения использовать как предикторы эффективности и оценки ответа на таргетную терапию. Оптимизация диагностики и мониторинга МОБ при ММ, базирующихся на внедрении высокопроизводительных технологий, в т. ч. и жидкостной биопсии, позволит значительно расширить когорту больных с максимальным периодом без прогрессирования, а со временем, возможно, опровергнуть гипотезу о неизлечимости больных ММ.

#### Ключевые выводы:

- Секвенирование генома ММ не выявило специфических патогномичных молекулярно-генетических нарушений.
- ММ — высокогетерогенное заболевание с многочисленными субклонами, качественно и количественно изменяющимися на протяжении заболевания и определяющими развитие резистентности к противоопухолевой терапии.
- Включение новых прогностических молекулярных маркеров оптимизирует стратификацию больных на группы риска.
- Риск-адаптированной терапии ММ не разработано.

- Молекулярное профилирование может выступать в качестве важного инструмента при определении показаний для начала специфического лечения ТМ.
- NGS-тестирование наряду с ПЦ является высокоэффективным методом оценки МОБ.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** А.В. Семейнихина.

**Сбор и обработка данных:** все авторы.

**Анализ и интерпретация данных:** все авторы.

**Подготовка рукописи:** все авторы.

**Окончательное одобрение рукописи:** все авторы.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon: IARC Press; 2017. 592 p.
2. Brigle K, Rogers B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs.* 2017;33(3):225–36. doi: 10.1016/j.soncn.2017.05.012.
3. Naymagon L, Abdul-Hay M. Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):52. doi: 10.1186/s13045-016-0282-1.
4. Castaneda O, Baz R. Multiple Myeloma Genomics – A Concise Review. *Acta Med Acad.* 2019;48(1):57–67. doi: 10.5644/ama2006-124.242.
5. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3(1):17046. doi: 10.1038/nrdp.2017.46.
6. Поддубная И.В., Савченко В.Г., Каприн А.Д. Клинические рекомендации. Множественная миелома. М., 2020. 222 с. [Poddubnaya IV, Savchenko VG, Kaprin AD. Klinicheskie rekomendatsii. Mnozhstvennaya mieloma. (Clinical guidelines. Multiple myeloma.) Moscow; 2020. 222 p. (In Russ)]
7. Bolli N, Genuardi E, Ziccheddu B, et al. Next-Generation Sequencing for Clinical Management of Multiple Myeloma: Ready for Prime Time? *Front Oncol.* 2020;25(10):a189. doi: 10.3389/fonc.2020.00189.
8. Chng WJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, et al. A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood.* 2005;106(6):2156–61. doi: 10.1182/blood-2005-02-0761.
9. Lai JL, Zandecki M, Mary JY, et al. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood.* 1995;85(9):2490–7. doi: 10.1182/blood.v85.9.2490.bloodjournal8592490.

10. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):335–48. doi: 10.1038/nrc3257.
11. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*. 2012;119(9):2100–5. doi: 10.1182/blood-2011-11-390658.
12. Kumar SK, Rajkumar SV. The multiple myelomas – current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(7):409–21. doi: 10.1038/s41571-018-0018-y.
13. Binder M, Rajkumar SV, Ketterling RP, et al. Prognostic implications of abnormalities of chromosome 13 and the presence of multiple cytogenetic high-risk abnormalities in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2017;7(9):e600. doi: 10.1038/bcj.2017.83.
14. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210–21. doi: 10.1038/leu.2009.174.
15. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106(1):296–303. doi: 10.1182/blood-2005-01-0034.
16. Kuiper R, van Duin M, van Vliet MH, et al. Prediction of high- and low-risk multiple myeloma based on gene expression and the International Staging System. *Blood*. 2015;126(17):1996–2004. doi: 10.1182/blood-2015-05-644039.
17. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007;109(6):2276–84. doi: 10.1182/blood-2006-07-038430.
18. 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.
19. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826–33. doi: 10.1056/NEJMoa1200710.
20. 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.
21. Raab MS, Lehnert N, Xu J, et al. Spatially divergent clonal evolution in multiple myeloma: overcoming resistance to BRAF inhibition. *Blood*. 2016;127(17):2155–7. doi: 10.1182/blood-2015-12-686782.
22. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(5):1067–76. doi: 10.1182/blood-2012-01-405985.
23. Zhao S, Choi M, Heuck C, et al. Serial exome analysis of disease progression in premalignant gammopathies. *Leukemia*. 2014;28(7):1548–52. doi: 10.1038/leu.2014.59.
24. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, et al. Intracлонаl heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*. 2014;28(2):384–90. doi: 10.1038/leu.2013.199.
25. Miller A, Asmann Y, Cattaneo L, et al. High somatic mutation and neoantigen burden are correlated with decreased progression-free survival in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2017;7(9):e612. doi: 10.1038/bcj.2017.94.
26. Benson DM Jr. Checkpoint inhibition in myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;2016(1):528–33. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.528.
27. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol*. 2015;33(33):3911–20. doi: 10.1200/JCO.2014.59.1503.
28. Mailankody S, Kazandjian D, Korde N, et al. Baseline mutational patterns and sustained MRD negativity in patients with high-risk smoldering myeloma. *Blood Adv*. 2017;1(22):1911–8. doi: 10.1182/bloodadvances.2017005934.
29. Manier S, Sacco A, Leleu X, et al. Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:1–5. doi: 10.1155/2012/157496.
30. Misund K, Keane N, Stein CK, et al. MYC dysregulation in the progression of multiple myeloma. *Leukemia*. 2020;34(1):322–6. doi: 10.1038/s41375-019-0543-4.
31. Sive JI, Feber A, Smith D, et al. Global hypomethylation in myeloma is associated with poor prognosis. *Br J Haematol*. 2016;172(3):473–5. doi: 10.1111/bjh.13506.
32. Bollati V, Fabris S, Pegoraro V, et al. Differential repetitive DNA methylation in multiple myeloma molecular subgroups. *Carcinogenesis*. 2009;30(8):1330–5. doi: 10.1093/carcin/bgp149.
33. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259–69. doi: 10.1038/nrc1840.
34. Van Beers EH, van Vliet MH, Kuiper R, et al. Prognostic Validation of SKY92 and Its Combination With ISS in an Independent Cohort of Patients With Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myel Leuk*. 2017;17(9):555–62. doi: 10.1016/j.clml.2017.06.020.
35. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112(10):4017–23. doi: 10.1182/blood-2008-05-159624.
36. Paiva B, Martinez-Lopez J, Vidriales MB, et al. Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2011;29(12):1627–33. doi: 10.1200/JCO.2010.33.1967.
37. Paiva B, Gutierrez NC, Rosinol L, et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood*. 2012;119(3):687–91. doi: 10.1182/blood-2011-07-370460.
38. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017;3(1):28–35. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.3160.
39. Gambella M, Omede P, Spada S, et al. Minimal residual disease by flow cytometry and allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with myeloma receiving lenalidomide maintenance: A pooled analysis. *Cancer*. 2019;125(5):750–60. doi: 10.1002/cncr.31854.
40. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(23):2456–64. doi: 10.1182/blood-2018-06-858613.
41. Mateos MV, Dimopoulos MA, Cavo M, et al. Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*. 2018;378(6):518–28. doi: 10.1056/NEJMoa1714678.
42. Langerak AW, Groenen PJ, Bruggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159–71. doi: 10.1038/leu.2012.246.
43. Van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(4):604–11. doi: 10.1038/sj.leu.2404586.
44. Corradini P, Voena C, Tarella C, et al. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol*. 1999;17(1):208–15. doi: 10.1200/JCO.1999.17.1.208.
45. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005;90(10):1365–72.
46. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 2014;123(20):3073–9. doi: 10.1182/blood-2014-01-550020.
47. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):e328–e346. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.
48. Lohr JG, Kim S, Gould J, et al. Genetic interrogation of circulating multiple myeloma cells at single-cell resolution. *Sci Transl Med*. 2016;8(363):363ra147. doi: 10.1126/scitranslmed.aac7037.
49. Mishima Y, Paiva B, Shi J, et al. The Mutational Landscape of Circulating Tumor Cells in Multiple Myeloma. *Cell Rep*. 2017;19(1):218–24. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.025.
50. Manier S, Park J, Capelletti M, et al. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2018;9(1):1691. doi: 10.1038/s41467-018-04001-5.
51. Zamagni E, Nanni C, Mancuso K, et al. PET/CT Improves the Definition of Complete Response and Allows to Detect Otherwise Unidentifiable Skeletal Progression in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(19):4384–90. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0396.
52. Паива Б., Видриалес М.Б., Алмейда Х. и др. Оценка эффекта лечения при множественной миеломе: клиническое значение мониторинга МОЗ. *Иммунология гемопоэза*. 2012;10(1):34–77.  
[Paiva B, Vidriales MB, Almeida J, et al. Treatment response assessment in multiple myeloma: clinical significance of MRD monitoring. *Immunologia гемопоэза*. 2012;10(1):34–77. (In Russ)]
53. Kumar SK. Targeted Management Strategies in Multiple Myeloma. *Cancer J*. 2019;25(1):59–64. doi: 10.1097/PPO.0000000000000353.
54. Multiple Myeloma Research Consortium. Myeloma-Developing Regimens Using Genomics (MyDRUG). Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03732703> (accessed 2.06.2021).