

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
“Национальный медицинский исследовательский центр гематологии”  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

Макунина Элеонора Анатольевна

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *MAGE-C1* И БЕЛКА *MAGE-C1* НА КЛИНИЧЕСКОЕ  
ТЕЧЕНИЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

3.1.28 – гематология и переливание крови

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Менделеева Л.П.

кандидат медицинских наук

Гальцева И. В.

Москва, 2022

## Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	9
1.1. Эпидемиология.....	9
1.2. Патогенез множественной миеломы.....	10
1.3. Теория эволюции заболевания.....	11
1.4. Характеристика течения парапротеинемических гемобластозов.....	13
1.5. Прогноз и стадирование множественной миеломы.....	14
1.6. Терапия множественной миеломы.....	16
1.7. Хронология изучения раково-тестикулярных антигенов.....	19
1.8. Раково-тестикулярный антиген <i>MAGE-C1</i> .....	21
1.9. Роль X-хромосомы в патогенезе множественной миеломы.....	22
1.10. Экспрессия <i>MAGE-C1</i> при различных нозологиях.....	23
1.11. Экспрессия <i>MAGE-C1</i> при множественной миеломе.....	25
1.12. <i>MAGE-C1</i> как предиктор неблагоприятного прогноза и маркер минимальной остаточной болезни.....	27
Глава 2. Характеристика больных и методы исследования.....	30
2.1. Характеристика больных.....	30
2.2. Методы исследования.....	33
2.2.1 Исследование экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.....	35
2.2.2 Исследование экспрессии белка <i>MAGE-C1</i> плазматическими клетками костного мозга иммуногистохимическим методом.....	37
2.2.3 Определение числа плазматических клеток в костном мозге, экспрессирующих белок <i>mage-c1</i> , методом мультипараметрической проточной цитофлуориметрии.....	38
2.2.4 Рутинные диагностические методы исследования.....	41
2.2.5 Статистический анализ.....	41
Глава 3. Исследование экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> плазматическими клетками костного мозга методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.....	42
Глава 4. Исследование экспрессии белка <i>MAGE-C1</i> иммуногистохимическим методом.....	46
Глава 5. Сопоставление экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> методом ПЦР-РВ и белка <i>MAGE-C1</i> методом	

ИГХ в плазматических клетках костного мозга у больных ММ.....	50
Глава 6. Определение экспрессии белка MAGE-C1 плазматическими клетками костного мозга методом проточной цитофлуориметрии.....	52
Глава 7. Взаимосвязь клинико-лабораторных параметров больных ММ с экспрессией гена MAGE-C1 и белка MAGE-C1.....	59
7.1. Взаимозависимость клинико-лабораторных характеристик больных ММ с нормальной и повышенной экспрессией гена <i>MAGE-C1</i> .....	59
7.2. Показатели экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> в зависимости от клинико-лабораторных характеристик больных ММ.....	66
7.3. Сопоставление клинико-лабораторных характеристик больных ММ в зависимости от нормальной и повышенной экспрессии белка MAGE-C1, выявленной иммуногистохимическим методом.....	70
7.4. Сопоставление клинико-лабораторных характеристик больных ММ с содержанием ПК, экспрессирующих MAGE-C1, выявленных методом проточной цитофлуориметрии.....	75
7.5. Влияние экспрессии гена MAGE-C1 и белка MAGE-C1 на развитие миеломной кастанефропатии в дебюте ММ.....	79
Глава 8. Оценка противоопухолевого ответа после выполнения индукционного и трансплантационного этапов терапии больных ММ.....	86
8.1. Оценка противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие курсы в зависимости от экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> .....	86
8.2. Оценка противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие курсы в зависимости от экспрессии белка MAGE-C1.....	93
8.3 Экспрессия гена <i>MAGE-C1</i> как маркер рецидива или прогрессии у больных ММ после ауто-ТГСК.....	102
Глава 9. Обсуждение.....	107
Заключение.....	116
Выводы.....	117
Список используемых сокращений.....	118
Список литературы.....	120

## Введение

### Актуальность темы

Множественная миелома (ММ) - В-клеточная опухоль, морфологическим субстратом которой являются аберрантные плазматические клетки, продуцирующие моноклональный иммуноглобулин. При ММ сложный набор генетических и эпигенетических изменений приводит к неопластической трансформации плазматических клеток, что способствует их неконтролируемому росту.

В современной практике гематолога существует немало известных биомаркеров для верификации диагноза, оценки и прогнозирования ответа на терапию. Рабочей группой Национального института здравоохранения по определению биомаркеров (NIH Biomarkers Definitions Working Group) понятие биологического маркера рассматривается как “характеристика, которую возможно объективно измерить, оценить как показатель нормальных биологических процессов, патологических процессов или фармакологического ответа на терапевтическое воздействие” [17].

Биологические маркеры включают в себя как диагностические так и прогностические факторы. При ММ для определения таких факторов применяются методы визуализации, помогающие оценивать степень инфильтрации костного мозга плазматическими клетками, выявлять очаги остеодеструкций, экстрамедуллярные поражения, а также лабораторные методы. Рутинные лабораторные методы представлены иммунохимическим исследованием белков сыворотки крови и суточной мочи, клиническим и биохимическим анализами крови, цитологическим исследованием пунктата костного мозга, гистологическим исследованием трепанобиоптата костного мозга. Совокупность диагностических параметров, позволяет не только устанавливать диагноз ММ, проводить стадирование заболевания, оценивая величину опухолевой массы, но и анализировать степень воздействия проводимого лечения [17, 99].

В то же время, за последнее десятилетие, в эпоху развития молекулярной биологии, значительно расширились возможности изучения генетических трансформаций в опухолевых клетках и изменений костномозгового микроокружения, способствующих росту опухолевого субстрата [12, 49]. Каждый новый этап интерпретации этих молекулярных открытий способствовал модификации и пересмотру диагностических критериев, которые на данный момент позволяют провести более раннее распознавание ММ и начать терапию до появления признаков органного поражения.

Раково-тестикулярные антигены (РТА) - активно изучаемая группа опухолеассоциированных антигенов, которые в норме имеют ограниченную экспрессию на

некоторых здоровых тканях (яичко, трофобласт, плацентарные клетки). Патологическая экспрессия данной группы антигенов определяется при разных злокачественных новообразованиях, в том числе при множественной миеломе [34, 43, 45, 87].

Среди генов, кодирующих РТА, следует выделить ген *MAGE-C1*, экспрессия которого наиболее часто выявляется у больных ММ. Ген *MAGE-C1* расположен на длинном плече X-хромосомы и имеет выраженную специфичность в злокачественных плазматических клетках. Работы, в которых изучалась экспрессия гена *MAGE-C1* при ММ, описывают результаты, позволяющие предположить, что этот биомаркер может выступать в качестве дополнительного лабораторного показателя при диагностике ММ, отражать эффективность терапевтических подходов и являться одним из ключевых событий, обуславливающих рефрактерность ММ, способствуя выживанию злокачественных плазматических клеток, защищая их как от спонтанного так и от лекарственного апоптоза [26, 31, 33, 56]. В частности, в литературе представлено одно исследование, описывающее влияние наличия экспрессии гена *MAGE-C1* на плазматических клетках на снижение их восприимчивости к терапевтическому эффекту бортезомиба [33].

На сегодняшний день, число исследований, изучающих роль гена *MAGE-C1* при ММ ограничены. Имеющиеся данные о *MAGE-C1* не позволяют однозначно говорить о его роли в развитии злокачественных заболеваний и ММ в частности. Понимание влияния других РТА на клеточный цикл также ограничено. Факторы, контролирующие экспрессию гена *MAGE-C1* в соматических клетках здоровых тканей и опухолевых клетках, остаются неизученными. Несмотря на это, большинство авторов сходятся во мнении о том, что РТА могут способствовать прогрессии опухолей и в целом выступать в качестве маркеров неблагоприятного течения заболевания [11, 32, 33, 45, 85, 103].

В связи с этим представляется важным изучить наличие экспрессии гена *MAGE-C1* как фактора, способствующего снижению вероятности достижения ответа на противоопухолевую терапию бортезомибом и выживаемости без прогрессии после выполнения высокодозного этапа терапии и трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК). Актуальным является и поиск взаимосвязи экспрессии исследуемого гена с другими клинико-лабораторными характеристиками с целью изучения биологии опухолевой трансформации.

## Цель исследования

Изучение экспрессии гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1 в плазматических клетках костного мозга больных множественной миеломой в дебюте заболевания, а также поиск взаимосвязи с клиническим течением заболевания для оценки возможности использования их в качестве прогностических факторов.

## Задачи исследования

1. Определить экспрессию гена *MAGE-C1* в плазматических клетках методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) у больных ММ до начала лечения.

2. Детектировать экспрессию белка MAGE-C1 плазматическими клетками иммуногистохимическим (ИГХ) методом и методом мультипараметрической проточной цитофлуориметрии (МПЦ) у больных ММ до начала лечения.

3. Изучить взаимосвязь клинико-лабораторных параметров с экспрессией гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1 у больных ММ.

4. Оценить противоопухолевый ответ на бортезомиб-содержащую терапию больных ММ в зависимости от экспрессии гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1.

5. Определить вероятность развития рецидива или прогрессии в зависимости от экспрессии гена *MAGE-C1* после ауто-ТГСК.

## Научная новизна

Впервые проведено исследование, направленное на изучение особенностей экспрессии гена *MAGE-C1*, тремя методами: ПЦР-РВ, ИГХ и проточной цитометрии. Произведено сопоставление результатов, полученных при выполнении этих методов.

Освоена и адаптирована методика определения внутриядерной экспрессии белка MAGE-C1 методом проточной цитометрии.

Изучена взаимосвязь показателей экспрессии исследуемых целевых параметров с клиническим течением множественной миеломы.

Определена группа больных с экскрецией белка Бенс-Джонса относительно риска развития миеломной каст-нефропатии на основании высокого содержания ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1 и экспрессии гена *MAGE-C1*.

## Практическая значимость

Результаты проведенного исследования послужили основанием для определения персонализированного подхода к терапии ММ. Так, у больных с повышенной экспрессией гена *MAGE-C1* целесообразно применение двух таргетных препаратов уже в первой линии индукционной терапии.

Определен высокий коэффициент корреляции между результатами ПЦР-РВ и ИГХ методов исследования, что позволяет применять ИГХ исследование трепанобиоптатов костного мозга в случае низкой клеточности пунктата костного мозга, что может составлять трудности для выполнения ПЦР-РВ.

## Положения, выносимые на защиту

1. Определение экспрессии гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1 в плазматических клетках костного мозга является важным для изучения патобиологических основ развития ММ.
2. Результаты ПЦР-РВ и ИГХ методов показали высокий уровень корреляции при исследовании экспрессии гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1.
3. Повышенная экспрессия гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1 может рассматриваться в качестве дополнительного биомаркера неблагоприятного течения ММ.
4. Выявление повышенной экспрессии гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1 может способствовать формированию резистентности опухоли к бортезомиб-содержащим схемам индукционной терапии.
5. Наличие повышенной экспрессии гена *MAGE-C1* существенно влияет на вероятность развития рецидива или прогрессии у больных ММ после ауто-ТГСК.

## Апробация

Основные положения диссертации представлены в материалах и докладах на:

1. V Конгрессе гематологов России (Москва, 2020г.);
2. XVIII Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Москва, 2021г.);
3. 63 ежегодном Конгрессе Американского общества гематологии (Атланта, 2021г.);
4. VI Конгрессе гематологов России (Москва, 2022г.);
5. Конгрессе Европейской гематологической ассоциации ЕНА (Вена, 2022г.).

Апробация диссертации состоялась на объединенном заседании проблемных комиссий

«Фундаментальные и клинические исследования в гематологии; проблемы клинической и производственной трансфузиологии» ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ 18 июля 2022 года.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 34 работы, из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 30 тезисных сообщений (23 на русском языке, 7 на английском языке).

### **Объем и структура работы**

Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, клинической характеристики больных и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, приложений. Текст работы содержит 32 таблицы, 30 рисунков. Список литературы включает 7 отечественных и 99 зарубежных источников.



## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Эпидемиология

Множественная миелома (ММ) - злокачественная опухоль, характеризующаяся клональной пролиферацией терминально дифференцированных плазматических клеток в костном мозге [46, 78].

ММ является вторым наиболее распространенным гематологическим заболеванием после неходжкинских лимфом и составляет примерно 10% от всех гемобластозов. Несмотря на это, ММ по-прежнему является редкой формой онкологического заболевания и диагностируется не более чем в 1,5% случаев всех злокачественных новообразований [42, 58, 59, 62, 73, 77, 89, 103].

В 2017 году в России зарегистрировано 4075 новых случаев ММ, что составило 2,78 на 100000 населения, соотношение мужчин и женщин равнялось 1:1,3, несмотря на мировую статистику, которая показывает, что у представителей мужского пола заболевание встречается чаще, чем у женщин. Так, по данным Американского онкологического общества в 2016 году в США было зарегистрировано 30330 случаев ММ, из которых 59% были диагностированы у мужчин [4, 86]. Для сравнения, в 2012 году в России впервые диагностировано 3128 случаев ММ [5]. Увеличение частоты заболеваемости отчасти связано с улучшением диагностических методов, а новые критерии диагностики позволяют распознать заболевание и начинать терапию на более ранних этапах.

Множественную миелому принято считать заболеванием населения пожилого возраста [22, 59, 62, 89]. По данным российского регистра, у 63% больных заболевание диагностируется в возрасте от 50 до 69 лет (2575 случаев), вдвое меньше больных на момент диагностики находятся в возрастном диапазоне от 70 до 84 лет (1079 случаев). Медиана возраста на момент установки диагноза составляет 66 лет. Лишь 8% пациентов составляют люди моложе 50 лет [4].

Кроме того, заболеваемость ММ имеет доказанную зависимость от расовой принадлежности. Так, у афроамериканцев риск развития ММ в два раза выше, чем у представителей белой расы, а самые низкие показатели заболеваемости наблюдаются у представителей азиатской расы [52].

Диагностика и лечение ММ претерпели значительные изменения за последние два десятилетия. Само определение заболевания было модифицировано в связи с введением современных диагностических критериев, а появление в терапевтических схемах новых препаратов, привело к улучшению выживаемости - общей и без прогрессии [72].

## 1.2. Патогенез множественной миеломы

ММ представляет собой заболевание, основой которого является многоступенчатый процесс трансформации нормальных плазматических клеток, являющихся наиболее дифференцированными представителями В-клеточной линии кроветворных клеток, в злокачественные в результате накопления генетических поломок [63, 70].

Патогенез ММ характеризуется неконтролируемым накоплением aberrантных плазматических клеток в костном мозге [49, 90]. Генетически обусловленное нарушение созревания В-клеток вызвано экспансией патологического клона на определенной стадии дифференцировки, отраженной в В-клеточном рецепторе (BCR) [23].

Во время ранней дифференцировки В-клеток в костном мозге вариабельный (variable (V), отвечающий за разнообразие (diversity (D), и соединительный (joining (J) сегменты генов тяжелых цепей иммуноглобулина проходят рекомбинацию, в результате чего происходит формирование иммуноглобулина М на поверхности незрелого В лимфоцита. Этот процесс предшествует моменту перегруппировки генов легких цепей иммуноглобулина. После успешной рекомбинации иммуноглобулина, локусы легкой цепи иммуноглобулина (Ig) перестраиваются. Первым подвергается перестройке Ig-каппа-локус, если же функциональная перегруппировка не достигается, рекомбинация происходит в Ig-лямбда-локусе легкой цепи иммуноглобулина. В результате образуется белковый комплекс иммуноглобулина на поверхности клетки, так называемый В-клеточный рецептор, позволяющий клеткам избегать апоптоза. Далее, незрелые, но иммунокомпетентные В-клетки, экспрессирующие на поверхности IgM, покидают костный мозг и переходят в лимфатические узлы, достигая герминального центра, где происходит созревание аффинности за счет связывания В-клеточного рецептора с родственным для него антигеном. На этой стадии происходят два основных молекулярных события, способствующих развитию ММ: соматическая гипермутация и рекомбинация с переключением классов иммуноглобулинов. Эти процессы подразумевают тесное взаимодействие между В-клетками, антиген-процессинговыми дендритными клетками и Т-клетками, позволяя В-клеткам, несущим антигенспецифические рецепторы на их поверхности, выживать и пролиферировать. В результате описанных выше процессов происходит формирование плазматических клеток, несущих на мембране гены Ig с измененным изотипом (IgG, IgA, IgE или IgD), при этом экспрессия IgM сохраняется менее чем в 1% всех случаев ММ [16, 40, 60].

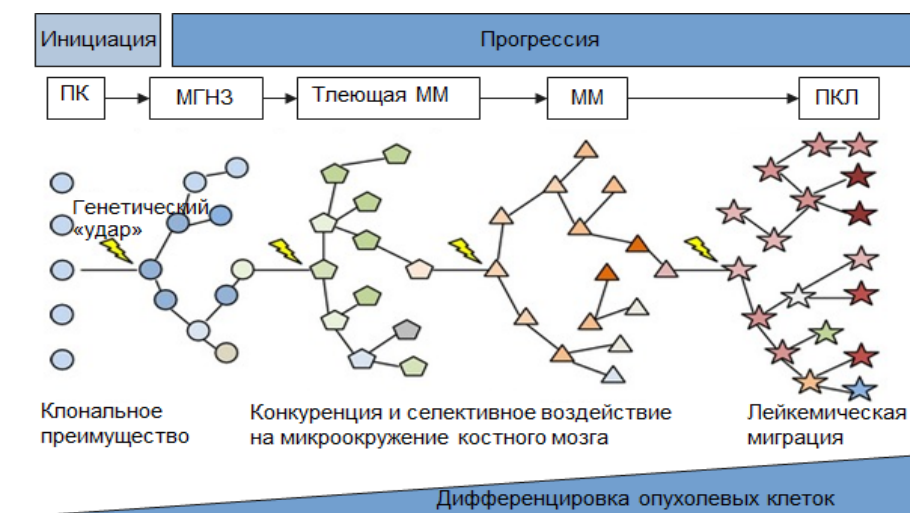
По данным Международной рабочей группы по изучению множественной миеломы (IMWG) среди 10000 новых случаев ММ у 60% больных выявили секрецию моноклонального парапротеина G, 24% - секрецию IgA, 11%- секрецию только свободных легких цепей, 3%- IgD

и 2%- биклональный или другой изотип. Эти данные коррелируют с уровнем иммуноглобулинов, продуцируемых в сутки у здоровых людей [40]. Наряду с выявлением таких редких вариантов секреции как парапротеины D, E и M класса, примерно в 1% случаев диагностируется несекретирующая ММ. Такой вариант заболевания подразумевает отсутствие моноклонального белка при электрофорезе и иммунофиксации белков сыворотки крови и суточной мочи, а так же при анализе свободных легких цепей (СЛЦ). Кроме того, чтобы подтвердить диагноз истинной несекретирующей миеломы, необходимо сохранить отсутствие парапротеина на протяжении всего периода наблюдения [40, 50, 73].

### 1.3. Теория эволюции заболевания

Долгое время считалось, что ММ эволюционирует последовательно от моноклональной гаммапатии неопределенного значения (МГНЗ) до терминальных фаз, таких как экстрамедуллярные опухоли и плазмоклеточный лейкоз вследствие накопления новых мутаций. Такая теория линейной эволюции, подразумевающая развитие опухоли из одной клетки с последовательным накоплением генетической изменчивости в исходном клоне, способствуя отбору более агрессивных субклонов с однородным мутационным ландшафтом, была предложена Питером Новеллом в 1976 году [64].

Однако недавние исследования с использованием секвенирования следующего поколения позволили представить более сложную геномную архитектуру заболевания, доказывающую клональную гетерогенность ММ за счет смещения клонального доминирования с течением времени. Данная гипотеза впервые продемонстрирована J. Bahlis, в последующем описана разными авторами, схематично представлена на **рисунке 1**. Она заключается в том, что приобретение новых мутаций может развиваться не только линейно в доминантном клоне, но и на каждом этапе клеточной дифференцировки, способствуя прогрессированию болезни посредством субклональной эволюции из клонов-коллекторов с паттернами ветвления. Каждый субклон может нести новые мутации и различные фенотипы, изменяя чувствительность к лекарственным средствам. Быстрое приобретение генетических мутаций и структурных перестроек минорным клоном-предшественником характеризуется развитием высокой злокачественности, обычно наблюдается при заболевании высокого цитогенетического риска [12, 30, 39].



**Рисунок 1.** Схема, иллюстрирующая эволюцию клональной архитектуры при множественной миеломе (ММ) в дебюте заболевания и рецидиве.

ПК - плазматические клетки, МГНЗ — моноклональная гаммапатия неопределенного значения, ПКЛ — плазмоклеточный лейкоз [12].

Данная гипотеза может объяснить снижение продолжительности противоопухолевого ответа при стандартных схемах терапии, что диктует необходимость поиска альтернативных вариантов лечения. При этом у больных с длительно сохраняющейся ремиссией до следующей терапии возможно возвращение первичного доминантного клона, а следовательно возможность противоопухолевого ответа на предыдущие схемы. Конечной целью лечения является уничтожение всех клонов, включая субклональные популяции с различными биологическими характеристиками. Эта цель может быть достигнута путем дальнейшего изучения геномного ландшафта заболевания и внедрения новых стратегий терапии [30, 39].

В результате такой неоднородности развития и течения заболевания, ММ остается одной из самых трудноизлечимых злокачественных опухолей. Несмотря на введение новых терапевтических агентов, способствовавших улучшению пятилетней общей выживаемости (ОВ) с 34,8% (1998-2001 гг.) до 44,6% (2006-2009 гг.) как у больных, рассматривающихся в качестве кандидатов на выполнение трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК), так и у остальной когорты пациентов, прогноз при данном гемобластозе остается неблагоприятным. Более глубокое понимание молекулярного патогенеза заболевания возможно позволит улучшить результаты лечения пациентов с ММ [28, 30, 65].

#### 1.4. Характеристика течения парапротеинемических гемобластозов

Основываясь на данные, полученные в результате изучения генетической архитектуры заболевания, на сегодняшний день установлено, что все случаи ММ дебютируют через фазу бессимптомного накопления клональных плазматических клеток - МГНЗ. Этот этап представляет собой многолетнее, бессимптомное течение болезни, характеризующееся наличием клональной популяции плазматических клеток в пределах костного мозга менее 10% [49, 62, 69]. Более 50% пациентов с данным диагнозом живут в среднем 10 лет до присоединения клинических симптомов [73].

Следующим за МГНЗ этапом развития болезни является тлеющая миелома, которая так же характеризуется бессимптомным течением и отсутствием повреждения органов-мишеней. Но в отличие от МГНЗ при этой форме болезни увеличивается диагностически значимое количество ПК в костном мозге от 10 до 60%, уровня М градиента в крови более 30 г/л, в моче  $\geq$  500 мг/сут. Частота прогрессирования МГНЗ в симптоматическую ММ составляет 1% в год, тогда как при тлеющей ММ риск прогрессирования в течение года увеличивается в 10 раз в период первых пяти лет, 3% в год в течение следующих 5 лет и далее - 1,5%. На скорость прогрессирования в первую очередь влияют цитогенетические аномалии. Так, у пациентов с транслокацией t(4; 14), делецией 17p и амплификацией 1q наблюдается более высокий риск прогрессирования от тлеющей миеломы до симптоматической [48]. Пересмотр в 2014 году критериев диагноза ММ, позволил выделить тлеющую ММ ультравысокого риска, вероятность прогрессирования при которой в течение 2 лет достигает 70-80%, в связи с чем, лечение таких больных необходимо начинать сразу после установления диагноза [63, 73].

Непосредственно симптоматическая ММ характеризуется неопластической пролиферацией патологического клона плазматических клеток, секретирующих моноклональных парапротеин и индуцирующих повреждение органов-мишеней, составляющих совокупность CRAB-синдрома (гиперкальциемия, почечная недостаточность, анемия, очаги остеодеструкции) [22, 67, 69, 73]. На сегодняшний день, симптоматической ММ принято считать заболевание, при диагностике которого присутствуют критерии, предложенные IMWG в 2014 году. К ним относится наличие плазматических клеток в костном мозге равное 10% и более и/или выявление плазмноклеточной опухоли в биопсийном материале пораженной ткани, в сочетании с одним или более признаком органного поражения, связанного с плазмноклеточной пролиферацией. Кроме того, выявление при цитологическом исследовании более 60% плазматических клеток в костном мозге так же принято расценивать как плазмноклеточную миелому, независимо от наличия поражения органов- мишеней [73].

Характерной особенностью миеломных клеток является потребность в тесной взаимосвязи с микроокружением костного мозга, где плазматические клетки существуют в специализированных нишах, поддерживающих их долгосрочное выживание. Однако, во время прогрессирования заболевания клональные клетки приобретают способность к миграции за пределы костного мозга, в результате чего образуются экстрамедуллярные поражения или наблюдается переход в плазмноклеточный лейкоз (ПКЛ) [63].

Диагноз ПКЛ устанавливается при выявлении абсолютного количества плазматических клеток в периферической крови не менее  $2,0 \times 10^9/\text{л}$  или более 20% от общего числа лейкоцитов. Плазмноклеточный лейкоз может быть классифицирован как первичный, который составляет 60% всех ПКЛ, или как вторичный, в результате трансформации из ранее диагностированной ММ. ПКЛ характеризуется агрессивным течением и быстрым прогрессированием [70, 73, 74, 75].

Кроме того, Международной рабочей группой по изучению множественной миеломы была выделена группа других заболеваний, связанных с клональной пролиферацией плазматических клеток, которая включила в себя следующие нозологии: не-Ig-M моноклональная гаммапатия неопределенного значения, IgM-моноклональная гаммапатия неопределенного значения, обычно прогрессирующая в макроглобулинемию Вальденстрема, моноклональная гаммапатия легких цепей неопределенного значения, солитарная плазмцитомы, солитарная плазмцитомы с минимальным вовлечением костного мозга, РОEMS-синдром, системный AL-амилоидоз [73].

### **1.5. Прогноз и стадирование множественной миеломы**

Первая современная прогностическая модель ММ была предложена Б. Дюри и С. Сальмоном в 1975 году на основании использования общедоступных клинических параметров, включая уровень гемоглобина, сывороточного кальция, креатинина, повреждение костной ткани, а так же наличие моноклонального белка в сыворотке крови или в моче [83]. Эта система имела клиническое и прогностическое значение для «измеряемого» заболевания и была основана на представлениях об опухолевой прогрессии, а так же на корреляции между количеством патологического иммуноглобулина в сыворотке и массой опухоли. Состояние почечной функции выступало дополнительным признаком, определяющим подстадию [41, 68, 96].

Несмотря на то, что на сегодняшний день определение стадии по Durie-Salmon не потеряло свою актуальность, для определения прогноза заболевания широко используется международная система стадирования (ISS), предложенная Greipp et al. в 2005 году. Эта система

представляет собой простой алгоритм стратификации риска, основанный на двух параметрах: высокий уровень  $\beta$ 2-микροглобулина в сыворотке крови отражает высокую массу опухоли и снижение функции почек, а низкий уровень сывороточного альбумина обусловлен главным образом воспалительными цитокинами, такими как интерлейкин-6, секретируемый клетками стромы и позволяет оценивать общую тяжесть заболевания. Основываясь на результатах, полученных в рамках клинических исследований, у больных, имеющих в дебюте заболевания уровень  $\beta$ 2-микροглобулина более 5,5 и классифицируемое как III стадия, представляют собой группу высокого риска с медианой выживаемости 29 месяцев. У больных с диагностированной I и II стадиями медиана общей выживаемости составила 69 и 44 месяца соответственно [41, 68, 83, 85, 96].

Однако, несмотря на широкое применение данной схемы в качестве прогностической, наряду с расширением терапевтических возможностей, проводился поиск прогностических факторов, которые могли бы улучшить стратификацию рисков у больных ММ для определения их в более однородные подгруппы относительно выживаемости.

В 2015 году IMWG была предложена пересмотренная международная система стадирования (Revised International Staging System for Multiple Myeloma, R-ISS), которая дополняет стадии по ISS информацией о хромосомных аномалиях и активности ЛДГ (**таблица 1**).

**Таблица 1.** Пересмотренная международная система стадирования (R-ISS, IMWG 2015 г.).

Стадии ISS	Исследуемые параметры
I	$\beta$ -2 микροглобулин сыворотки < 3,5 мг/л, альбумин $\geq$ 3,5 г/дл
II	Критерии не соответствуют I или II стадиям
III	$\beta$ -2 микροглобулин $\geq$ 5,5 мг/л
Стадии R-ISS	
I	ISS стадия I, цитогенетические аномалии стандартного риска (FISH) и нормальный уровень ЛДГ
II	Критерии не соответствуют I или III стадиям
III	ISS стадия III, цитогенетические аномалии высокого риска (наличие del 17p и/или транслокации t(4;14) и/или транслокации t(14;16) и/или высокий уровень ЛДГ

Значения ЛДГ, превышающие нормальные, встречаются приблизительно у 10-15% пациентов с впервые диагностированной ММ [92]. Было показано, что повышение активности ЛДГ сопровождается агрессивным течением заболевания, высокой пролиферативной

активностью плазматических клеток, наличием экстрамедуллярных очагов и более короткой продолжительностью общей выживаемости. Прогностическая ценность этого показателя усиливается наблюдением, что при неоднородности цитогенетических aberrаций и их неоднозначного влияния на показатели выживаемости, ЛДГ стабильно сохраняет свое прогностическое значение. В эпоху новых лекарственных агентов эти данные так же нашли свое подтверждение [36, 92].

Что касается цитогенетических аномалий, то, наличие делеции del17p, транслокации t(4;14) или t(14;16) позволяет идентифицировать пациентов с заболеванием высокого риска. Клиническое исследование A. Palumbo, включавшее 4445 больных с I, II и III стадией по R-ISS, подтвердило влияние этих параметров на ОВ. Показатели 5-летней общей выживаемости больных составили 82%, 62% и 40%, соответственно [68].

Система стадирования по R-ISS включила в себя простые, надежные и широко используемые прогностические маркеры, что обеспечивает ее повсеместное применение [68].

Несмотря на то, что оценка исходных прогностических признаков играет большую роль в последующем ответе на терапию и продолжительности жизни в целом, определяющего значения на выбор тактики терапии она не несет.

## **1.6. Терапия множественной миеломы**

Несмотря на то, что ММ считается неизлечимым заболеванием, терапевтические цели заметно изменились за последние четыре десятилетия в результате внедрения новых эффективных противоопухолевых стратегий. До 1980-х годов стабилизация заболевания или достижение частичной ремиссии расценивались как успех проводимой терапии. Большую роль в достижении более глубоких ответов сыграло внедрение в лечебную практику высокодозной химиотерапии (ВХТ) с последующей ауто-ТГСК, а в последнее время за счет использования ингибиторов протеасом (бортезомиб, иксазомиб и карфилзомиб) и иммуномодулирующих препаратов (талидомид, леналидомид и помалидомид) [5, 57, 58, 62]. Стало возможным достижение полной ремиссии, первоначально определяемой как отсутствие М-градиента на электрофорезе сыворотки крови и мочи, а затем как отсутствие парапротеина при иммунофиксации. Большое влияние на показатели общей и безрецидивной выживаемости после ауто-ТГСК оказывает достижение более глубокого противоопухолевого ответа на фоне индукционной терапии [51].

Клиническая гетерогенность больных ММ требует персонализированного подхода и немаловажным критерием для оценки состояния перед началом терапии, помимо возраста, является коморбидность. Именно поэтому, считается важным подбор терапии (корректировка



доз препаратов или увеличение интервалов между введениями), направленный на достижение наиболее глубокого и длительного ответа с максимальным сохранением оптимального качества жизни больного [10, 39].

Для лечения первичных больных ММ моложе 65 лет без серьезной сопутствующей патологии используют высокодозную химиотерапию с последующей ауто-ТГСК. Больным старше 65 лет или больным с тяжелыми сопутствующими заболеваниями следует рекомендовать комбинации на основе новых лекарственных препаратов без ВХТ [5].

Новые лекарственные средства и их комбинации позволили достигать более глубокие и длительные ремиссии, в том числе и у больных пожилого возраста, терапия у которых долгое время была ограничена алкилирующими препаратами [58].

До введения новых препаратов для лечения пожилых больных ММ использовалась схема мелфалан+преднизолон (МР) с медианой общей выживаемости 29-37 месяцев. Такая практика в лечении применялась более 40 лет [38, 65]. Введение новых препаратов в схемы терапии продемонстрировало улучшение безрецидивной и общей выживаемости в сочетании с невысокой токсичностью, делая тем самым эти варианты наиболее предпочтительными для использования при лечении ММ [22, 47, 79, 100].

Первым из новых лекарственных средств к вышеупомянутой схеме терапии был добавлен талидомид, который привел к увеличению медианы выживаемости в среднем на 20% [38]. Его противоопухолевая эффективность основана на предотвращении образования и роста новых кровеносных сосудов в опухоли и ингибировании продукции VEGF - эндотелиального фактора роста сосудов и bFGF- основного фактора роста фибробластов. Кроме того, талидомид вызывает апоптоз или остановку роста опухолевых миеломных клеток, подавляя продукцию различных цитокинов (интерлейкин -6, интерлейкин – 10, фактор некроза опухоли  $\alpha$  - TNF-  $\alpha$ ) и стимулируя естественные Т-киллеры [61, 76].

Леналидомид был вторым иммуномодулятором, используемым для терапии больных ММ. Он является структурным аналогом талидомида и имеет схожее воздействие на опухолевые клетки и стромальное микроокружение, при этом отличается более высокой биологической активностью и меньшей токсичностью [1, 82]. Леналидомид так же зарекомендовал себя как препарат выбора у пожилых больных, его непрерывное применение в паре с низкими дозами дексаметазона (схема Rd) позволило улучшить показатели общей и безрецидивной выживаемости по сравнению со схемой МРТ (мелфалан+преднизолон+талидомид). Рандомизированные исследования, сравнивающие применение триплетных схем на основе леналидомида в комбинации с алкилирующим агентом и глюкокортикостероидными гормонами не показали преимуществ по сравнению с дуплетом Rd [22, 37, 53, 57, 59, 71]. Схема Rd рекомендована Европейским сообществом медицинской

онкологии как терапия выбора у больных, не рассматриваемых в качестве кандидатов на проведение высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией, наряду с триплетом бортезомиб+мелфалан+преднизолон (VMP) [79]. По данным рандомизированного исследования III фазы VISTA (Velcade as Initial Standard Therapy in Multiple Myeloma) добавление к дуплету МР ингибитора протеасом бортезомиба привело к улучшению общей выживаемости на 13 месяцев. Кроме этого, последующая оптимизация введения бортезомиба подкожно один раз в неделю, способствовала улучшению переносимости лечения, и не оказала негативного влияния на эффективность [59, 80].

Синтез первого в своем классе ингибитора протеасом бортезомиба стал одним из главных достижений в лечении пациентов с ММ [50, 65]. Этот препарат продемонстрировал поразительную клиническую эффективность, позволяя добиться быстрого достижения противоопухолевого ответа уже на первых курсах, наряду с дальнейшим углублением ответа при продолжении лечения [77].

Для пациентов, рассматриваемых в качестве кандидатов на выполнение высокодозной консолидации с последующей ауто-ТГСК на данный момент стандартом индукционной терапии являются схемы на основе сочетания бортезомиба и дексаметазона (VD). Добавление третьего препарата к этой комбинации показало увеличение частоты ответа. Применение триплетных схем на основе VD позволило увеличить частоту достижения очень хорошей частичной ремиссии (ОХЧР) до 70% по сравнению с 15%, которые наблюдались на стандартной в 1990-х годах схеме винкристин+доксорубин+дексаметазон (VAD) [22, 47, 62].

Применение трансплантационной лечебной методики позволило повысить процент достижения полных ремиссий до 38-40 %. Тогда как применение только химиотерапевтических стратегий обеспечивало достижение полной ремиссии лишь у 14% больных [1].

Первые попытки применения ауто-ТГСК при множественной миеломе были представлены В. Varlogie и соавт. в 1987 г. Работы в этом направлении позволили определить оптимальный режим предтрансплантационного кондиционирования мелфаланом в дозе 200 мг/м<sup>2</sup>, применяемый и в настоящее время и являющийся «золотым стандартом» [15, 88].

Терапия онкологических заболеваний претерпела заметную эволюцию в последние десятилетия, переходя от эры химиотерапии, когда препараты были неспецифично направлены против высокопролиферирующих клеток, к новой эре таргетной терапии, в которой лекарственные средства и их комбинации обладают специфическим биологически направленным механизмом противоопухолевого воздействия. Помимо уже зарекомендовавших себя методов лечения ММ, все большее число новых агентов разрабатывается в настоящее время, а некоторые из них уже завершили ранние фазы клинической апробации. Эти агенты формально можно разделить на две группы. Первая группа: ингибиторы протеасом второго и

третьего поколений (карфилзомиб, иксазомиб, опрозомиб, маризомиб), иммуномодулирующие (леналидомид, помалидомид) и алкилирующие препараты (бендамустин, мелфлуфен), которые синтезированы из уже одобренных активных агентов. И вторая группа - лекарственные препараты с новым механизмом действия: моноклональные антитела (даратумумаб), агенты, действующие на белки и ферменты, вовлеченные в клеточный цикл, ингибиторы деацетилазы (панобиностат, вориностат), агенты, действующие на путь развернутого белкового ответа (танеспимицин), ингибиторы сигнального пути и ингибиторы киназы. Данные препараты находятся на разных стадиях клинической разработки [65].

В связи с появлением такого разнообразия терапевтических возможностей, появилась необходимость в поиске оптимизированных инструментов для мониторинга течения заболевания (например, оценка минимальной остаточной болезни), так как хорошо доказано, что глубина ответа на терапию является одним из самых важных факторов успеха применяемых схем лечения [70].

### **1.7. Хронология изучения раково-тестикулярных антигенов**

В конце XIX века, Уильям Коли - хирург из онкологического центра Memorial Sloan Kettering в Нью-Йорке (США), заметил, что некоторым событиям спонтанного прогрессирования опухоли часто предшествовали инфекционные эпизоды. Тогда им была высказана идея о том, что иммунная система пациента может распознавать и реагировать на определенные опухолевые белки (антигены) [31]. Первоначально такие опухоль-связанные антигены были выявлены у пациентов со злокачественной меланомой, при этом в нормальной ткани они были описаны лишь в плацентарных клетках и зародышевых клетках яичка, почему и были названы раково-тестикулярными антигенами (РТА). Редкие представители этой группы определяются в нормальных клетках других тканей, например, поджелудочной железы, печени, селезенки, но уровень их экспрессии намного ниже, чем в тестикулярных клетках. В то же время, аберрантная экспрессия в соматических клетках наблюдается при многих типах рака, в связи с чем РТА определены классом опухоль-ассоциированных антигенов, перспективным для изучения при различных злокачественных новообразованиях, в том числе при множественной миеломе [32, 42, 81, 85, 87, 101, 103].

Изучение РТА началось в начале 90-х годов после идентификации меланома-ассоциированного антигена MAGE-A1/CT1 (melanoma antigen gene family member A1/cancer testis 1) [87, 94, 97]. После этого, для поиска новых иммуногенных опухоль-ассоциированных антигенов, использовались различные биологические и иммунологические методы, из которых наибольшую эффективность показал серологический анализ библиотек экспрессии

рекомбинантных кДНК (SEREX) [23, 25, 26, 27, 81, 85, 87, 95].

С увеличением числа описанных РТА, для дифференцировки этих генов необходимо было выработать номенклатуру. В связи с отсутствием информации о функции РТА в клеточной среде, классификация была основана на хронологическом порядке их обнаружения, например, MAGE-A1/CT1, BAGE/CT2 (B melanoma antigen/cancer testis 2). На сегодняшний день описано более 250 раково-тестикулярных антигенов. Часть из них кодируется генами, локализующимися на X-хромосоме, другие же кодируются генами остальных хромосом (аутосом). Антигены, кодируемые генами, локализованными на X-хромосоме составляют более половины всех РТА [27, 32, 87].

Гены, локализующиеся на X-хромосоме обычно показывают высокую активность экспрессии в сперматогониях, которые являются митотически пролиферирующими половыми клетками. Такая группа генов часто экспрессируется в злокачественных клетках, которые имеют тенденцию экспрессировать несколько РТА. Гены, расположенные на аутосомах распределены по всему геному, в яичках обычно экспрессируются в сперматоцитах, многие из них играют роль в мейозе. Их абберрантная экспрессия в злокачественных клетках может вызывать аномальную сегрегацию хромосом и анеуплоидию [32, 87].

Экспрессия РТА опосредована такими механизмами как метилирование ДНК и ацетилирование гистонов. Вместе с тем во время нарушения эпигенетического программирования, возникающего при многих опухолевых заболеваниях, может происходить деметилирование промотора, что вызывает гиперэкспрессию РТА [27, 29, 31, 85, 87].

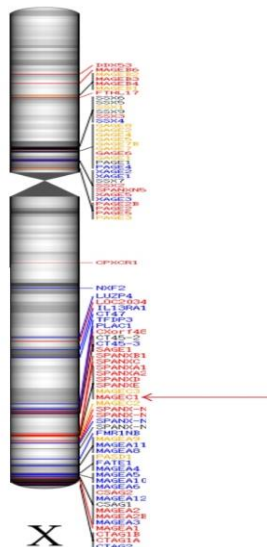
Учитывая данные об отсутствии экспрессии клетками яичка и плаценты главного комплекса гистосовместимости 1 класса, раково-тестикулярные антигены не распознаются цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ, CD8). В 1991 году, van der Bruggen выделил аутологичные ЦТЛ из культуры облученных опухолевых клеток крови пациента с меланомой и продемонстрировал специфическую узнаваемость РТА этими Т-лимфоцитами *in vitro*, что позволило рассматривать РТА в качестве мишеней для вакцинотерапии различных злокачественных заболеваний. Несмотря на перспективность идеи об опухолевой вакцинотерапии, на сегодняшний день использование этих антигенов в качестве терапевтических мишеней не доказало свою успешность. Возможно, более глубокое изучение РТА, позволит определить роль этих антигенов в патогенезе злокачественных заболеваний и помочь в разработке новых терапевтических агентов [27, 31, 32, 45, 85, 94, 97].

Кроме того, была предложена гипотеза, согласно которой активация экспрессии групп раково-тестикулярных генов может способствовать опухолевой трансформации наряду с изученными изменениями в сигнальных путях [87].

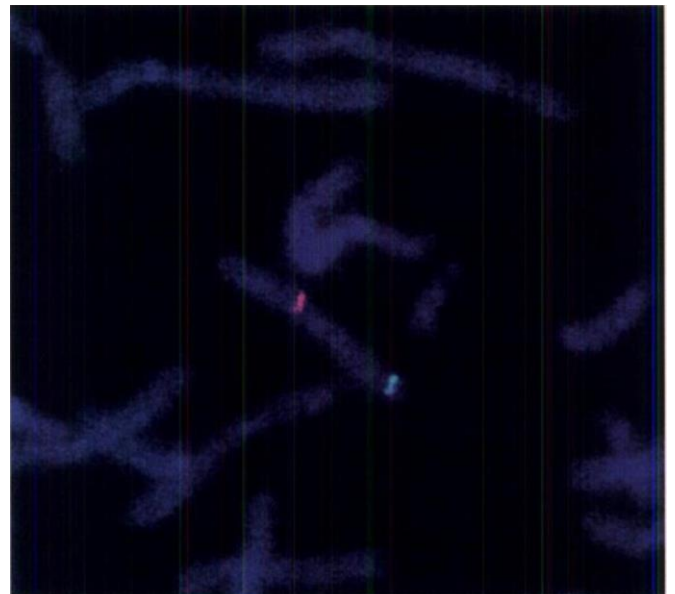
### 1.8. Раково-тестикулярный антиген MAGE-C1

Среди РТА, выявленных у больных множественной миеломой, следует выделить MAGE C1/CT7 (melanoma antigen gene family member C1/cancer testis 7), расположенный на длинном плече X-хромосомы в локусе Xq26 - Xq27.2 и имеющий выраженную специфичность в злокачественных плазматических клетках. Ген *MAGE-C1* был идентифицирован с помощью SEREX в клеточной линии меланомы (SK-MEL-37) [26, 27, 29, 31, 32, 34, 42, 87].

Расположение гена *MAGE-C1* на X-хромосоме в области Xq26 - Xq27.2 (**рисунок 2А**) было подтверждено с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), специфические сигналы гибридизации на дистальной части X-хромосомы показаны зеленым цветом на **рисунке 2Б** [33, 56].



А



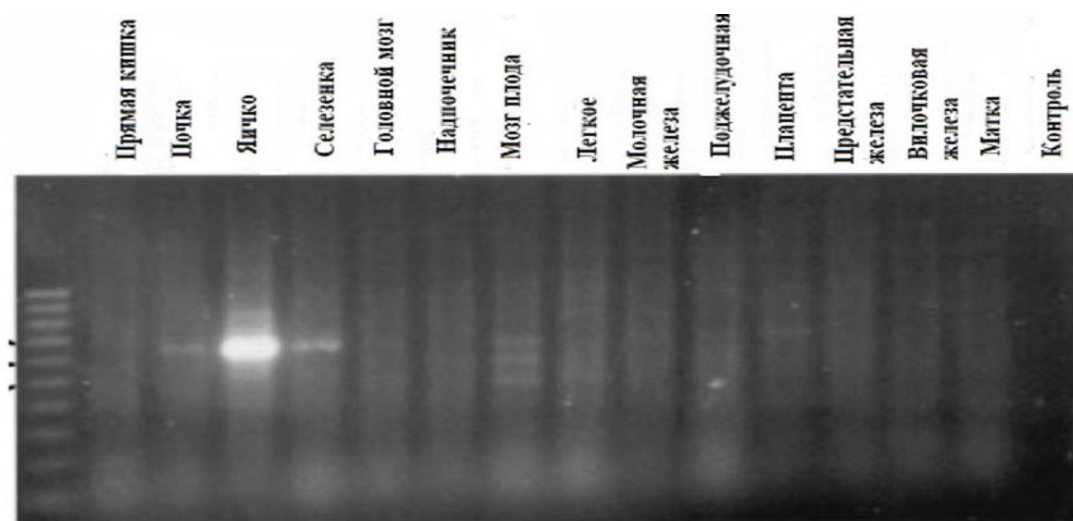
Б

**Рисунок 2. Локализация гена MAGE-C1:**

А- схематичное изображение локализации гена *MAGE-C1* на длинном плече X хромосомы;  
 Б- локализация гена *MAGE-C1*, определенная с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*: зонд на центромере (красный) и зонд *MAGE-C1* (зеленый) демонстрируют специфические сигналы в Xq26-Xq27 [56].

Что касается экспрессии MAGE-C1 в клетках здоровых тканей, то высокий уровень экспрессии наблюдается только в клетках яичек. Следовые количества ПЦР продукта были обнаружены в почках, печени, плаценте и мозге плода, однако при секвенировании они

оказались неспецифическими продуктами амплификации (рисунок 3) [26].



*Рисунок 3. Анализ экспрессии гена MAGE-C1 в клетках здоровых тканей методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени [26].*

Расположение белка MAGE-C1 в плазматических клетках характеризуется как внутриклеточное, обнаруживаемое в цитоплазме, или внутриядерное [27, 31, 45]. Однако, в исследовании M. V. Dhodarkar и соавт. экспрессия MAGE-C1 выявлялась методом проточной цитометрии в ПК, не подвергшихся пермеабиллизации, что позволило интерпретировать этот факт как наличие экспрессии этого РТА на поверхности плазматических клеток. Кроме того, был обнаружен один образец мембранного окрашивания опухолевых клеток плазмоцитомы методом ИГХ. Однако, эти данные единичны, поэтому требуют дальнейшего изучения и подтверждения [35].

### **1.9. Роль X-хромосомы в патогенезе множественной миеломы**

Несмотря на то, что X хромосома несет большое число точечных мутаций при злокачественных заболеваниях, общий уровень ее мутационной активности остается ниже чем у других хромосом. Это объясняется тем, что, в отличие от аутосом, для которых присутствуют две активные копии, и мужские и женские клетки несут только одну активную X- хромосому (Xa), в связи с инактивацией одной из двух женских X- хромосом. Процесс инактивации происходит во время дифференцировки эмбриональных стволовых клеток и характеризуется стохастическим выбором X хромосомы, подвергаемой инактивации [14]. Инактивированная

копия (X<sub>i</sub>) характеризуется стабильностью во всех последующих клеточных делениях [19]. Этот процесс приводит к транскрипционному молчанию большинства генов, расположенных на X-хромосоме. Однако, более 20% генов продолжают экспрессироваться на инактивированной X-хромосоме, из-за наличия мутаций, связанных с частичной дупликацией длинного плеча. У больных ММ такой феномен может выступать цитогенетическим маркером анеуплоидии, поскольку связан с большим количеством хромосомных разрывов [13, 44].

В исследовании Sticca и соавт., в которое было включено 162 пациента с ММ, с помощью метода сравнительной геномной гибридизации производилась оценка частоты мутаций, часть из которых, вероятно, имели случайный характер, учитывая их низкую встречаемость. К числу повторяющихся аномалий были отнесены изменение профиля X хромосомы и экспрессия генов, кодирующих РТА.

Несмотря на то, что в этом исследовании не было выявлено прямой связи между изменением профиля X-хромосомы и наличием конкретных генетических мутаций, было доказано, что общее количество изменений геномного профиля значительно более часто встречалось у пациентов с частичными изменениями X-хромосомы по сравнению с пациентами с нормальным профилем X. У таких больных была документирована более низкая продолжительность общей выживаемости. Частичное удвоение длинного плеча X хромосомы редко встречается при злокачественных новообразованиях и может быть характерным изменением при ММ.

Как было сказано выше, частичная дупликация Xq может приводить к повышению экспрессии генов, расположенных на этом плече X хромосомы. Среди этих генов IKBKG и IRAK1, принимающие участие в активации сигнального пути NFκB, который играет важную роль в прогрессировании ММ и развитии резистентности к терапии ингибиторами протеасом. Данные, указывающие на биологическую роль других генов, расположенных на Xq, позволяют предполагать, что одновременная повышенная экспрессия нескольких генов может играть роль в активации сигнальных путей, участвующих в развитии ММ [90].

### **1.10. Экспрессия MAGE-C1 при различных нозологиях**

Несмотря на растущий интерес к РТА, их биологические функции как в зародышевой линии, так и в опухолевых клетках остаются плохо изученными. Основным вопросом заключается в том, способствует ли их экспрессия опухолевому генезу или же эти белки являются побочным продуктом клеточной трансформации [29, 45, 85, 101].

Долгое время анализ экспрессии РТА проводился в опухолевых клетках, в основном, солидных опухолей. Так, в исследовании M. Scanlan и соавт. по результатам детекции 41 гена,

кодирующего РТА в аберрантных клетках 16 типов злокачественных заболеваний было выделено три группы [81]:

- опухоли с высокой экспрессией, при которых выявляется экспрессия более 50% генов, кодирующих РТА, с частотой экспрессии более 20%;

- опухоли с умеренной экспрессией — 30-50% выявляемых генов с частотой экспрессии более 20%

- опухоли с низкой экспрессией- менее 30% выявляемых генов, кодирующих РТА.

К группе злокачественных заболеваний с высокой экспрессией генов, кодирующих РТА, были отнесены немелкоклеточный рак легких и меланома. Более чем у 20% больных с немелкоклеточным раком легких и меланомой, выявили экспрессию 17 из 33 (51%) и 17 из 32 (53%) изучаемых генов соответственно. В свою очередь, рак молочной железы и рак простаты можно было считать заболеваниями, отнесенными ко второй группе, 12 из 32 (37%) и 6 из 20 (30%) исследуемых транскриптов генов имели частоту экспрессии в более 20% случаев при этих заболеваниях. К группе с низкой экспрессией были отнесены рак почки и рак толстой кишки, при этих нозологиях транскрипты различных генов, экспрессирующих РТА, определялись в самом малом проценте. Лишь три гена (9 %) из 33, на предмет которых были исследованы биоптаты при раке почки, имели стабильную экспрессию более чем в 20% биоптатов, при раке толстой кишки анализ показал экспрессию только 4 (16 %) генов из 25 изучаемых.

Семь типов опухолей из этих 16 были изучены на предмет экспрессии только 10-20 семейств генов. Из них, гепатоцеллюлярная карцинома и рак мочевого пузыря были отнесены к группе высокой экспрессии генов. У больных карциномой 8 из 10 исследуемых генов были обнаружены в более чем 20% образцов опухоли. Одновременная экспрессия 11 (55%) из 20 исследуемых транскриптов генов была выявлена более чем у 20% больных с раком мочевого пузыря. Рак пищевода, рак головы и шеи, рак яичников и саркома были классифицированы как опухоли, умеренно экспрессирующие гены, кодирующие РТА. Лейкозы и лимфомы, как и рак желудка, отнесли к группе с низкой экспрессией. При этих заболеваниях частота детекции исследуемых генов составила 3 из 16 и 2 из 10 соответственно, при этом *MAGE-C1* не был выявлен ни в одном случае исследуемых гематологических заболеваний [27, 81, 87].

В последние несколько лет все большее число исследований были направлены на изучение экспрессии РТА при гематологических злокачественных заболеваниях. Анализ экспрессии РТА иммуногистохимическим методом при неходжкинских лимфомах, так же как и в предыдущем исследовании, позволил отнести эту нозологию к заболеваниям с низкой экспрессией РТА, - лишь 11,3% образцов биоптатов опухолей при ИГХ экспрессировали по меньшей мере 1 из РТА. Антигены семейств *MAGE-A* (6,6%), *GAGE* (5,7%) и *NY-ESO-1* (4,7%)



были наиболее часто экспрессируемы. Однако, какой-либо корреляции между выявленной экспрессией, клиническими параметрами и ответом на терапию выявлено не было [24].

Как уже было сказано, экспрессия РТА является редким событием для большинства гемобластозов, включая лейкозы, неходжкинские лимфомы и другие В-клеточные лимфопролиферативные заболевания. Одновременно с этим, была определена группа антигенов, составивших исключение. К ним была отнесена высокая экспрессия *MAGE-C1*, выявленная при множественной миеломе, а так же экспрессия антигена *CT45* (cancer/testis antigen family 45), которая была выявлена в 58% (42 из 72) биопсийных образцов пациентов с классической лимфомой Ходжкина в результате определения *CT45*-положительных клеток Березовского–Штернберга ИГХ методом. Лимфома серой зоны, как случаи с признаками диффузной В-крупноклеточной лимфомы, так и варианты с признаками классической лимфомы Ходжкина, также демонстрировала частую (64%) экспрессию *CT45* [ 9, 24, 43, 45, 54].

Стоит отметить, что отсутствие стандартизированной выборки больных, включенных в исследования, изучающие экспрессию генов, кодирующих РТА, не позволяет расценивать данные, полученные в ходе анализа как окончательные показатели частоты экспрессии при изучаемых видах опухолей.

### 1.11. Экспрессия *MAGE-C1* при множественной миеломе

При оценке экспрессии генов, кодирующих РТА, в исследовании D. Atanackovic и соавт. у 29% больных с I/II стадией впервые диагностированной ММ была выявлена экспрессия хотя бы одного представителя этой группы генов, у больных с III стадией наличие экспрессии наблюдали в 60% случаев [11]. При этом, ген *MAGE-C1* является наиболее часто выявляющимся геном, кодирующим РТА, при ММ. В разных исследованиях приведены данные о том, что частота его экспрессии варьирует от 57% до 88,5% [11, 29, 32, 45, 93, 95, 98, 101, 103]. В исследовании van Duin M. и соавт. изучались так же образцы костного мозга пациентов с ММ в рецидиве заболевания, в 61% случаев была выявлена экспрессия гена *MAGE-C1* [98].

Экспрессия *MAGE-C1* рассматривается как специфически ограниченная aberrантными плазматическими клетками [11, 32, 33, 42, 45, 85, 93]. Это было неоднократно подтверждено, в том числе исследованием А. А. Jungbluth, в котором проводилась детекция *MAGE-C1* двумя методами. Уровень транскрипции мРНК исследуемого гена определяли методом ПЦР-РВ в aberrантных плазматических клетках пунктата костного мозга, а наличие белка *MAGE-C1* в плазматических клетках трепанобиоптатов выявляли с помощью ИГХ анализа. Данные, полученные с помощью этих методов исследования, коррелировали между собой и продемонстрировали прямую зависимость между выявлением экспрессии *MAGE-C1* и объемом

опухолевой массы. Так, у больных с МГНЗ, включенных в исследование, частота выявления экспрессии гена *MAGE-C1* составила всего 17% методом ПЦР-РВ и 13% ИГХ методом, в то время как при I/II стадии по Дюри-Сальмон симптоматической ММ показатель экспрессии составил уже 67% и 75% соответственно, а при III стадии — более 82%. В качестве контроля использовался материал трепанобиоптаты здоровых доноров, не показавших специфического окрашивания плазматических клеток при ИГХ. Также, ограниченность aberrантными плазматическими клетками была подтверждена при ИГХ окрашивании образцов клеточной линии неходжкинских лимфом, которое показало отсутствие детекции *MAGE-C1* в В-клетках разных уровней дифференцировки [33, 45].

Похожие данные приведены в другом исследовании. В 2008 г. используя метод ИГХ окрашивания, M. Tinguely и соавт. описали похожие результаты. Ими была выявлена экспрессия белка *MAGE-C1* в 97 из 169 (57%) образцов трепанобиоптатов пациентов с ММ и лишь в двух из восьми гистологических образцах костного мозга пациентов с МГНЗ. 85% положительных образцов с ММ характеризовались высокой степенью экспрессии этого белка. Анализ экспрессии белка *MAGE-C1* в aberrантных плазматических клетках выявил цитоплазматическую (31%), ядерную (7%) или комбинированную (62%) картину окрашивания [93].

Однако, в одном из недавних исследований проводилась детекция белка *MAGE-C1* методом проточной цитофлуориметрии в костном мозге и периферической крови у 12 больных ММ. Помимо пролиферирующей субпопуляции плазматических клеток, экспрессия *MAGE-C1* была обнаружена в клетках ранней стадии дифференцировки. Начиная с клеток-предшественников стабильно высокая экспрессия сохранялась на стадии про-В и пре-В-лимфоцитов (CD34 + / CD117 + и CD19 + / CD10 +) и ранних незрелых В-клеток (CD34- / CD19 + / CD20dim +). Последующий анализ экспрессии в поздних незрелых В-клетках и клетках памяти выявил отсутствие положительного окрашивания, указывая на то, что белок *MAGE-C1* не экспрессируется в этих типах клеток [84, 101].

В периферической крови был выявлен похожий характер экспрессии исследуемого белка. Позитивное окрашивание также определялось в циркулирующих клетках предшественниках, сохраняясь до фазы ранних незрелых В-лимфоцитов. Далее, по мере созревания В-клеток наблюдалось значительное снижение экспрессии белка *MAGE-C1*. В случае выявления популяции пролиферирующих ПК в периферической крови, выявлялась картина экспрессии *MAGE-C1* аналогичная таковой в образцах костного мозга. Таким образом, авторами было высказано предположение, что первичные злокачественные клетки, экспрессирующие *MAGE-C1*, не ограничены локализацией в костном мозге и их миграция в кровеносное русло способствует распространению заболевания, проявляясь наличием экстрамедуллярных плазмоцитом, однако

четких доказательств на сегодняшний день не предоставлено [101].

Ряд работ показали прямую зависимость между экспрессией антигена MAGE-C1 и индексом пролиферативной активности плазматических клеток, что позволяет установить связь между экспрессией РТА и нарушением регуляции клеточного цикла, главным образом, способствуя выживанию злокачественных плазматических клеток, защищая их как от спонтанного, так и от лекарственного апоптоза [11, 32, 33, 45, 93, 95]. В том числе и в исследовании М. Tinguely и соавт. была определена статистически достоверная корреляция между частотой выявления экспрессии белка MAGE-C1 и увеличением пролиферативной активности ПК. При этом наиболее высокий пролиферативный индекс был документирован при ядерной или смешанной экспрессии изучаемого РТА, в отличие от случаев с цитоплазматической локализацией или MAGE-C1 негативных образцах. Наличие экспрессии белка MAGE-C1 не выявило какого либо-влияния на показатели общей выживаемости. Однако, было замечено, что пациенты с экспрессией белка MAGE-C1 в цитоплазме имели статистически значимую разницу в показателях общей выживаемости по сравнению с пациентами, в трепанобиоптатах которых определялось смешанное или внутриядерное окрашивание (медианы общей выживаемости 48 и 33 месяца соответственно) [93].

#### **1.12. MAGE-C1 как предиктор неблагоприятного прогноза и маркер минимальной остаточной болезни**

Довольно много исследований посвящено изучению наличия экспрессии РТА при различных нозологиях как на уровне РНК, так и на уровне белка. Однако, долгое время не было ни одного исследования, анализирующего экспрессию РТА в опухолевых клетках на фоне терапии или после ее завершения.

В том же исследовании D. Atanackovic и соавт. провели анализ экспрессии гена *MAGE-C1* и трех других генов, кодирующих РТА, как минимум в двух точках наблюдения на фоне стандартных химиотерапевтических подходах с последующей ауто-ТГСК или без нее, а также после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток крови (алло-ТГСК). Медиана наблюдения составила 7 месяцев. Наблюдалась обратная корреляция между глубиной ответа и частотой экспрессии РТА у больных, получивших химиотерапевтическое лечение. Из всех образцов костного мозга, полученных от пациентов с полной ремиссией, только в 20% была выявлена экспрессия РТА, в группе больных с частичной ремиссией этот показатель составил 50 %, тогда как в группе с резистентно-рецидивирующим течением заболевания частота экспрессии РТА составила 90%.

Кроме того, наблюдалась значимая ( $p < 0,001$ ) корреляция между частотой детекции РТА

и вариантом применяемой терапии. Так, после применения только химиотерапевтического лечения, у 100% пациентов по-прежнему определялась экспрессия хотя бы одного изучаемого гена, тогда как применение ауто-ТГСК снижало выявление экспрессии до 77%, однако самое значительное снижение частоты выявления исследуемых генов наблюдалось после алло-ТГСК. При этом, только *MAGE-C1* показал стойкое сохранение экспрессии в плазматических клетках даже на фоне терапии, изменению подвергался лишь уровень этого гена [11]. Эта особенность гена *MAGE-C1* может быть использована в случаях контроля минимальной остаточной болезни у больных, достигших полной ремиссии после трансплантации [11, 95].

В связи с этим, отдельно были изучены 99 образцов костного мозга от 19 больных ММ, которым была выполнена алло-ТГСК. Анализ экспрессии гена *MAGE-C1* проводился на протяжении 12 месяцев после трансплантации с периодичностью в три месяца в контрольные точки стандартного мониторинга противоопухолевого ответа. По результатам исследования пациенты были разделены на три группы. Первую группу составили пациенты со стабильно низкими показателями экспрессии гена *MAGE-C1* и сохраняющейся полной ремиссией заболевания. Ко второй группе были отнесены пациенты, исследование экспрессии у которых показало постепенное снижение количества продукта гена *MAGE-C1* в течение периода наблюдения наряду со снижением клинических переменных, характеризующих объем опухолевой массы. В третьей группе у больных наблюдалось повышение значений экспрессии гена *MAGE-C1*, коррелирующее с увеличением секреции парапротеина крови, указывая на развитие рецидива заболевания. У части больных из последней группы повышение показателей экспрессии наблюдалось в конце периода наблюдения, до возникновения изменений в стандартных лабораторных показателях, позволяя предположить, что изменение уровня экспрессии могло предшествовать возникновению рецидива в более поздние сроки [11]. Похожие результаты были получены в исследовании E. M. Tyler и соавт. [95].

Так же, в работе D. Atanaskovic и соавт. была произведена оценка влияния экспрессии гена *MAGE-C1* на показатели выживаемости без прогрессии у 52 больных ММ после алло-ТГСК. У 75% больных с высоким уровнем экспрессии гена *MAGE-C1* прогрессия была документирована в среднем в течение 14 месяцев после выполнения трансплантации. Среди больных с отсутствием экспрессии этого гена, прогрессия была констатирована только в 7% случаев в течение 41 месяца ( $p < 0.001$ ). Эти данные так же подтверждают гипотезу о том, что *MAGE-C1* может являться более ранним маркером прогрессии ММ [11].

В статье K. Shires описаны результаты мониторинга экспрессии белка *MAGE-C1* в периферической крови пациентов с ММ методом проточной цитофлуориметрии на фоне лечения. Они опирались на свои данные о том, что *MAGE-C1* так же стабильно экспрессируется в клетках периферической крови на протяжении всего периода наблюдения, как и в клетках

костного мозга, изменяя лишь уровень. Показатели экспрессии коррелировали с изменениями уровней парапротеина,  $\beta$ 2-микроглобулина, при достижении полной ремиссии на фоне терапии наблюдалось снижение уровня экспрессии *MAGE-C1* более чем на 55%. В одном случае было документировано увеличение экспрессии до появления клинических признаков диагностируемого рецидива заболевания, таким образом предполагая, что детекция *MAGE-C1* в мононуклеарах периферической крови методом проточной цитофлуориметрии может быть использована в качестве быстрого и малоинвазивного метода мониторинга минимальной остаточной болезни [84, 101].

Для оценки эффективности терапии бортезомибом, F. De Carvalho и соавт. исследовали влияние экспрессии гена *MAGE-C1*, используя клеточные линии миеломы. Для стабильной экспрессии на клеточную линию миеломы SKO-007 переносили короткие РНК, образующие шпильки, специфичные для *MAGE-C1* (контрольные клетки), часть этих клеток подвергали ингибированию. Контрольный образец, как и ингибированные клетки, подвергали воздействию бортезомиба в разной концентрации (10 и 15 нмоль) в течение 48 часов. Меньшее количество бортезомиба индуцировало апоптоз в исследуемых клеточных линиях, однако различий в процентном соотношении между ингибированными и контрольными клетками обнаружено не было, в то время как при воздействии большей концентрации препарата наблюдалось увеличение апоптоза на 43% в ингибированных клетках по сравнению с контрольными клетками [33]. Таким образом, подавление экспрессии гена *MAGE-C1* может усиливать бортезомиб - индуцированный апоптоз в клеточной линии миеломы и указывать на то, что, вероятно, биологическая роль этого РТА связана с защитой опухолевых клеток от воздействия цитотоксических препаратов [33, 98].

Результаты этих исследований подчеркивают предположение о том, что экспрессия *MAGE-C1* может выступать в качестве дополнительного лабораторного показателя при диагностике ММ, может отражать эффективность терапевтических методов и являться маркером рецидива и прогрессии заболевания [11, 32, 33, 45, 85, 103].

## Глава 2. Характеристика больных и методы исследования

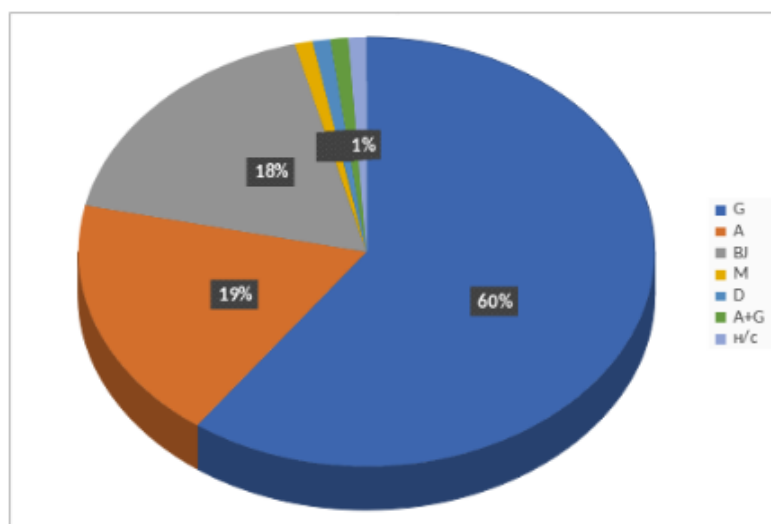
### 2.1. Характеристика больных

В исследование включено 97 больных впервые выявленной множественной миеломой (41 мужчина и 56 женщин), в возрасте от 30 до 82 лет (медиана 58 лет), находившихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в период с марта 2019 г. по февраль 2022 г. Работа носит проспективный характер.

Диагностика заболевания и противоопухолевая терапия проводились в отделении гематологии и химиотерапии парапротеинемических гемобластозов с блоком трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (зав. отделом- д.м.н., профессор Менделеева Л. П., зав. отделением – к.м.н. Соловьев М. В.) и отделении гематологии и химиотерапии плазмоклеточных дискразий (зав. отделением – д.м.н. Рехтина И. Г.). Наблюдение и обследование здоровых доноров костного мозга, включенных в исследование в качестве контрольной группы, осуществлялось в отделении интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга с круглосуточным стационаром (зав. отделением - к.м.н. Кузьмина Л.А.).

Диагностику множественной миеломы проводили в соответствии с критериями международной рабочей группы по изучению ММ (IMWG — 2014г.) [73]. В дебюте заболевания каждому больному выполняли стандартное обследование, включающее иммунохимическое исследование сыворотки крови и мочи, клинический и биохимический анализы крови, морфологическое и молекулярно-цитогенетическое исследование аспирата костного мозга, гистологическое и ИГХ исследование трепанобиоптата, рентгенологическое (КТ) исследование костей скелета.

Частота выявления иммунохимических вариантов парапротеина у больных ММ, включенных в исследование, представлена на **рисунке 4**. У 58 (60%) из 97 больных ММ выявлена секреция парапротеина G, у 18 пациентов – секреция парапротеина A, у 17 - секреция только легких цепей иммуноглобулинов и по одному больному с секрецией иммуноглобулинов M, D, несекретирующей и биклональной формой (G+A). Экскреция белка Бенс-Джонса зарегистрирована у 59 больных.



**Рисунок 4.** Частота выявления иммунохимических вариантов парапротеина у больных ММ, включенных в исследование.

По классификации Durie-Salmon отмечено следующее распределение больных: I-II стадия – у 21 больных, III стадия – у 76 пациентов. Миеломная каст-нефропатия была диагностирована у 21 больного (подстадия B). По международной системе стадирования (ISS) I стадия определена у 30 больных, II- у 25, III стадия – у 38 пациентов. Стандартное цитогенетическое исследование и FISH выполнены 91 из 97 больных, у 28 из которых выявлены нарушения кариотипа, соответствующие высокому цитогенетическому риску. В зависимости от стадии по R-ISS распределение выглядело следующим образом: I стадия была документирована у 19 больных, II - у 53, III - у 15 больных. Подробная характеристика больных, включенных в исследование, представлена в **таблице 2**.

**Таблица 2.** Характеристика больных ММ, включенных в исследование.

Исследуемые параметры	Клинико-лабораторная характеристика больных ММ в дебюте заболевания (n=97)
Пол: мужчины	41 (42,3%)
женщины	56 (57,7%)
Медиана возраста (лет), диапазон	58 (35-82)
≤ 65 лет	78 (80,4%)
> 65 лет	19 (19,6%)
Стадия по Durie-Salmon:	
I	7 (7,2%)
II	14 (14,4%)
III	76 (78,4%)
Стадия по ISS:	
I	30 (31%)
II	25 (25,7%)
III	38 (39,2%)
Нет данных	4 (4,1%)

Продолжение таблицы 2.

Исследуемые параметры	Клинико-лабораторная характеристика больных ММ в дебюте заболевания (n=97)
Стадия по R-ISS:	
I	19 (19,6%)
II	53 (54,6%)
III	15 (15,5%)
Нет данных	10 (10,3%)
Наличие костных плазмоцитом:	46 (47,4%)
Количество костных плазмоцитом:	
одна	19 (41,3%)
две и более	27 (58,7%)
Размеры костных плазмоцитом:	
менее 50 мм	24 (52,2%)
более 50 мм	22 (47,8%)
Высокий цитогенетический риск:	28 (28,9%)
Double-hit (две цитогенетические аномалии высокого риска)	17 (17,5%)
Лактатдегидрогеназа:	
80-280 Ед/л	58 (59,8%)
285-584 Ед/л	39 (40,2%)
Сывороточный кальций:	
1,22-2,65 ммоль/л	73 (75,3%)
2,68-3,95 ммоль/л	24 (24,7%)
$\beta$ 2-микроглобулин:	
1,61-5,5 мг/л	54 (55,6%)
5,6-19,0 мг/л	39 (40,2%)
Гемоглобин:	
55-119 г/л	66 (68%)
120- 151 г/л	31 (32%)
Сывороточный креатинин:	
45,4-177 мкмоль/л	76 (78,4%)
211-1535 мкмоль/л	21 (21,6%)
Соотношение СЛЦ:	
0,25-25	33 (34%)
26,5-29296	29 (30%)
Плазматические клетки в костном мозге:	
0,8-30 %	60 (61,9%)
30,4-89 %	37 (38,1%)
Сывороточный парапротеин:	
следы-30,2 г/л	48 (49,5%)
31,2-85 г/л	49 (50,5%)
AL-амилоидоз (сердце, ЖКТ, костный мозг)	3 (3,1%)



У 85 больных индукционный этап терапии включал бортезомиб-содержащие курсы: у 81 - VCD (бортезомиб+циклофосфан+дексаметазон), у четверых - VMP (бортезомиб+мелфалан+преднизолон). У 10 больных в качестве индукционной терапии были применены схемы, включающие два таргетных препарата (VRD). Двум больным, в связи с симптомами полинейропатии и аллергической реакцией на однократное введение бортезомиба, в дебюте заболевания в качестве терапии первой линии была применена схема, включающая только леналидомид (RCD). Всего на индукционном этапе терапии больным было проведено от 1 до 9 курсов (медиана 6). 31 больному потребовалось проведение двух и более линий терапии с включением леналидомид-содержащих курсов, схем с применением ингибиторов протеасом нового поколения (карфилзомиб, иксазомиб) или моноклонального антитела даратаумаб, а также схем с использованием только химиотерапевтических препаратов: MP (мелфалан+преднизолон), ДНАР (дексаметазон+цисплатин+цитарабин). Одному больному провели локальную лучевую терапию на область костной плазмоцитомы левой подвздошной кости в суммарной очаговой дозе 50 Гр до начала специфического лечения.

Высокодозная химиотерапия (мелфалан 200 мг/м<sup>2</sup>) с последующей ауто-ТГСК проведена 31 больному (у 23 - однократная, у 8 - тандемная ауто-ТГСК).

Оценку противоопухолевого ответа после индукционного этапа терапии и на 100-й день после ауто-ТГСК проводили в соответствии с критериями, разработанными IMWG (2016) [72]. Сроки наблюдения за больными варьировали от 1,3 до 35 месяцев (медиана 16,7 месяцев).

## 2.2. Методы исследования

В соответствии с задачами исследования всем 97 больным в дебюте заболевания выполняли пункцию и трепанобиопсию костного мозга. У доноров забор материала производился во время эксфузии костномозговой взвеси.

Пробоподготовка для последующего выполнения ПЦР-РВ, включающая выделение клеток мононуклеаров из нативной костномозговой взвеси 97 больных ММ, высокоактивную магнитную сепарацию по CD138 поверхностному антигену, анализ чистоты выделенной фракции, проводилась на базе лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России (зав. Лаборатории - к.м.н. Гальцева И.В.)

Определение значений экспрессии гена *MAGE-C1* в мононуклеарах костного мозга, обогащенных CD138+ клетками, выполняли методом ПЦР-РВ у 93 больных, у которых было выделено достаточное для исследования число клеток. В качестве контроля исследовались аналогичные клетки 8 здоровых доноров. Этот этап работы проводили на базе лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России (руководитель лаборатории

- Сурин В.Л.).

С целью оценки показателей экспрессии гена *MAGE-C1* использовали амплификатор Real-Time CFX96 Touch (Bio-RAD, США) на базе научно-клинической лаборатории кариологии (зав. лабораторией, к.м.н. Обухова Т.Н.).

Все использованные праймерные системы и зонды для выполнения ПЦР-РВ синтезировали в ЗАО «Синтол», Москва. Последовательности праймеров и флуоресцентных зондов являются оригинальными и были разработаны в ходе проведения данного исследования.

Трепанобиоптаты костного мозга 34 больных, были исследованы гистологическим методом для определения характеристики плазмноклеточного субстрата, а также ИГХ методом на предмет выявления экспрессии белка *MAGE-C1* плазматическими клетками. С целью отработки методики использования антитела к *MAGE-C1* проведено ИГХ исследование биоптата яичка и трепанобиоптатов костного мозга 7 здоровых доноров. Гистологическое и ИГХ исследования проводили в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. отд. д.б.н., профессор Ковригина А.М.).

Иммунофенотипирование клеток костного мозга и определение числа ПК, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, методом проточной цитофлуориметрии выполняли на базе лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. Лаборатории - к.м.н. Гальцева И.В.).

Для 29 больных, включенных в исследование, была выполнена детекция плазматических клеток, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, методом мультипараметрической проточной цитофлуориметрии. Контрольная группа включала 5 доноров костного мозга, аспират костного мозга которых также исследовался на предмет выявления ПК, экспрессирующих белок *MAGE-C1*.

Дизайн проспективного исследования схематически представлен на **рисунке 5**.

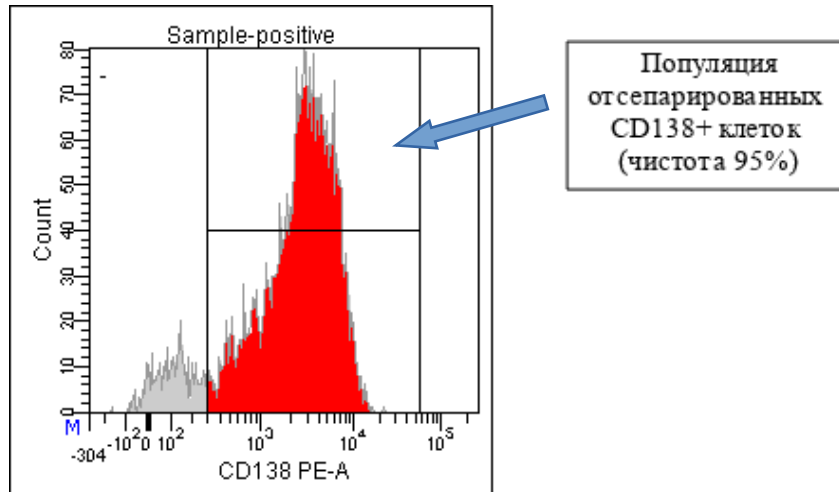


Рисунок 5. Дизайн исследования

### 2.2.1 Исследование экспрессии гена *MAGE-C1* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

В соответствии с задачами исследования, 97 больным в дебюте ММ и 8 здоровым донорам была выполнена ПЦР-РВ в CD138+ клетках с целью амплификации комплементарной ДНК (кДНК) на предмет определения значений экспрессии гена *MAGE-C1*.

Пробоподготовка включала в себя выделение фракции мононуклеаров из нативной костномозговой взвеси больных ММ. Выделенная клеточная фракция, содержащая не менее  $20 \times 10^9$ /л ядродержащих клеток, подвергалась позитивной иммуномагнитной селекции с использованием моноклонального антитела к CD138 MicroBeads human согласно протоколу Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) с помощью магнитного сепаратора OctoMacs (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) [104]. Анализ чистоты выделения мононуклеаров, обогащенных CD138+ клетками, проводили с помощью проточного цитометра BD FACSCanto II (BD Biosciences, США). Медиана содержания мононуклеаров, обогащенных CD138+ клетками, составила 73,2%. На рисунке 6 представлен пример визуализации CD138+ клеточного пула методом проточной цитометрии.



**Рисунок 6.** Гистограмма контроля чистоты популяции CD138+ клеток методом проточной цитофлуориметрии

Далее из каждого образца мононуклеаров, обогащенных CD138+ клетками, выделяли тотальную РНК с помощью готового раствора «TRIzol» (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя [106]. Чистоту РНК оценивали по соотношению A260/A280 (в пределах 1,8 — 2,0) на спектрофотометре.

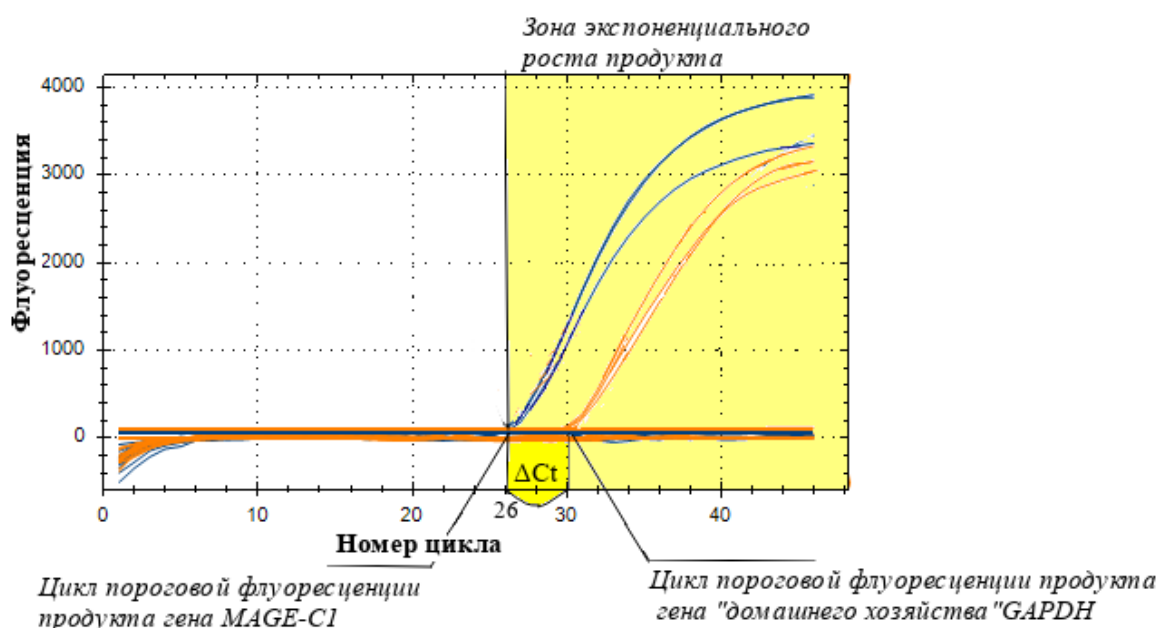
На матрице выделенной РНК производили построение кДНК посредством обратной транскрипции с использованием готового набора реагентов для ревертазной реакции согласно протоколу производителя (Promega, США) [105].

Полученная кДНК использовалась в качестве матрицы для ПЦР-РВ с системами праймеров к исследуемым генам (таблица 3). С целью детекции сигнала использовались флуоресцентные зонды, также указанные в таблице.

**Таблица 3.** Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов, использованных для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Ген	Праймер/Зонд	Последовательность нуклеотидов
<i>MAGE-C1</i>	Прямой	<i>tga-ggg-aca-cat-aca-tcc-taa-aag-c</i>
	Обратный	<i>ttg-tct-tct-ggg-aac-ctt-gac-tc</i>
	Зонд	(FAM) - <i>ac-tgc-ctg-ggc-ctc-ctc-tgc-tgt</i> -(BHQ1)
<i>GAPDH</i>	Прямой	<i>ggt-gaa-ggt-cgg-agt-caa-cg</i>
	Обратный	<i>tgg-gtg-gaa-tca-tat-tgg-aac-a</i>
	Зонд	(ROX) <i>ct-ctg-gta-aag-tgg-ata-ttg-ttg-cca-tca</i> -(BHQ2)

Уровень экспрессии гена *MAGE-C1* оценивали методом ПЦР-РВ (прибор Real-Time CFX96 Touch) по разнице ( $\Delta Ct$ ) между циклами пороговой флуоресценции продукта гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* и продукта исследуемого гена. Пример графического изображения накопления продукта амплификации для исследуемых генов представлен на **рисунке 7**. Значения  $\Delta Ct$  были переведены в разы  $2^{\Delta Ct}$  для сравнения результатов ПЦР-РВ в разных образцах. Полученные цифры позволяют оценить значения экспрессии гена *MAGE-C1* относительно значений экспрессии гена «домашнего хозяйства», поэтому итоговые показатели экспрессии не являются абсолютными.



**Рисунок 7.** Графическое изображение накопления продукта амплификации в ходе ПЦР-РВ для исследуемого гена *MAGE-C1* и гена «домашнего хозяйства» *GAPDH*.

### 2.2.2 Исследование экспрессии белка MAGE-C1 плазматическими клетками костного мозга иммуногистохимическим методом

Гистологическое и ИГХ исследования трепанобиоптатов костного мозга с целью детекции белка MAGE-C1 в плазматических клетках проведено у 34 больных ММ в соответствии с задачами исследования. Просмотр материала осуществлялся «слепым» методом, без сопоставления с клиническими и лабораторными данными.

С целью выполнения гистологического исследования трепанобиоптаты фиксировали в 10% растворе формалина, декальцинировали, после чего проводилась проводка по спиртам восходящей концентрации и заключение в парафин. Окраска срезов с парафиновых блоков гематоксилином и эозином проводилась по стандартной методике.

ИГХ исследование, для определения экспрессии белка MAGE-C1 плазматическими клетками костного мозга, проводили на автоматическом иммуностейнере LEICA Bond-MAX (Leica microsystems AG, Германия) с использованием стандартной панели реактивов. С целью достижения наилучших результатов окрашивания, заранее опытным путем подбирали степень pH буферного раствора для демаскировки, время демаскировки и оптимальный титр для каждого антитела. Характеристика антител, которые использовали при выполнении исследования, представлена в **таблице 4**. С целью сведения к минимуму возникновения ошибок на этапе гистохимического окрашивания, всю работу с антителами проводили одновременно.

**Таблица 4.** Характеристика использованных в исследовании антител.

Название антитела	Клон	Разведение	Производитель	Демаскировка	Реакция
Anti-CD138	EP201	1:100	EPITOMICS	pH=6 [ER1]	мембранная
Anti-MAGE-C1	EPR18067	1:100	Abcam	pH=9 [ER2]	цитоплазматическая/ ядерная

Анализ экспрессии белка MAGE-C1 плазматическими клетками проводили «слепым» методом с использованием микроскопа LEICA DM4000B (Leica microsystems AG, Германия). Оценку экспрессии исследуемого белка выполняли полуколичественным методом. Осуществляли подсчет процентного содержания ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, по отношению к общему числу клеток опухолевого субстрата. Кроме того, было произведено определение локализации экспрессии белка MAGE-C1 в ПК (цитоплазматическая, ядерно-цитоплазматическая).

### **2.2.3 Определение числа плазматических клеток в костном мозге, экспрессирующих белок MAGE-C1, методом мультипараметрической проточной цитофлуориметрии**

В соответствии с задачами исследования 29 больным в дебюте ММ было выполнено определение процентного содержания ПК в костном мозге, экспрессирующих белок MAGE-C1, методом проточной цитофлуориметрии.

Из 29 больных, включенных в этот этап исследования, 20 было выполнено иммунофенотипирование клеток костного мозга. При определении aberrантного иммунофенотипа клеток костного мозга за основу была взята тактика 6-цветного проточно-цитометрического анализа с использованием панели антител к антигенам: CD138, CD38, CD45,

CD27, CD56, CD19 [91]. Аберрантными считали клетки, на которых обнаруживали не менее двух признаков аномальной экспрессии антигенов: отсутствие CD19 или CD45, сниженную экспрессию CD38, высокую плотность экспрессии CD56, отсутствие или сниженную экспрессию CD27 [2, 6, 91].

Определение числа плазматических клеток в костном мозге, экспрессирующих белок MAGE-C1, проводили с применением антител к следующим антигенам: CD138, CD45 и MAGE-C1.

Исследование иммунофенотипа ПК и определение содержания ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, производили в двух независимых пробах.

Подробная характеристика примененных антител представлена в **таблице 5**.

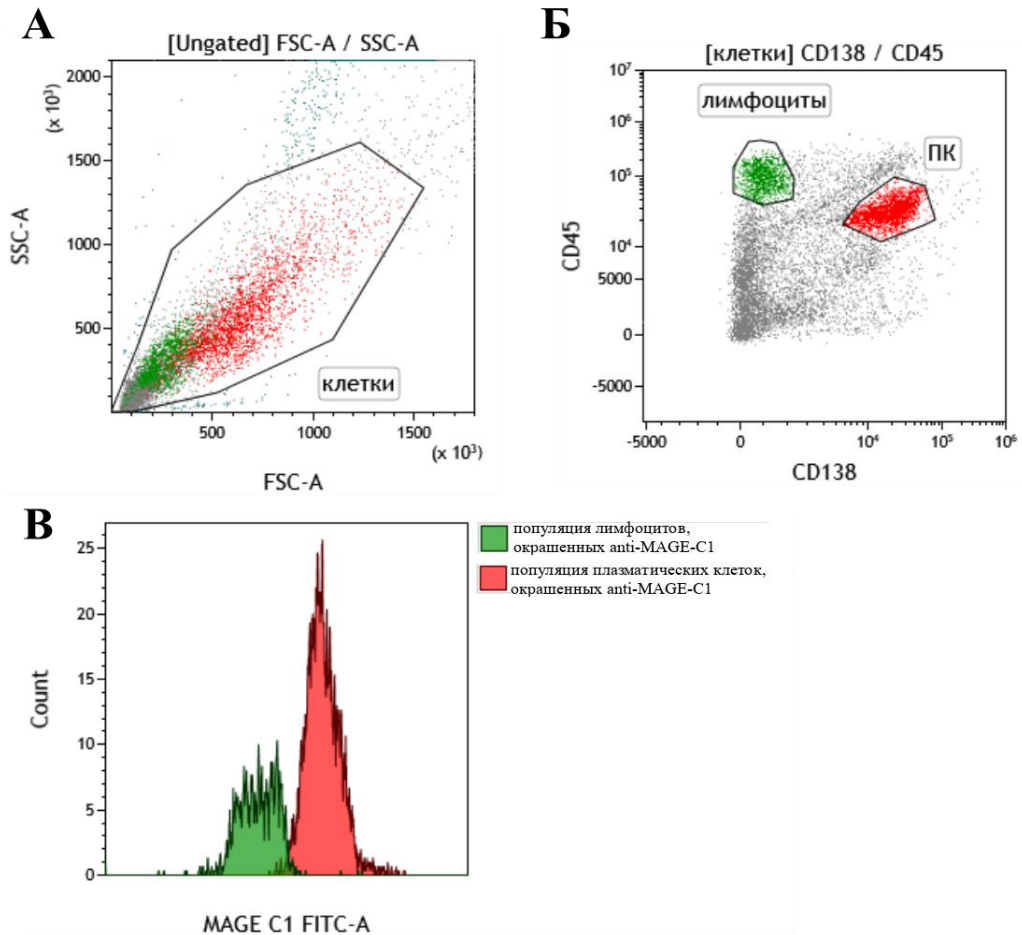
**Таблица 5.** Характеристики используемых антител.

Препараты АТ	Флюорохром	Производитель
Препараты моноклональных антител		
Anti-CD138	PE	BD Biosciences
Anti-CD38	FITC	BD Biosciences
Anti-CD45	APC-Cy7	BD Biosciences
Anti-CD56	PE-Cy7	BD Biosciences
Anti-CD27	APC	BD Biosciences
Anti-CD19	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
Препараты поликлональных антител		
Anti-MAGE-C1	FITC	BD Biosciences

Первый этап пробоподготовки для последующей детекции экспрессии белка MAGE-C1 в ПК, включал в себя лизирование клеток костного мозга с использованием раствора «PharmLyse» (BD Biosciences, США) в рабочей концентрации. После чего клетки осаждались центрифугированием и отмывались в растворе фосфатно-солевого буфера. Далее клеточный осадок инкубировали в 70% этаноле при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  минимум 4 часа с целью формирования пор в ядерной мембране и фиксации клеток. После инкубации клеточный осадок отмывали в растворе фосфатно — солевого буфера и инкубировали при температуре  $-8^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут с указанными антителами.

Анализ проводили с помощью проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, КНР).

Стратегия гейтирования представлена на **рисунке 8**. Сначала на диаграмме «FSC-A и SSC-A» исключали из дальнейшего анализа дебрис (**Рисунок 8А**). Далее на диаграмме «CD138 и CD45» определяли ПК по наличию экспрессии CD138 и лимфоциты по отсутствию CD138 и высокой плотности экспрессии CD45 (**Рисунок 8Б**). Затем рассчитывали процент плазматических клеток, окрашенных anti-MAGE-C1, от всех проанализированных клеток (**Рисунок 8В**). Популяция лимфоцитов использовалась в качестве отрицательного контроля.



**Рисунок 8.** Стратегия гейтирования для определения экспрессии белка MAGE-C1 методом проточной цитофлуориметрии:

*А - исключение из анализа дебриса;*

*Б - определение популяций плазматических клеток и лимфоцитов на основании экспрессии CD138 и CD45;*

*В - гистограмма экспрессии белка MAGE-C1 в популяции плазматических клеток и лимфоцитов.*



#### **2.2.4 Рутинные диагностические методы исследования**

Подсчет гемограмм и миелограмм, выполнение биохимических анализов крови, а также иммунохимического исследования сыворотки и мочи при помощи методов электрофореза и иммунофиксации проводились в централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. ЦКДЛ к.м.н. Двирнык В.Н.).

Цитогенетическое исследование клеток костного мозга проводилось в научно-клинической лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. лабораторией, к.м.н. Обухова Т.Н.). Наряду со стандартным цитогенетическим, выполнялось исследование методом FISH с использованием различных молекулярных зондов.

Оценка состояния костной ткани в дебюте заболевания и на разных этапах терапии осуществлялась при помощи компьютерной томографии в отделении рентгенологии и компьютерной томографии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. отделением, к.м.н. Костина И.Э.) и магнитно-резонансной томографии (зав. отделением - к.м.н. Яцык Г.А.).

#### **2.2.5 Статистический анализ.**

Для статистического анализа результатов были использованы классические методы описательной статистики, частотного анализа (анализа таблиц сопряженности), однофакторного дисперсионного анализа многофакторного логистического анализа. Работа выполнена совместно с сотрудниками информационно-аналитического отдела ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. отделом — к.т.н. Куликов С. М.). Расчеты проводились в статистических пакетах GraphPadPrism9 и SAS 9.4. Критический уровень значимости  $p$  принят равным 0,05.

### Глава 3. Исследование экспрессии гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

Определение экспрессии гена *MAGE-C1* методом ПЦР-РВ проводили в мононуклеарах костного мозга, обогащенных CD138+ клетками. Исследование выполняли у 93 больных ММ в дебюте заболевания и 8 здоровых доноров костного мозга.

Показатели экспрессии гена *MAGE-C1* у здоровых доноров представлены в **таблице 6**.

**Таблица 6.** Показатели экспрессии гена *MAGE-C1* у здоровых доноров костного мозга. D- условное обозначение «донор», примененное для нумерации пробы в исследовании.

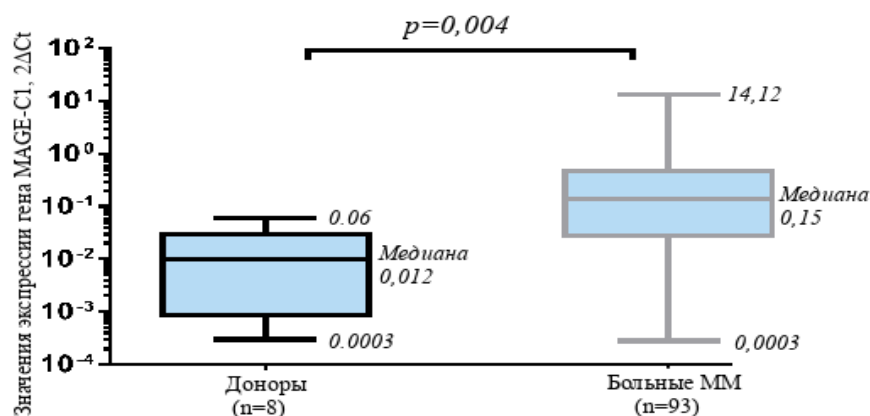
Номер образца костного мозга донора	Значение экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> , $2^{\Delta Ct}$
D1	0,0003
D2	0,0007
D3	0,001
D4	0,01
D5	0,014
D6	0,02
D7	0,04
D8	0,06

Медиана уровня экспрессии гена *MAGE-C1* у 8 здоровых доноров в мононуклеарах костного мозга, обогащенных CD138+ клетками, составила 0,012 ( $2^{\Delta Ct}$ ), при разбросе данных от 0,0003 до 0,06 ( $2^{\Delta Ct}$ ). Среднее значение определено как  $0,01 \pm 0,007$  ( $2^{\Delta Ct}$ ). На основании результатов ПЦР-РВ определили максимально допустимое для здоровых доноров пороговое значение экспрессии исследуемого гена, которое составило 0,06 ( $2^{\Delta Ct}$ ).

Показатели экспрессии гена *MAGE-C1* у 93 больных ММ в дебюте заболевания составляли от 0,0003 до 14,12 ( $2^{\Delta Ct}$ ), медиана - 0,15 ( $2^{\Delta Ct}$ ). Среднее значение экспрессии гена составило  $0,8 \pm 0,2$  ( $2^{\Delta Ct}$ ). Учитывая величину порогового значения исследуемого гена, равную 0,06 ( $2^{\Delta Ct}$ ), больные были разделены на две группы: с нормальными или повышенными значениями экспрессии гена *MAGE-C1*. Так, у 63 (68%) больных были документированы

повышенные значения экспрессии гена *MAGE-C1*, у остальных 30 (32%) уровень экспрессии гена *MAGE-C1* был нормальным.

При сравнении уровней экспрессии гена *MAGE-C1* в мононуклеарах костного мозга, обогащенных CD138+ клетками, у больных ММ и у здоровых доноров, было определено, что уровень экспрессии исследуемого гена у больных был достоверно ( $p=0,004$ ) выше показателей такового у доноров (**рисунок 9**).



**Рисунок 9.** Сравнение значений экспрессии гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга здоровых доноров и больных ММ.

Больные, у которых документировано наличие повышенной экспрессии гена *MAGE-C1* были разделены на две группы. В группу с промежуточным значением экспрессии исследуемого гена отнесено 49 (77,8%) больных, отдельно была выделена немногочисленная группа с высоким уровнем экспрессии гена *MAGE-C1*, которую составили 14 (22,2%) больных ММ. Алгоритм распределения больных на группы и соответствующие им значения экспрессии исследуемого гена представлены в **таблице 7**.

**Таблица 7.** Распределение больных ММ в зависимости от уровня экспрессии гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга.

Уровень экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> у больных ММ	Значения экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> , $2^{-\Delta C_t}$		
	Медиана	Разброс	Среднее
Нормальный (n=30)	0,0009	0,0003-0,05	0,01±0,003
Промежуточный (n=49)	0,23	0,07-0,77	0,28±0,02
Высокий (n=14)	3,36	0,97-14,12	4,32±0,95

Показатели экспрессии гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга каждого больного приведены в **таблице 8**.

**Таблица 8.** Значения экспрессии гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга у больных ММ в дебюте заболевания.

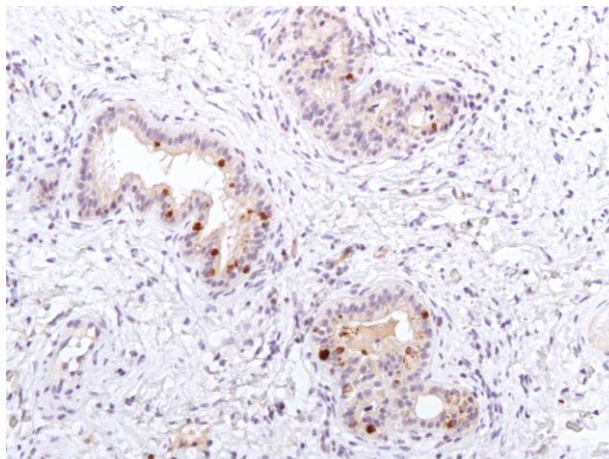
Нормальный уровень n=30		Промежуточный уровень n=49		Высокий уровень n=14	
Номер образца	Значение экспрессии, $2^{\Delta Ct}$	Номер образца	Значение экспрессии, $2^{\Delta Ct}$	Номер образца	Значение экспрессии, $2^{\Delta Ct}$
243	0,0003	267	0,07	212	0,97
262	0,0004	274	0,07	211	1,14
276	0,00063	258	0,07	217	1,65
247	0,0007	232	0,07	221	2,5
249	0,0007	204	0,08	213	2,66
255	0,0008	224	0,08	225	2,69
268	0,001	242	0,09	228	3,36
239	0,002	201	0,09	214	3,36
208	0,002	238	0,1	192	4,05
226	0,003	220	0,1	229	4,08
283	0,003	282	0,11	218	4,45
196	0,004	266	0,11	206	6,14
237	0,005	191	0,11	230	9,44
264	0,006	248	0,11	216	14,12
270	0,008	250	0,14		
259	0,01	272	0,15		
233	0,01	199	0,15		
256	0,02	241	0,16		
284	0,02	277	0,18		
261	0,03	198	0,18		
252	0,03	254	0,2		
246	0,03	202	0,2		
223	0,03	278	0,21		
207	0,03	245	0,23		
193	0,04	260	0,23		
269	0,04	194	0,24		
273	0,04	200	0,25		
280	0,05	279	0,26		
244	0,05	257	0,26		
236	0,05	195	0,26		
		205	0,26		
		251	0,27		
		240	0,28		
		271	0,32		
		203	0,35		
		197	0,36		
		281	0,38		
		285	0,41		
		215	0,44		
		219	0,48		
		286	0,5		

Продолжение таблицы 8.

Нормальный уровень n=30		Промежуточный уровень n=49		Высокий уровень n=14	
Номер образца	Значение экспрессии, $2^{\Delta Ct}$	Номер образца	Значение экспрессии, $2^{\Delta Ct}$	Номер образца	Значение экспрессии, $2^{\Delta Ct}$
		263	0,52		
		235	0,59		
		231	0,59		
		222	0,62		
		210	0,64		
		253	0,69		
		275	0,75		
		265	0,77		

#### Глава 4. Исследование экспрессии белка MAGE-C1 иммуногистохимическим методом

Располагая литературными данными о том, что высокая экспрессия белка MAGE-C1 в норме детектируется в клетках яичек, в качестве контрольного образца для отработки методики был использован гистологический материал ткани яичка. На **рисунке 10** представлено окрашивание антителом к MAGE-C1 клеток сперматогенного эпителия.



***Рисунок 10.** Иммуногистохимическая картина экспрессии белка MAGE-C1 клетками сперматогенного эпителия биоптата яичка (окраска антителом к MAGE-C1, x 200).*

При ИГХ исследовании трепанобиоптатов костного мозга было выявлено, что у двух из семи здоровых доноров определялись единичные плазматические клетки (<1%), экспрессирующие белок MAGE-C1. В трепанобиоптатах пяти других доноров не было выявлено плазматических клеток, экспрессирующих данный белок. При окрашивании антителом к MAGE-C1 максимально допустимое значение числа плазматических клеток в трепанобиоптатах здоровых доноров было определено как менее 1%. Для последующей интерпретации результатов экспрессии белка MAGE-C1 в плазматических клетках в трепанобиоптатах костного мозга больных ММ это значение было принято в качестве порогового.

С целью определения экспрессии белка MAGE-C1 в плазматических клетках трепанобиоптатов костного мозга у 34 больных ММ были выполнены гистологическое и ИГХ исследования.

Гистологическое исследование трепанобиоптатов костного мозга позволило охарактеризовать два морфологических варианта в зависимости от клеточного состава и гистоархитектоники. Первый вариант был представлен интерстициальной инфильтрацией

костного мозга зрелыми плазматическими клетками, рассеянными среди элементов миелопоэза, без формирования скоплений. Такая гистологическая картина была документирована у 5 больных. У остальных 29 больных была выявлена инфильтрация костного мозга зрелыми плазматическими клетками в виде многочисленных мелко- и крупноочаговых скоплений, и у трех из них наблюдалась картина массивной, практически субтотальной инфильтрации.

Оценку экспрессии белка MAGE-C1 в плазматических клетках исследуемых образцов трепанобиоптатов костного мозга больных ММ производили при сопоставлении иммуногистоархитектоники плазматических клеток, окрашенных антителом к MAGE-C1 с гистологическими препаратами трепанобиоптатов этих больных.

Полуколичественный метод, позволил выявить, что число плазматических клеток, экспрессирующих MAGE-C1, существенно различалось в исследуемых образцах трепанобиоптатов. Диапазон процентного содержания ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, варьировал от минимального (<1% клеток) до окрашивания практически всех ПК. Учитывая величину порогового значения ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, равную 1%, больные были разделены на две группы: с нормальными или повышенными показателями экспрессии исследуемого белка. Так, группу с нормальными значениями экспрессии белка MAGE-C1 в ПК, составили 9 (26,5%) больных, остальные 25 (73,5%) больных были отнесены к группе с повышенными показателями экспрессии исследуемого белка.

Больные, у которых документировано наличие повышенной экспрессии белка MAGE-C1, были также разделены на две группы. Это разделение было обусловлено неоднородностью ИГХ картины у этих 25 больных и значительной разницей процентного содержания ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1. Промежуточные показатели экспрессии исследуемого белка были документированы у 11 (44%) больных из 25, высокие показатели – у 14 (56%) больных.

В **таблице 9** представлен алгоритм распределения больных на группы и соответствующие им значения процентного содержания ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1.

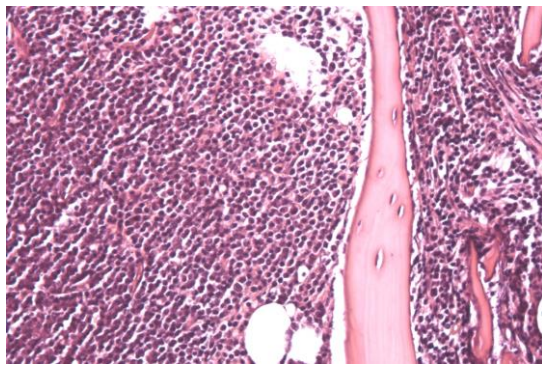
**Таблица 9.** *Распределение больных в зависимости от уровня экспрессии белка MAGE-C1 в плазматических клетках (ИГХ метод).*

Уровень экспрессии белка MAGE-C1 у больных ММ	Распределение больных ММ в группы, n (%)	Доля ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, %
Нормальный	9 (26,5)	< 1
Промежуточный	11 (32,3)	> 1 - < 50
Высокий	14 (41,2)	> 50

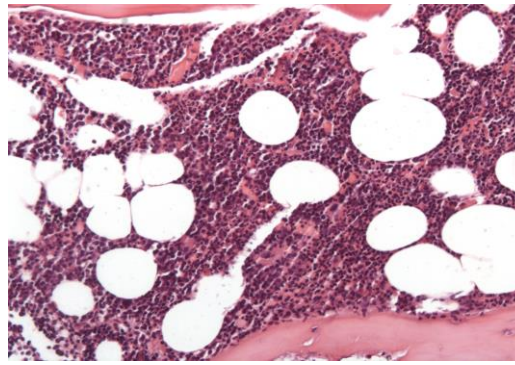
Помимо выраженности экспрессии белка MAGE-C1, у 28 больных удалось определить внутриклеточную локализацию исследуемого белка в плазматических клетках. Так, у 22 (78,5%) больных определялась цитоплазматическая реакция с антителом к MAGE-C1, у 6 (21,5%) больных имела место ядерно-цитоплазматическая реакция.

На **рисунке 11** представлена морфологическая картина гистологических препаратов костного мозга больных ММ в дебюте заболевания, иллюстрирующие диффузную инфильтрацию плазматическими клетками со зрелой морфологией. Кроме того, показаны различные варианты ИГХ картины у этих больных. Отличия обусловлены различной выраженностью экспрессии характеризующейся разным числом плазматических клеток, экспрессирующих белок MAGE-C1, а так же разной локализацией экспрессии. Подробная характеристика гистологических препаратов каждого больного приведена в **приложении 1**.

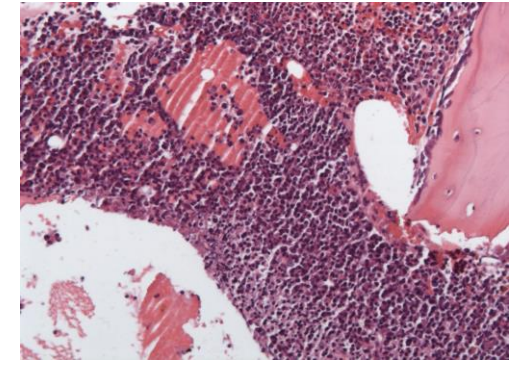




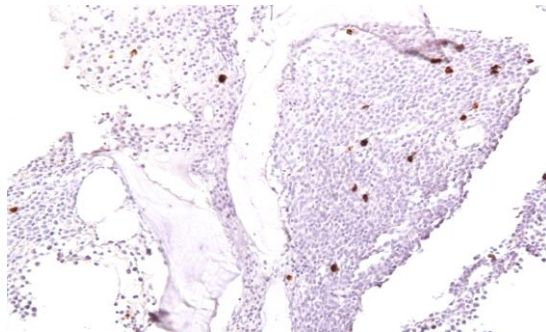
А



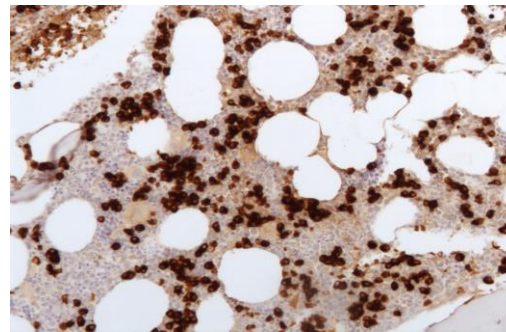
Б



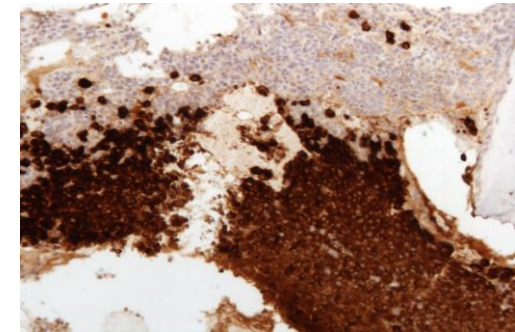
В



Г



Д



Е

**Рисунок 11.** Гистологическая и иммуногистохимическая картины трепанобиоптатов костного мозга больных ММ, увеличение  $\times 200$ :

А, Б, В (окраска гематоксилином и эозином): диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией;

Г, Д, Е (окраска антителом к *mage-c1*): Г — среди диффузного плазмноклеточного инфильтрата единичные клетки экспрессируют *MAGE-C1* (ядерно-цитоплазматическая реакция); Д — менее 50% плазматических клеток экспрессируют *MAGE-C1* (цитоплазматическая реакция); Е — более 50% плазматических клеток экспрессируют *MAGE-C1* (ядерно-цитоплазматическая реакция)

## Глава 5. Сопоставление экспрессии гена *MAGE-C1* методом ПЦР-РВ и белка *MAGE-C1* методом ИГХ в плазматических клетках костного мозга у больных ММ

Для анализа сопоставимости двух методов исследования экспрессии гена *MAGE-C1* (методом ПЦР-РВ) и белка *MAGE-C1* (методом ИГХ) были проанализированы результаты указанных исследований, выполненных у одних и тех же 34 первичных больных ММ.

Сопоставление частоты экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1* у больных ММ в дебюте заболевания показало практически идентичные результаты, которые представлены в **таблице 10**. Так, нормальный уровень экспрессии был выявлен у 23,6% и 26,5%, соответственно, промежуточный — у 47% и 32,4%, высокий - у 29,4% и 41,1%.

**Таблица 10.** Сопоставление частоты экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1* у больных ММ в дебюте заболевания.

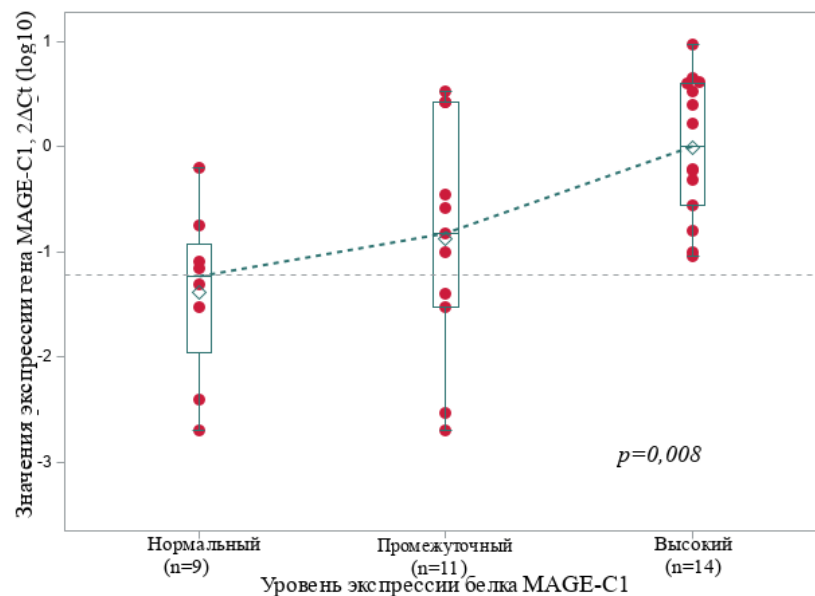
Уровень экспрессии	Частота выявления экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> и белка <i>MAGE-C1</i> у больных ММ в дебюте заболевания, n (%)	
	Ген <i>MAGE-C1</i>	Белок <i>MAGE-C1</i>
Нормальный	8 (23,6%)	9 (26,5%)
Промежуточный	16 (47%)	11 (32,4%)
Высокий	10 (29,4%)	14 (41,1%)

Оценка статистической связи экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1* методом многомерного частотного распределения позволила выявить зависимость: при нормальных показателях экспрессии гена *MAGE-C1*, соответствующих таковым у доноров, не наблюдалось высокой экспрессии белка *MAGE-C1*. При этом, высокая экспрессия исследуемого гена всегда ассоциировалась с экспрессией белка выше нормальных значений. Взвешенный коэффициент согласия Каппа равен 0,33 с доверительным интервалом от 0,1 до 0,56 (стандартная ошибка 0,11),  $p=0,003$ . Особенно существенным является выделение группы больных с высоким уровнем экспрессии белка *MAGE-C1*, поскольку группы с нормальным и промежуточным уровнем экспрессии не показали значимых различий. Результаты представлены в **таблице 11**.

**Таблица 11.** Таблица сопряженности для двух методов исследования (ПЦР-РВ и ИГХ).

Уровень экспрессии белка MAGE-C1 (ИГХ метод)	Уровень экспрессии гена MAGE-C1 (метод ПЦР-РВ)			
	Нормальный	Промежуточный	Высокий	Всего больных
Нормальный	4 (50%)	5 (31,25%)	0 (0%)	9
Промежуточный	4 (50%)	4 (25%)	3 (30%)	11
Высокий	0 (0%)	7 (43,75%)	7 (70%)	14
Всего больных	8	16	10	34

Кроме того, было определено достоверное отличие значений экспрессии гена *MAGE-C1* у больных с различным процентным содержанием ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1 ( $p=0,008$ ). Так, у больных с нормальным уровнем экспрессии белка MAGE-C1 в ПК среднее значение экспрессии гена *MAGE-C1* составило  $0,2 \pm 0,09$  ( $2^{\Delta Ct}$ ), разброс значений от 0,002 до 0,79 ( $2^{\Delta Ct}$ ). У больных с промежуточными показателями экспрессии белка MAGE-C1 среднее значение экспрессии исследуемого гена равнялось  $0,87 \pm 0,39$  ( $2^{\Delta Ct}$ ), разброс значений от 0,002 до 3,36 ( $2^{\Delta Ct}$ ). При высокой экспрессии белка MAGE-C1 средний показатель экспрессии гена составил  $2,27 \pm 0,7$  ( $2^{\Delta Ct}$ ), разброс значений от 0,09 до 9,44 ( $2^{\Delta Ct}$ ). Результаты представлены на рисунке 12.



**Рисунок 12.** Значения экспрессии гена *MAGE-C1* (методом ПЦР-РВ) у больных ММ в дебюте заболевания в зависимости от экспрессии белка *MAGE-C1* (методом ИГХ).

## **Глава 6. Определение экспрессии белка MAGE-C1 плазматическими клетками костного мозга методом проточной цитофлуориметрии**

Определение экспрессии белка MAGE-C1 в плазматических клетках пунктата костного мозга у 29 больных ММ было выполнено методом проточной цитофлуориметрии. В качестве контрольной группы включено 5 здоровых доноров костного.

У 5 здоровых доноров при выполнении проточной цитофлуориметрии не было выявлено плазматических клеток, экспрессирующих белок MAGE-C1. Таким образом, было определено, что любой детектированный процент плазматических клеток, экспрессирующих исследуемый белок, считался патологическим.

Цитологическое исследование пунктата костного мозга 29 больных позволило определить процентное содержание ПК у каждого больного. Разброс значений составил от 0,8% до 72,6%, медиана 25,8%. У 16 (55,2%) больных по данным миелограммы удалось определить менее 30% плазматических клеток, у остальных 13 (44,8%) инфильтрация плазматическими клетками составила  $\geq 30\%$ .

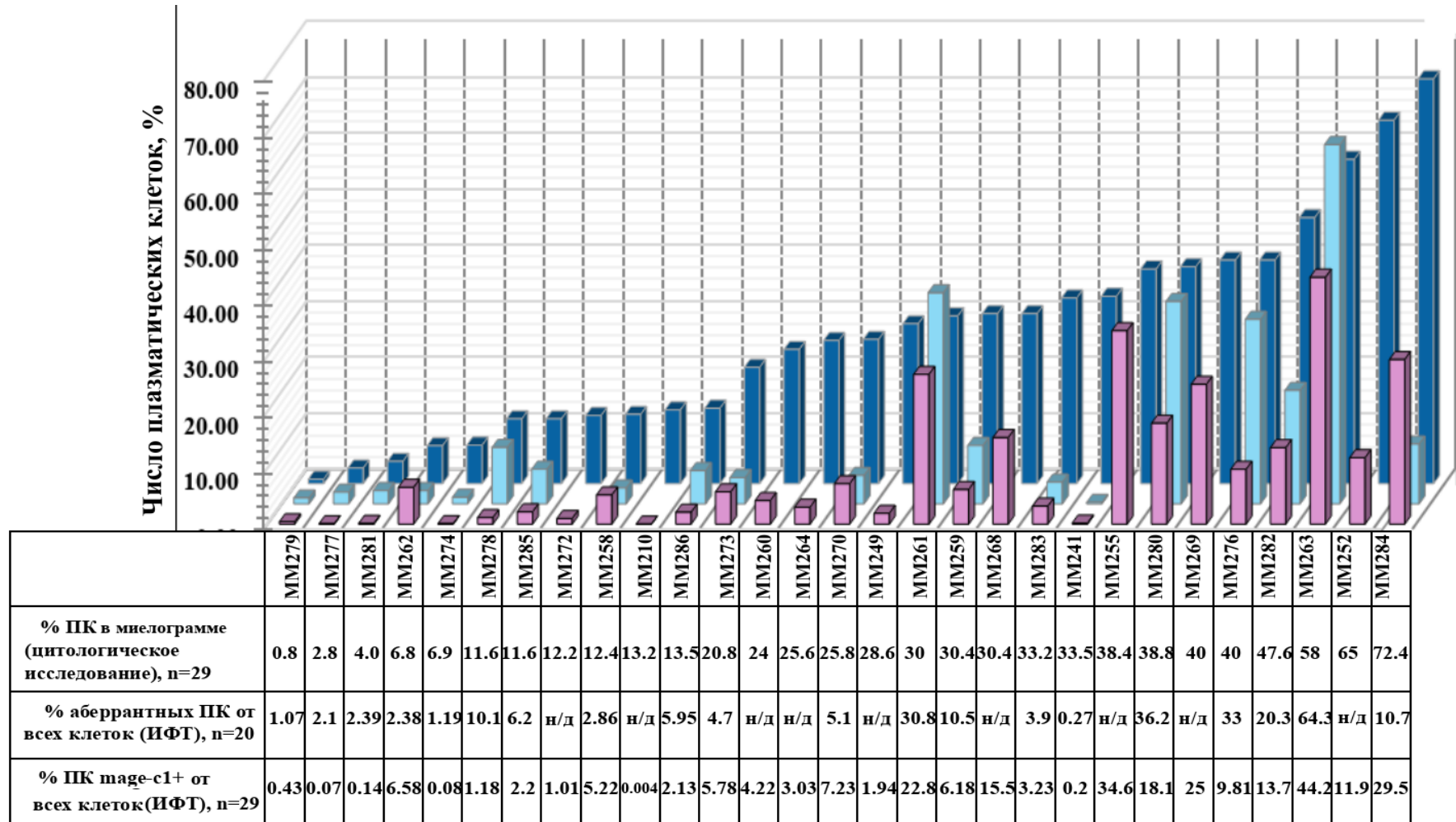
Имунофенотипирование клеток костного мозга выполнено 20 больным. Была определена доля ПК от всех проанализированных клеток, среди них просчитан процент ПК с aberrantным иммунофенотипом. При выполнении иммунофенотипирования клеток костного мозга использовали 6-цветную панель антител (см. главу 2.5.), в ряде случаев анализировали дополнительные специфические маркеры: CD319, CD117, CD20, CD200, CD269, CD81. Неопластический профиль опухолевых плазматических клеток характеризовали различными комбинациями антигенов: CD38 low/dim, CD19-, CD45-, CD27-/low, CD56+/high, CD81-/low, CD117+, CD200+/high.

С целью определения процентного содержания плазматических клеток, экспрессирующих белок MAGE-C1, 29 больным выполнено исследование методом проточной цитофлуориметрии.

Процентное содержание плазматических клеток по результатам цитологического исследования и проточной цитофлуориметрии представлены в **таблице 12**, на **рисунке 13** - их графическое изображение.

*Таблица 12. Содержание плазматических клеток в костном мозге больных ММ.*

Методы исследования содержания плазматических клеток в костном мозге		Процентное содержание плазматических клеток в костном мозге у больных ММ		
		Медиана, %	Разброс значений, %	Среднее значение, %
Цитологический метод	Содержание ПК в миелограмме, n=29	25,8	0,8-72,4	26,84±3,43
Метод мультипараметрической проточной цитофлуориметрии (иммунофенотипирование)	Доля aberrantных ПК от всех просчитанных событий, n=20	5,52	0,27-64,3	12,7±3,68
	Доля ПК, экспрессирующих MAGE-C1, от всех просчитанных событий, n=29	5,22	0,0004-44,2	9,51±2,1



Результаты цитологического и ИФТ методов исследования плазматических клеток костного мозга

Рисунок 13. Сопоставление содержания ПК в костном мозге больных ММ, выявленных цитологическим методом и методом ИФТ

Удалось определить, что у больных с числом плазматических клеток в миелограмме менее 30%, доля плазматических клеток с aberrантным иммунофенотипом и ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, была достоверно ниже таковой у больных с инфильтрацией плазматическими клетками  $\geq 30\%$  ( $p=0,009$  при анализе доли aberrантных ПК и  $p<0,0001$  при анализе доли ПК, экспрессирующих исследуемый белок). Одновременно с этим, процентное содержание aberrантных ПК и ПК, экспрессирующих исследуемый белок, в каждой группе достоверно не отличались. Медиана и разброс значений для каждой группы больных представлены в **таблице 13**.

**Таблица 13.** Процентное содержание числа aberrантных ПК и ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, определенных методом МПЦ в зависимости от числа ПК в миелограмме.

Содержание ПК в миелограмме, %	Процентное содержание aberrантных ПК и ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, определенное методом МПЦ (медиана и разброс значений), %		<i>p</i>
	Доля aberrантных ПК от всех клеток (n=20)	Доля ПК, экспрессирующих MAGE-C1, от всех клеток (n=29)	
<30%	2,86 (1,07-10,1)	2,03 (0,004-7,23)	0,19
$\geq 30\%$	20,3 (0,27-64,3)	15,5 (0,2-44,2)	0,64
<i>p</i>	0,009	<0,0001	-

При исследовании экспрессии белка MAGE-C1 методом мультипараметрической проточной цитофлуориметрии исследовали фракцию CD138+ клеток в связи с тем, что этот иммунофенотипический маркер специфичен для плазматических клеток, однако не позволяет отдифференцировать нормальные ПК от опухолевых. Вследствие этого, мы ориентировались на показатели aberrантных плазматических клеток, полученные при выполнении иммунофенотипирования клеток костного мозга. Процент aberrантных ПК от всех плазматических клеток, выявленных в пробах, соответствовал значениям, превышающим 95%. Таким образом, нам удалось подтвердить специфичность экспрессии MAGE-C1 именно злокачественными плазматическими клетками.

В **таблице 14** представлены результаты исследования ПК цитологическим методом и методом иммунофенотипирования для каждого больного.

**Таблица 14.** Результаты цитологического и ИФТ методов исследования ПК костного мозга больных ММ, про черк «-» - исследование не проводилось.

№	Инициалы, возраст	Номер образца	% ПК в миелограмме	% ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1	% aberrантных ПК от всех клеток	% aberrантных ПК от всех ПК	Иммунофенотип aberrантных ПК
1	Б.А.А., 65	ММ210	13,2	0,004	-	-	-
2	Ц.И.Е., 66	ММ241	33,5	0,2	0,27	98,29	CD138highCD38+CD319+CD45-CD19-CD56highCD27-CD117-CD20-
3	П. М., 54	ММ249	28,6	1,94	-	-	-
4	Я.И.Я., 72	ММ252	65	11,9	-	-	-
5	Ф.Н.М., 63	ММ255	38,4	34,6	-	-	-
6	Ш.А.Г., 58	ММ258	12,4	5,22	2,86	98,83	CD138+CD38+CD319+CD45-CD19-CD56-/+CD27dimCD117+CD20-
7	М.З.А., 73	ММ259	30,4	6,18	10,45	98,51	CD138highCD38dimCD319dimCD45-CD19-CD56highCD27-CD117+CD20-CD200high
8	К.О.И., 60	ММ260	24	4,22	-	-	-
9	С.А.Ю., 68	ММ261	30	22,8	37,76	99,66	CD138+CD38dimCD45-CD19-CD56highCD27±CD117+CD20-/CD200high
10	Т.Н.В., 55	ММ262	6,8	6,58	2,38	97,83	CD138+CD38+CD45±CD19-CD56+CD27-CD117+CD20-CD200+,
11	С.Е.В., 55	ММ263	58	44,2	64,24	99,33	CD138+CD38+CD45-CD19-CD56highCD27-CD117+CD200high
12	Я.А.Н., 60	ММ264	25,6	3,03	-	-	-
13	Н.Т.В., 58	ММ268	30,4	15,5	-	-	-



Продолжение таблицы 14.

№	Инициалы, возраст	Номер образца	% ПК в миелограмме	% ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1	% aberrантных ПК от всех клеток	% aberrантных ПК от всех ПК	Иммунофенотип aberrантных ПК
14	Х.Н.Х., 60	MM269	40	25	-	-	-
15	Г.Е.А., 64	MM270	25,8	7,23	5,1	99,97	CD138+CD38+CD45±CD19-CD56highCD200high
16	Л.Ю.Г., 63	MM272	12,2	1,01	-	-	-
17	К.В.Н., 53	MM273	20,8	5,78	4,7	99,6	CD138+CD38dimCD45-CD19-CD56highCD27±CD117+CD20-/CD200high
18	Г.Ю.Е., 57	MM274	6,9	0,08	1,19	100	CD138+CD38+CD19-CD45-CD56+CD200±CD27+
19	М.М.В., 47	MM276	40	9,81	33 0,48	97,8 1,43	2 популяции ПК: CD138+CD38+CD319+CD19-CD45-CD81+CD27-/CD20-CD269+CD56high  CD138+CD38+CD319+CD19+CD45+CD81+CD27-CD20+CD269+CD56high
20	Г.А.В., 70	MM277	2,8	0,07	2,1	95,76	CD138+CD38dimCD319dimCD19-CD45-CD81dimCD27+CD20+CD269-CD56high
21	М.С.А., 63	MM278	11,6	1,18	10,11	97,3	CD138+CD38dimCD319+CD19-CD45-CD81dimCD27+CD20-CD117+CD56high
22	Л.Д.Н., 51	MM279	0,8	0,43	1,07	98,26	CD138+CD38d+CD319+CD19-CD45-CD81-CD27dimCD20-CD56-
23	С.М.Е., 53	MM280	38,8	18,1	36,2	100	CD138+CD38dimCD319+CD19-CD45-CD27-/CD20-CD269-/CD56high
24	З.В.П., 55	MM281	4,0	0,14	2,39	96,23	CD138+CD38dimCD319+CD19-CD45dimCD27-CD20-CD117-CD56+κ(cyt)+

Продолжение таблицы 14.

№	Инициалы, возраст	Номер образца	% ПК в миелограмме	% ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1	% aberrантных ПК от всех клеток	% aberrантных ПК от всех ПК	Имунофенотип aberrантных ПК
25	Д.Н.П., 70	MM282	47,6	13,7	20,3	99,8	CD138+CD38dimCD19-CD45-CD27-CD20-CD269+CD56+
26	Д.В.И., 58	MM283	33,2	3,23	3,9	99,7	CD138+CD38+CD319+CD19-CD45-CD27+CD20-CD269-CD56high
27	М.Р.З., 47	MM284	72,4	29,5	10,7	99,3	D138+CD38+CD319+CD19±CD45-CD27+CD20-CD269-CD56high
28	А.Н.В., 60	MM285	11,6	2,2	6,2	99,6	CD138+CD38dimCD319dimCD19-CD45±CD27±CD20-CD269+CD56high
29	Т.Л.А., 67	MM286	13,5	2,13	5,95	95	CD138+CD38dimCD319+CD19-CD45-CD27+CD20-CD269-CD56-/+

## Глава 7. Взаимосвязь клинико-лабораторных параметров больных ММ с экспрессией гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1*

### 7.1. Взаимозависимость клинико-лабораторных характеристик больных ММ с нормальной и повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*

Среди 93 больных, у которых в плазматических клетках костного мозга была определена экспрессия гена *MAGE-C1*, было 40 (43%) мужчин и 53 (57%) женщины в возрасте от 35 до 82 лет (медиана 58 лет).

I - II стадия заболевания по классификации Durie-Salmon была определена у 20 (21,5%) больных, III стадия документирована у 73 (78,5%) больных. Миеломная каст-нефропатия (подстадия В) документирована у 21 (22,6%) больного.

Стадия по ISS у 28 (30%) больных была оценена как I, у 23 (24,8%) как II и у 38 (40,9%) - как III, у 4 (4,3%) больных сведения отсутствовали.

В дебюте заболевания 90 больным выполнено FISH-исследование, по результатам которого у 28 (30%) больных были выявлены цитогенетические аномалии высокого риска, такие как  $t(4;14)(p16;q32)$ ,  $del17p$ ,  $t(14;16)(q32;q23)$ ,  $amp1q21$  (две и более дополнительные копии). Высокая активность ЛДГ ( $>280$  Ед/л) была зарегистрирована у 37 (39,8%) больных. Согласно критериям пересмотренной международной системы стадирования (R-ISS, 2015) 18 (19,3%) больных были отнесены к I стадии, 52 (55,9%) - к II, 15 (16,2%) больных - к III стадии, у 8 (8,6%) больных определить стадию не удалось.

Костные плазмоцитомы были выявлены у 46 (49,5%) больных. У 25 больных из них плазмоцитомы локализовались в телах шейных, грудных и поясничных позвонков, размеры образований варьировали от 12x10x12 мм до 63x45x38 мм. У 20 больных плазмоцитомы были выявлены в костях таза, наиболее часто в подвздошных костях и крестце, размеры их варьировали от 11x7x10 мм до 93x75x87 мм. В костях черепа определялись мягкотканые образования, разрушающие костные структуры и выходящие за их пределы, у 13 больных, размеры составляли от 11x6x13 мм до 61x33x50мм. Еще у 13 больных костные плазмоцитомы обнаружены в ребрах, размерами от 18x10x12 мм до 54x28x44 мм. У 9 больных отмечалось поражение костей плечевого пояса и верхних конечностей размерами от 9x8x15 мм до 40x24x45 мм, у 4 больных – костей нижних конечностей размерами от 33x14x20 мм до 110x27x28 мм. Еще у 6 больных плазмоцитома была локализована в груди, размеры составили от 17x8x20 до 39x28x52 мм. При этом, один очаг мягкотканой плотности, разрушающий костную структуру,

был документирован у 19 (41,3%) больных, у остальных 27 (58,7%) обнаруживали два и более мягкотканного образования различных локализаций.

С целью определения взаимозависимости наиболее важных клинико-лабораторных характеристик ММ с параметрами экспрессии гена *MAGE-C1* больные были разделены на две группы: с нормальной и повышенной экспрессией этого гена. В **таблице 15** представлены результаты попарного частотного анализа.

**Таблица 15.** Сопоставление клинико-лабораторных параметров больных ММ с нормальной и повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от экспрессии гена <i>MAGE-C1</i>			
	Нормальная экспрессия гена <i>MAGE-C1</i> ( $n=30$ ), $n$ (%)	Повышенная экспрессия гена <i>MAGE-C1</i> ( $n=63$ ), $n$ (%)	$p$	ОШ [95% ДИ]
Пол: мужской женский	8 (26,6) 22 (73,4)	32 (50,9) 31 (49,1)	0,02	0,3 (0,11-0,79)
Медиана возраста, лет (диапазон) $\leq 65$ лет $> 65$ лет	57 (40-73) 26 4	59 (35-82) 48 15	0,29 0,25	2,01 (0,59-6,82)
Стадия по Durie-Salmon: I-II III	7 (23,3) 23 (76,7)	13 (20,6) 50 (79,4)	0,71	1,21 (0,41-3,56)
Стадия по ISS: I II III нет данных	8 (26,6) 8 (26,6) 13 (43,5) 1 (3,3)	20 (31,8) 15 (23,8) 25 (39,6) 3 (4,8)	0,86	
Стадия по R-ISS: I II III нет данных	5 (16,6) 20 (66,7) 2 (6,7) 3 (10)	13 (20,6) 34 (54) 11 (17,5) 5 (7,9)	0,16	
Костные плазмцитомы: отсутствие наличие	20 (66,7) 10 (33,3)	27 (42,8) 36 (57,2)	0,02	2,78 (1,09-7,04)

Продолжение таблицы 15.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от экспрессии гена <i>MAGE-C1</i>			
	Нормальная экспрессия гена <i>MAGE-C1</i> ( <i>n</i> =30), <i>n</i> (%)	Повышенная экспрессия гена <i>MAGE-C1</i> ( <i>n</i> =63), <i>n</i> (%)	<i>p</i>	ОИШ [95% ДИ]
Количество костных плазмоцитом: одна две и более	6 (60) 4 (40)	13 (36,1) 23 (63,9)	0,14	2,86 (0,66-12,33)
Размеры костных плазмоцитом: менее 50 мм более 50 мм	9 (90) 1 (10)	15 (41,7) 21 (58,3)	0,006	13,15 (1,48-116,72)
Высокий цитогенетический риск: отсутствие наличие	23 (79,3) 6 (20,4)	38 (63,3) 22 (36,7)	0,08	2,4 (0,86-7,03)
Double-hit (две цитогенетические аномалии высокого риска) отсутствие наличие	25 (86,2) 4 (13,8)	47 (78,3) 13 (21,7)	0,44	1,62 (0,46-5,63)
Лактатдегидрогеназа: 80-280 Ед/л 285-584 Ед/л	23 (76,7) 7 (23,3)	33 (52,4) 30 (47,6)	0,01	3,4 (1,25-9,24)
Сывороточный кальций: 1,22-2,65 ммоль/л 2,68-3,95 ммоль/л	21 (70) 9 (30)	48 (76,2) 15 (23,8)	0,52	
$\beta$ 2-микроглобулин: 1,61-5,5 мг/л 5,6-19,0 мг/л	15 (51,7) 14 (48,3)	35 (58,3) 25 (41,7)	0,38	0,65 (0,25-1,68)
Гемоглобин: 120- 151 г/л 55-119 г/л	3 (10) 27 (90)	25 (39,6) 38 (60,4)	0,003	0,16 (0,04-0,61)
Сывороточный креатинин: 45,4-177 мкмоль/л 211-1535 мкмоль/л	23 (76,7) 7 (23,3)	49 (77,8) 14 (22,2)	0,9	
Соотношение СЛЦ: 0,25-25 25-29296	12 (52,2) 11 (47,8)	17 (48,5) 18 (51,5)	0,78	1,16 (0,39-3,42)

Продолжение таблицы 15.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от экспрессии гена <i>MAGE-C1</i>			
	Нормальная экспрессия гена <i>MAGE-C1</i> ( <i>n</i> =30), <i>n</i> (%)	Повышенная экспрессия гена <i>MAGE-C1</i> ( <i>n</i> =63), <i>n</i> (%)	<i>p</i>	ОШ [95% ДИ]
Плазматические клетки в костном мозге: 0,8-30 % 30,4-89 %	13 (43,4) 17 (56,6)	43 (68,2) 20 (31,8)	0,05	0,4 (0,16-1,0)
Парапротеин сыворотки: следы-30 г/л 31,2-85 г/л	13 (43,4) 17 (56,6)	32 (50,9) 31 (49,1)	0,4	0,68 (0,28-1,67)

Как видно из таблицы 15, некоторые параметры, документированные в дебюте ММ, достоверно отличались в группах больных с нормальной и повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*. Так, были определены отличия по полу, наличию костных плазмочитом и их размерам, активности лактатдегидрогеназы, содержанию гемоглобина, доле плазматических клеток в костном мозге.

Нормальную экспрессию гена *MAGE-C1* определяли у мужчин в три раза реже чем у женщин: 26,6% против 73,4% (ОШ=0,3 (0,11-0,79);  $p=0,02$ ), при этом повышенная экспрессия исследуемого гена одинаково часто регистрировалась у представителей обоих полов (50,9% и 49,1%, соответственно).

Было определено, что у больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1* значительно чаще костные плазмочитомы отсутствовали: 66,7% против 33,3% больных, которых было документировано наличие костных плазмочитом, при этом у больных с повышенной экспрессией исследуемого гена костные плазмочитомы были выявлены в 57,2% случаев, ОШ=2,78 (1,09-7,04);  $p=0,02$ . Также была выявлена взаимосвязь с размером мягкотканного образования. Так, у 90% больных с костными плазмочитомами и нормальной экспрессией гена *MAGE-C1* размеры образования были не более 50 мм во всех измерениях, и лишь у 10% превышали 50 мм хотя бы в одном измерении, тогда как у больных с повышенной экспрессией гена *MAGE-C1* такие размеры плазмочитомы регистрировали в 58,3% случаев, ОШ=13,15 (1,48-116,72);  $p=0,006$ . В то же время количество плазмочитом у больных не зависело от значений

экспрессии исследуемого гена.

Кроме того, отмечено, что нормальная экспрессия исследуемого гена значимо чаще ассоциировалась с более низкой активностью ЛДГ: 76,7% против 23,3% больных с высокими показателями ЛДГ, ОШ=1,62 (0,46-5,63);  $p=0,01$ . Тогда как распределение больных с повышенными показателями экспрессии исследуемого гена относительно активности ЛДГ было примерно одинаковым 52,4% и 47,6%, соответственно.

Одновременно с этим, нормальное содержание гемоглобина документировали преимущественно у больных с повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*: 39,6% против 10% больных с нормальной экспрессией исследуемого гена, ОШ=0,16 (0,04-0,61);  $p=0,003$ . Анемию разной степени тяжести регистрировали несколько чаще у больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1*: 90% против 60,4% больных с повышенной экспрессией исследуемого гена.

Обратная корреляция экспрессии исследуемого гена была детектирована и при анализе числа плазматических клеток в костном мозге у больных ММ в дебюте заболевания. У больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1*, как правило, процентное содержание плазматических клеток в костном мозге превышало 30%: 56,6% против 43,4% больных с числом ПК  $\leq 30\%$ , в то время как у больных с повышенной экспрессией вдвое чаще отмечалось низкое содержание ПК в миелограмме ( $\leq 30\%$ ): 68,2% против 32,8% больных с числом ПК  $> 30\%$ , ОШ=0,4 (0,16-1,0);  $p=0,05$ .

Достоверной взаимосвязи комплекса цитогенетических аномалий высокого риска и уровня экспрессии гена *MAGE-C1* выявить не удалось ( $p=0,08$ ). Однако, при дополнительном анализе взаимосвязи отдельных цитогенетических хромосомных нарушений, выявленных методом FISH у больных ММ в дебюте заболевания, удалось определить, что обнаружение del17p ассоциировалось с выявлением повышенной экспрессии гена *MAGE-C1*. Так, из 11 больных с del17p, нормальная экспрессия гена *MAGE-C1* обнаружена лишь у 1 (9%) больного против 10 (91%) больных с повышенной экспрессией исследуемого гена, ОШ=6,4 (0,78-53,04);  $p=0,05$ .

Достоверной корреляции с возрастом, стадиями заболевания согласно системам стадирования по Durie-Salmon, ISS, R-ISS, наличием других цитогенетических аномалий и остальных лабораторных характеристик больных с нормальными и повышенными значениями экспрессии гена *MAGE-C1* выявлено не было.

После распределения больных на три группы, исходя из показателей уровня экспрессии гена *MAGE-C1*, была подтверждена достоверная взаимосвязь с активностью ЛДГ, размерами костных плазмочитом, содержанием гемоглобина и содержанием плазматических клеток в

костном мозге. Результаты представлены в **таблице 16**.

**Таблица 16.** Сопоставление клинико-лабораторных параметров больных ММ с разным уровнем экспрессии гена *MAGE-C1*.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии гена <i>MAGE-C1</i>			
	Нормальный уровень ( <i>n</i> =30), <i>n</i> (%)	Промежуточный уровень ( <i>n</i> =50), <i>n</i> (%)	Высокий уровень ( <i>n</i> =13), <i>n</i> (%)	<i>p</i>
Пол: мужской женский	8 (26,6) 22 (73,4)	26 (52) 24 (48)	6 (46,2) 7 (53,8)	0,08
Медиана возраста, лет (диапазон) ≤ 65 лет > 65 лет	57 (40-73) 26 (86,7) 4 (13,3)	59 (35-82) 38 (76) 12 (24)	63 (42-68) 10 (76,9) 3 (23,1)	0,5
Стадия по Durie-Salmon: I-II III	7 (23,3) 23 (76,7)	11 (22) 39 (78)	2 (15,4) 11 (84,6)	0,83
Стадия по ISS: I II III	8 (27,5) 8 (27,5) 13 (44,8)	16 (34) 13 (27,7) 18 (38,3)	4 (30,8) 2 (15,4) 7 (53,8)	0,84
Стадия по R-ISS: I II III	5 (18,5) 20 (74,1) 2 (7,4)	10 (22,2) 27 (60) 8 (17,8)	3 (23,1) 7 (53,8) 3 (23,1)	0,64
Костные плазмоцитомы: отсутствие наличие	20 (66,7) 10 (33,3)	20 (40) 30 (60)	7 (53,8) 6 (46,1)	0,06
Костные плазмоцитомы: одна две и более	6 (60) 4 (40)	11 (36,7) 19 (63,3)	2 (33,3) 4 (66,7)	0,39
Костные плазмоцитомы (размеры): менее 50 мм более 50 мм	9 (90) 1 (10)	14 (46,7) 16 (53,3)	1 (16,7) 5 (83,3)	0,01
Высокий цитогенетический риск: отсутствие наличие	23 (79,3) 6 (20,7)	30 (63,8) 17 (36,2)	8 (61,5) 5 (38,5)	0,31
Лактатдегидрогеназа: 80-280 Ед/л 285-584 Ед/л	23 (76,7) 7 (23,3)	31 (62) 19 (38)	2 (15,4) 11 (84,6)	0,0008



Продолжение таблицы 16.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии гена <i>MAGE-C1</i>			
	Нормальный уровень ( <i>n</i> =30), <i>n</i> (%)	Промежуточный уровень ( <i>n</i> =50), <i>n</i> (%)	Высокий уровень ( <i>n</i> =13), <i>n</i> (%)	<i>p</i>
Double-hit (две цитогенетические аномалии высокого риска) отсутствие наличие	25 (86,2) 4 (13,8)	38 (80,9) 9 (19,1)	9 (69,2) 4 (30,8)	0,43
Сывороточный кальций: 1,22-2,65 ммоль/л 2,68-3,95 ммоль/л	21 (70) 9 (30)	37 (74) 13 (26)	11 (84,6) 2 (15,4)	0,6
β2-микроглобулин: 1,61-5,5 мг/л 5,6-19,0 мг/л	15 (51,7) 14 (48,3)	28 (59,6) 19 (40,4)	7 (53,8) 6 (46,1)	0,78
Гемоглобин: 120- 151 г/л 55-119 г/л	3 (10) 27 (90)	21 (42) 29 (58)	4 (30,8) 9 (69,2)	0,01
Сывороточный креатинин: 45,4-177 мкмоль/л 211-1535 мкмоль/л	23 (76,7) 7 (23,3)	41 (82) 9 (18)	8 (61,5) 5 (38,5)	0,28
Соотношение СЛЦ: 0,25-25 25-29296	12 (52,2) 11 (47,8)	13 (46,4) 15 (53,6)	4 (57,1) 3 (42,9)	0,38
Плазматические клетки в костном мозге: 0,8-30 % 30,4-89 %	13 (43,4) 17 (56,6)	34 (68) 16 (32)	9 (69,2) 4 (30,8)	0,02
Сывороточный парапротеин: следы-30 г/л 31,2-85 г/л	13 (43,4) 17 (56,6)	23 (46) 27 (54)	9 (69,2) 4 (30,8)	0,26

Так, в группе с высоким уровнем экспрессией гена *MAGE-C1* значимо чаще определяли высокую активность ЛДГ. Если в группах с нормальным и промежуточным уровнями экспрессии исследуемого гена высокая активность ЛДГ определялась в 23,3% и 38% случаев, то в группе с высокой экспрессией - уже у 84,6% больных,  $p=0,0008$ .

Костные плазмоцитомы, размерами более 50 мм значимо чаще регистрировались у больных с промежуточной и высокой экспрессией гена *MAGE-C1*: 53,3% и 83,3% против 10% в группе больных с нормальной экспрессией,  $p=0,01$ . При этом основная часть больных с

костными плазмацитомами, из группы с повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*, были отнесены к числу больных с промежуточным уровнем экспрессии исследуемого гена, вероятно, в связи с ее многочисленностью. В этой группе плазмацитомы выявлялись в два раза чаще чем у больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1*: 60% против 33,3%,  $p=0,02$ . Группа больных с высоким уровнем экспрессии значимой разницы по сравнению с другими группами не показала.

Сохранялась обратная зависимость наличия анемии в группах с разным уровнем экспрессии гена *MAGE-C1*. У больных с нормальными значениями экспрессии гена *MAGE-C1* показатели гемоглобина ниже нормы документированы в 90% случаев, тогда как в группах больных с промежуточным и высоким уровнем экспрессии - в 58% и 69,2%, соответственно,  $p=0,01$ .

Число плазматических клеток в костном мозге более 30% по данным миелограммы регистрировали практически в два раза чаще у больных с нормальной экспрессией исследуемого гена по сравнению с больными с промежуточной и высокой экспрессией: 56,6% против 32% и 30,8%,  $p=0,02$ .

Достоверной корреляции с остальными клинико-лабораторными параметрами при разделении больных на три группы в зависимости от экспрессии гена *MAGE-C1* выявлено не было.

## **7.2. Показатели экспрессии гена *MAGE-C1* в зависимости от клинико-лабораторных характеристик больных ММ**

Отдельно был произведен поиск взаимосвязи количественных значений экспрессии гена *MAGE-C1* с некоторыми клинико-лабораторными параметрами больных ММ в дебюте заболевания. Из всех проанализированных клинико-лабораторных характеристик, удалось определить взаимосвязь показателей экспрессии гена *MAGE-C1* со стадией по R-ISS, активностью ЛДГ и содержанием гемоглобина.

Было выявлено, что значения экспрессии гена *MAGE-C1* были достоверно ниже у больных с I-II стадией по R-ISS по сравнению с больными, у которых была документирована III стадия. Так, у 72 больных с I-II стадией по R-ISS средние значения экспрессии исследуемого гена составили  $0,69 \pm 0,18$  ( $2^{\Delta Ct}$ ), медиана 0,11 ( $2^{\Delta Ct}$ ). У 13 больных с III стадией по R-ISS среднее значение экспрессии гена *MAGE-C1* определено как  $1,77 \pm 1,06$  ( $2^{\Delta Ct}$ ), медиана 0,15 ( $2^{\Delta Ct}$ ),  $p=0,04$ . Значения экспрессии гена *MAGE-C1* у больных ММ с I-II и III стадиями по R-ISS приведены в

таблице 17, графическое изображение представлено на рисунке 23.

Таблица 17. Значения экспрессии гена *MAGE-C1* в зависимости от стадии ММ по R-ISS.

Стадия ММ по R-ISS	Значения экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> , $2^{\Delta Ct}$		<i>p</i>
	Медиана (разброс значений)	Средние значения	
I-II стадия, n=72	0,15 (0,0004-4,45)	0,69±0,18	0,04
III стадия, n=13	0,27 (0,004-14,12)	1,77±1,06	

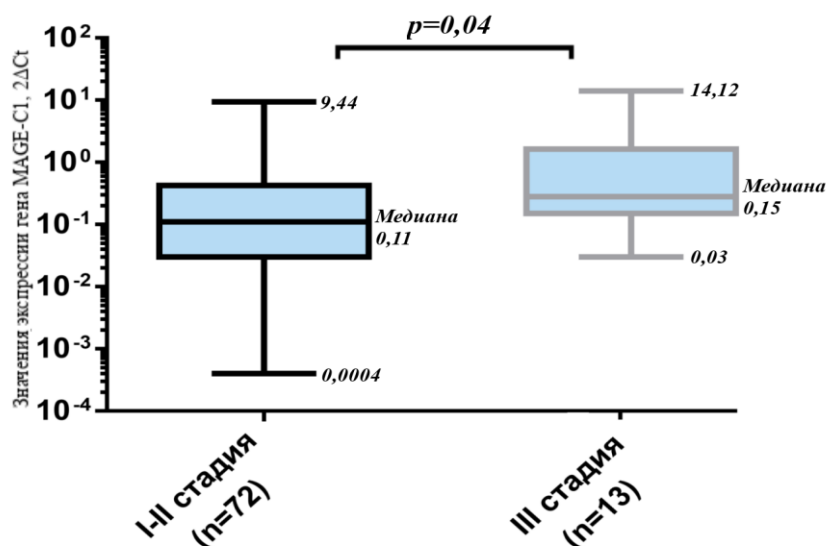
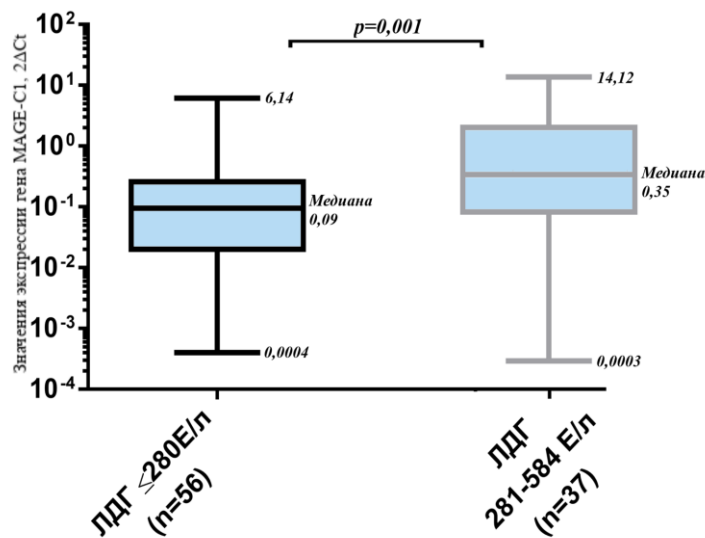


Рисунок 14. Взаимосвязь показателей экспрессии гена *MAGE-C1* со стадией ММ по R-ISS.

У 56 больных с показателями ЛДГ в пределах нормы (80-280 Ед/л), значения экспрессии исследуемого гена были достоверно ниже по сравнению с таковыми у больных с высокой активностью ЛДГ. Медиана экспрессии гена *MAGE-C1* у 56 больных с нормальными показателями ЛДГ составила 0,09 ( $2^{\Delta Ct}$ ), среднее значение равнялось  $0,31 \pm 0,11$  ( $2^{\Delta Ct}$ ), у 37 больных с высокой активностью ЛДГ средние значения экспрессии исследуемого гена составили  $1,5 \pm 0,47$  ( $2^{\Delta Ct}$ ), медиана 0,35 ( $2^{\Delta Ct}$ ),  $p=0,001$ . Значения экспрессии гена *MAGE-C1* у больных ММ с нормальной и высокой активностью ЛДГ приведены в таблице 18, на рисунке 15 их графическое изображение.

**Таблица 18.** Значения экспрессии гена *MAGE-C1* в зависимости от показателей активности ЛДГ.

Показатели активности ЛДГ	Значения экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> , $2^{\Delta Ct}$		<i>p</i>
	Медиана (разброс значений)	Средние значения	
Норма (80-280 Ед/л), n=56	0,09 (0,0004-6,14)	0,31±0,11	0,001
Повышенные (285-584 Ед/л), n=37	0,35 (0,0003-14,12)	1,5±0,47	



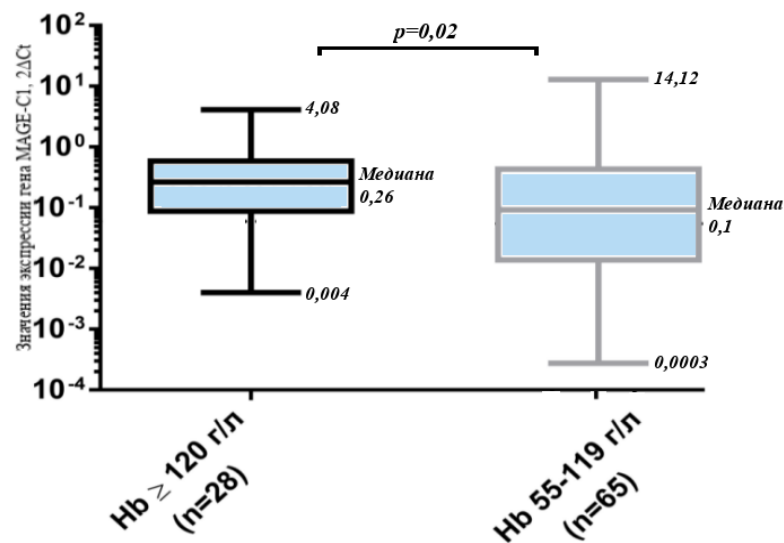
**Рисунок 15.** Взаимосвязь показателей экспрессии гена *MAGE-C1* со значениями ЛДГ.

В то же время, нормальному содержанию гемоглобина (120-151 г/л), документированному у 28 больных, соответствовали более низкие показатели экспрессии гена *MAGE-C1*. В этом случае медиана экспрессии исследуемого гена составила 0,26 ( $2^{\Delta Ct}$ ). Анемия разной степени тяжести (содержание гемоглобина 55-119 г/л) была выявлена у 65 больных, медиана экспрессии гена составила 0,1 ( $2^{\Delta Ct}$ ). При проведении однофакторного анализа была подтверждена достоверность этих различий,  $p=0,02$ . Средние значения экспрессии гена *MAGE-*

CI в этих двух группах практически не отличались ( $0,67 \pm 0,21$  против  $0,85 \pm 0,28$  ( $2^{\Delta Ct}$ ). Значения экспрессии гена *MAGE-C1* у больных ММ с нормальным содержанием гемоглобина и анемией разной степени тяжести приведены в **таблице 19**, на **рисунке 16** их графическое изображение.

**Таблица 19.** Значения экспрессии гена *MAGE-C1* в зависимости от содержания гемоглобина.

Содержание гемоглобина по данным гемограммы	Значения экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> , $2^{\Delta Ct}$		<i>p</i>
	Медиана (разброс значений)	Средние значения	
Норма ( $\geq 120$ г/л), n=28	0,26 (0,004-4,08)	$0,67 \pm 0,21$	0,02
Пониженное (55-119 г/л), n=65	0,1 (0,0003-14,12)	$0,85 \pm 0,28$	



**Рисунок 16.** Взаимосвязь показателей экспрессии гена *MAGE-C1* с содержанием гемоглобина.

Для других клинико-лабораторных параметров не удалось определить значимой взаимосвязи с уровнем экспрессии гена *MAGE-C1*.

### **7.3. Сопоставление клинико-лабораторных характеристик больных ММ в зависимости от нормальной и повышенной экспрессии белка MAGE-C1, выявленной иммуногистохимическим методом**

Среди 34 больных, которым были определены показатели экспрессии белка MAGE-C1 в плазматических клетках методом ИГХ, было 18 (52%) мужчин и 16 (47%) женщин. Медиана возраста составила 58 лет, разброс показателей от 35 до 82 лет.

Стадия заболевания по классификации Durie-Salmon документирована как I-II у 8 (23,5%) больных, как III- у 26 (76,5%). Миеломная каст-нефропатия (подстадия В) зарегистрирована у 10 (29,4%) больных.

По классификации ISS у 12 (35,3%) больных была определена I стадия, у 10 (29,4%) - II и у 12 (35,3%) - III.

Цитогенетические аномалии высокого риска выявлены у 10 (29,4%) больных. Высокая активность ЛДГ (>280 Ед/л) зарегистрирована у 23 (67,5%). Согласно критериям системы стадирования R-ISS наблюдалось следующее распределение: I стадия документирована у 8 (23,5%) больных, II стадия — у 21 (61,8%) и III стадия у 5 (14,7%) больных.

Костные плазмцитомы были обнаружены у 16 (47%) больных. Из них, у 6 (37,5%) больных был документирован один очаг мягкотканной плотности, разрушающий костную структуру, у остальных 10 (62,5%) - обнаруживали два и более мягкотканного образования различных локализаций. У 9 (56,3%) больных размеры плазмцитомы превышали 50 мм хотя бы в одном измерении, у 7 (43,7%) больных размеры образования были менее 50 мм.

Для выявления взаимозависимости клинико-лабораторных характеристик ММ с параметрами экспрессии белка MAGE-C1 больные были разделены на две группы: с нормальной и повышенной экспрессией исследуемого белка. В **таблице 20** представлены результаты однофакторного анализа.

**Таблица 20.** Сопоставление клинико-лабораторных параметров больных ММ с нормальной и повышенной экспрессией белка MAGE-C1.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от экспрессии белка MAGE-C1			
	Нормальная экспрессия белка MAGE-C1 ( $n=9$ ), $n$ (%)	Повышенная экспрессия белка MAGE-C1 ( $n=25$ ), $n$ (%)	$p$	ОШ [95% ДИ]
Пол: мужской женский	5 (55,6) 4 (44,4)	13 (52) 12 (48)	0,85	1,15 (0,24-5,33)
Медиана возраста, лет (диапазон) $\leq 65$ лет $> 65$ лет	57 (46-65) 9 (100) -	58 (35-68) 20 (80) 5 (20)	0,76 0,14	
Стадия по Durie-Salmon: I-II III	2 (22,2) 7 (77,8)	6 (24) 19 (76)	0,91	0,9 (0,14-5,58)
Стадия по ISS: I-II III	7 (77,8) 2 (22,2)	15 (60) 10 (40)	0,33	2,33 (0,4-13,6)
Стадия по R-ISS: I-II III	8 (88,9) 1 (11,1)	21 (84) 4 (16)	0,72	1,52 (0,14-15,7)
Наличие костных плазмоцитом: отсутствие наличие	2 (22,2) 7 (77,8)	16(64) 9 (36)	0,03	0,16 (0,02-0,94)
Количество костных плазмоцитом: одна две и более	3 (42,8) 4 (57,2)	3 (33,3) 6 (66,7)	0,69	1,5 (0,19-11,5)
Размеры костных плазмоцитом: менее 50 мм более 50 мм	5 (71,4) 2 (28,6)	2 (22,2) 7 (77,8)	0,04	8,75 (0,9-84,74)
Высокий цитогенетический риск отсутствие наличие	5 (55,6) 4 (44,4)	18 (72) 7 (28)	0,36	0,48 (0,1-2,35)
Double-hit (две цитогенетические аномалии высокого риска) отсутствие наличие	7 (77,8) 2 (22,2)	21 (84) 4 (16)	0,67	0,87 (0,13-5,57)

Продолжение таблицы 20.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от экспрессии белка MAGE-C1			
	Нормальная экспрессия белка MAGE-C1 ( $n=9$ ), $n$ (%)	Повышенная экспрессия белка MAGE-C1 ( $n=25$ ), $n$ (%)	$p$	ОШ [95% ДИ]
Лактатдегидрогеназа: 163-280 Ед/л 285-584 Ед/л	3 (33,3) 6 (66,7)	8 (32) 17 (68)	0,94	1,06 (0,21-5,37)
Сывороточный кальций: 2,06-2,65 ммоль/л 2,69-3,27 ммоль/л	7 (77,8) 2 (22,2)	20 (80) 5 (20)	0,88	0,87 (0,13-5,57)
$\beta$ 2-микроглобулин: 1,61-5,5 мг/л 5,86-19,0 мг/л	7 (77,8) 2 (22,2)	15 (60) 10 (40)	0,33	2,35 (0,4-13,6)
Гемоглобин: 120-151 г/л 65-118 г/л	6 (66,7) 3 (33,3)	9 (36) 16 (64)	0,11	3,0 (0,6-14,86)
Сывороточный креатинин: 46,6-105 мкмоль/л 255,6-1535 мкмоль/л	7 (77,8) 2 (22,2)	17 (68) 8 (32)	0,58	1,64 (0,27-9,78)
Соотношение СЛЦ: 0,25-22,3 34,4-1511,2	1 (16,7) 5 (83,3)	6 (46,2) 7 (53,8)	0,21	0,23 (0,02-2,59)
Плазматические клетки в костном мозге: 4,4-28 % 30,8-89 %	7 (77,8) 2 (22,2)	14 (56) 11 (44)	0,24	2,74 (0,47-15,96)
Сывороточный парапротеин: следы-27,2 г/л 30,2-54 г/л	5 (55,6) 4 (44,4)	14 (56) 11 (44)	0,98	0,98 (0,21-4,55)

Были документированы достоверные отличия некоторых клинико-лабораторных характеристик у больных с нормальной и повышенной экспрессией белка MAGE-C1. В их число вошли наличие костных плазмцитом и их размеры.

У больных с нормальной экспрессией белка MAGE-C1 костные плазмцитомы значимо чаще регистрировались чем их отсутствие: 77,8% против 22,2%, ОШ=0,16 (0,02-0,94),  $p=0,03$  у больных с повышенной экспрессией исследуемого белка плазмцитомы обнаружены в 36% случаев. Вероятно, такое отличие полученных результатов обусловлено малой выборкой



больных и их неравномерным распределением в группах. При этом, в группе больных с нормальной экспрессией белка MAGE-C1 только у 28,6% были документированы костные плазмоцитомы размерами более 50 мм, у больных же с повышенной экспрессией белка MAGE-C1 такие размеры плазмоцитом регистрировались в 77,8% случаев, ОШ=8,75 (0,9-84,74),  $p=0,04$ .

Достоверной взаимосвязи с другими клинико-лабораторными параметрами у больных с нормальной или повышенной экспрессией белка MAGE-C1 выявлено не было.

После распределения больных на три группы в соответствии с уровнем экспрессии белка MAGE-C1, наличие достоверной взаимосвязи было подтверждено только при сопоставлении с размерами костных плазмоцитом. У всех 6 больных с высокой экспрессией белка MAGE-C1, у которых было документировано наличие костной плазмоцитомы, размеры ее превышали 50 мм хотя бы в одном измерении, тогда как в группах больных с нормальной и промежуточной экспрессией белка такие размеры мягкотканного образования регистрировались только у 28,6% и 33,3% соответственно,  $p=0,02$ . Результаты представлены в **таблице 21**.

**Таблица 21.** Сопоставление клинико-лабораторных параметров больных ММ с разным уровнем экспрессии белка MAGE-C1.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии белка MAGE-C1			
	Нормальный уровень ( $n=9$ ), n (%)	Средний уровень ( $n=11$ ), n (%)	Высокий уровень ( $n=14$ ), n (%)	p
Пол:				
мужской	5 (55,6)	6 (54,5)	7 (50)	0,95
женский	4 (44,4)	5 (45,5)	7 (50)	
Медиана возраста, лет (диапазон)	57 (46-65)	60 (42-68)	56 (35-68)	0,72
≤ 65 лет	9 (100)	10 (91)	10 (71,4)	0,13
> 65 лет	-	1 (9)	4 (28,6)	
Стадия по Durie-Salmon:				
I-II	2 (22,2)	2 (18)	4 (28,6)	0,82
III	7 (77,8)	9 (82)	10 (71,4)	
Стадия по ISS:				
I-II	7 (77,8)	8 (73)	7 (50)	0,31
III	2 (22,2)	3 (27)	7 (50)	
Стадия по R-ISS:				
I-II	8 (88,9)	10 (91)	11 (78,6)	0,64
III	1 (11,1)	1 (9)	3 (21,4)	

Продолжение таблицы 21.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии белка MAGE-C1			
	Нормальный уровень (n=9), n (%)	Средний уровень (n=11), n (%)	Высокий уровень (n=14), n (%)	p
Костные плазмоцитомы: отсутствие наличие	2 (22,2) 7 (77,8)	8 (73) 3 (27)	8 (57,2) 6 (42,8)	0,07
Костные плазмоцитомы: одна две и более	3 (42,8) 4 (57,2)	1 (33,3) 2 (66,7)	2 (33,3) 4 (66,7)	0,92
Костные плазмоцитомы (размеры): менее 50 мм более 50 мм	5 (71,4) 2 (28,6)	2 (66,7) 1 (33,3)	- 6 (100)	0,02
Высокий цитогенетический риск: отсутствие наличие	5 (55,6) 4 (44,4)	8 (73) 3 (27)	10 (71,4) 4 (28,6)	0,66
Double-hit (две цитогенетические аномалии высокого риска) отсутствие наличие	7 (77,8) 2 (22,2)	9 (82) 2 (18)	12 (85,7) 2 (14,3)	0,88
Лактатдегидрогеназа: 163-280 Ед/л 285-584 Ед/л	3 (33,3) 6 (66,7)	4 (36) 7 (64)	4 (28,6) 10 (71,4)	0,91
Сывороточный кальций: 2,06-2,65 ммоль/л 2,69-3,27 ммоль/л	7 (77,8) 2 (22,2)	10 (91) 1 (9)	10 (71,4) 4 (28,6)	0,48
β2-микроглобулин: 1,61-5,5 мг/л 5,86-19,0 мг/л	7 (77,8) 2 (22,2)	8 (73) 3 (27)	7 (50) 7 (50)	0,31
Гемоглобин: 120-151 г/л 65-118 г/л	6 (66,7) 3 (33,3)	5 (45,5) 6 (54,5)	4 (28,6) 10 (71,4)	0,19
Сывороточный креатинин: 46,6-105 мкмоль/л 255,6-1535 мкмоль/л	7 (77,8) 2 (22,2)	8 (73) 3 (27)	9 (64,3) 5 (35,7)	0,77
Соотношение СЛЦ: 0,25-22,3 34,4-1511,2	1 (16,7) 5 (83,3)	2 (66,7) 1 (33,7)	4 (40) 6 (60)	0,32

Продолжение таблицы 21.

Исследуемые параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии белка MAGE-C1			
	Нормальный уровень (n=9), n (%)	Средний уровень (n=11), n (%)	Высокий уровень (n=14), n (%)	p
Плазматические клетки в костном мозге: 4,4-28 % 30,8-89 %	7 (77,8) 2 (22,2)	6 (54,5) 5 (45,5)	8 (57,2) 6 (42,8)	0,51
Сывороточный парапротеин: ≤ 30 г/л > 30 г/л	5 (55,6) 4 (44,4)	6 (54,5) 5 (45,5)	8 (57,2) 6 (42,8)	0,99

С другими клинико-лабораторными характеристиками больных ММ с нормальной, промежуточной и высокой экспрессией исследуемого белка, значимой взаимосвязи не было определено.

#### **7.4. Сопоставление клинико-лабораторных характеристик больных ММ с содержанием ПК, экспрессирующих MAGE-C1, выявленных методом проточной цитофлуориметрии**

В число 29 больных, которым было выполнено определение процентного содержания плазматических клеток, экспрессирующих белок MAGE-C1, включено 13 (44,8%) мужчин и 16 (55,2%) женщин. Медиана возраста составила 60 лет при разбросе данных от 47 до 73 лет.

По классификации Durie-Salmon у 3 (10,4%) больных определена I-II стадия заболевания 26 (89,6%) - III стадия. Секрция парапротеина составила от следовых значений до 54 г/л, белок Бенс-Джонса в моче (от следовых показателей до 12,54 г/сут) определялся у 20 (69%) больных. Миеломная каст-нефропатия (подстадия B) зарегистрирована у 7 (24,2%) больных.

Согласно критериям системы стадирования ISS I стадия подтверждена у 6 (20,7%), II - у 10 (34,5%) и III стадия - у 9 (31%), у 4 (13,8%) стадия не определена.

Цитогенетические аномалии высокого риска выявлены у 5 (17,3%) больных. Высокая активность ЛДГ (>280 Ед/л) зарегистрирована у 3 (10,4%). Согласно критериям системы стадирования R-ISS наблюдалось следующее распределение: I стадия документирована у 6 (20,7%) больных, II стадия - у 16 (55,2%) больных и III стадия у 1 (3,44%) больного.

Костные плазмцитомы были обнаружены у 15 (51,8%) больных. Из них, у 6 (40%) больных был документирован один очаг мягкотканного образования, разрушающий костную

структуру, у остальных 9 (60%) обнаруживали плазмоцитомы двух и более различных локализаций. У 9 (60%) больных размеры плазмоцитомы превышали 50 мм хотя бы в одном измерении, у 6 (40%) больных размеры образования были менее 50 мм.

Подробная клинико-лабораторная характеристика 29 больных представлена в **таблице 22**.

**Таблица 22.** Клинико- лабораторные характеристики больных ММ, у которых было определено процентное содержание ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1 методом МПЦ.

Клинико-лабораторные параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ (n=29)
Пол:	
мужчины	13 (44,8%)
женщины	16 (55,2%)
Медиана возраста (лет), диапазон	60 (47-73)
≤ 65 лет	22 (75,8%)
> 65 лет	7 (24,2%)
Стадия по Durie-Salmon:	
I-II	3 (10,4%)
III	26 (89,6%)
Стадия по ISS:	
I	6 (20,7%)
II	10 (34,5%)
III	9 (31%)
Стадия по R-ISS:	
I	6 (20,7%)
II	16 (55,2%)
III	1 (3,44%)
Наличие костных плазмоцитом:	15 (51,8%)
Количество костных плазмоцитом:	
одна	6 (40%)
две и более	9 (60%)
Размеры костных плазмоцитом:	
менее 50 мм	9 (60%)
более 50 мм	6 (40%)
Высокий цитогенетический риск:	5 (17,3%)
Double-hit (две цитогенетические аномалии высокого риска)	4 (13,8%)
Лактатдегидрогеназа:	
109-265 Ед/л	26 (89,6%)
299-519 Ед/л	3 (10,4%)
Сывороточный кальций:	
1,22-2,62 ммоль/л	19 (65,5%)
2,68-3,49 ммоль/л	10 (34,5%)

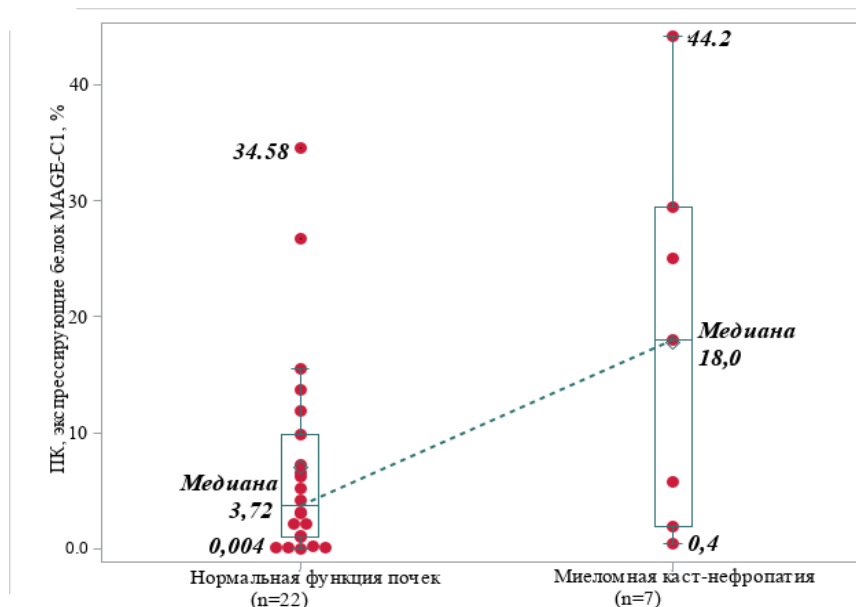
Продолжение таблицы 22.

Клинико-лабораторные параметры	Частота клинико-лабораторных параметров у больных ММ (n=29)
β2-микροглобулин: 2,5-5,5 мг/л 6,6-19,0 мг/л	11 (52,4%) 10 (47,6%)
Гемоглобин: 55-119 г/л 121- 143 г/л	23 (79,3%) 6 (20,7%)
Сывороточный креатинин: 56,7-177 мкмоль/л 211-668 мкмоль/л	22 (79,3%) 7 (20,7%)
Соотношение СЛЦ: 2,76-25 29,7-29296	12 (48%) 13 (52%)
Плазматические клетки в костном мозге: 0,8-30 % 30,4-72,4 %	17 (58,6%) 12 (41,4%)
Сывороточный парапротеин: следы-21,7 г/л 32,9-85 г/л	8 (27,6%) 17 (58,6%)

После проведения однофакторного анализа была обнаружена достоверная взаимосвязь наличия миеломной каст-нефропатии в дебюте ММ от процентного содержания плазматических клеток, экспрессирующих белок MAGE-C1. В **таблице 23** представлены значения относительного числа плазматических клеток у больных с нормальной функцией почек и миеломной каст-нефропатией в дебюте ММ, на **рисунке 17** их графическое изображение.

**Таблица 23.** Процентное содержание плазматических клеток, экспрессирующих белок MAGE-C1 у больных с нормальной функцией почек и миеломной каст-нефропатией.

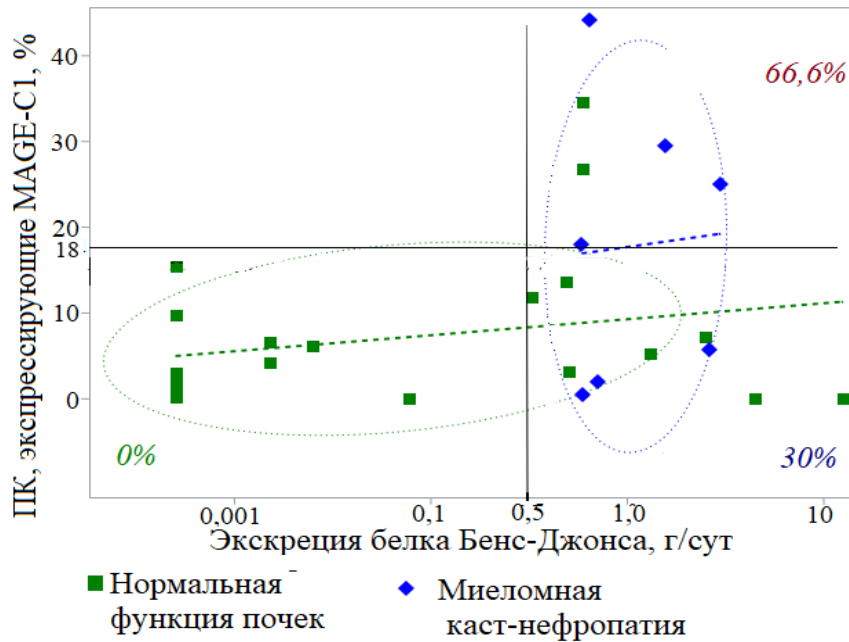
Состояние почечной функции	Доля ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, от всех клеток, %		p
	Медиана (разброс значений)	Среднее значение	
Нормальная функция почек (n=22)	3,72 (0,004-34,58)	6,86±1,83	0,03
Миеломная каст-нефропатия (n=7)	18,0 (0,4-44,2)	18,29±5,96	



**Рисунок 17.** Взаимосвязь состояния почечной функции у больных ММ и процентного содержания ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1.

Последующее сопоставление клинико-лабораторных параметров с долей ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, с использованием двумерного дискриминантного анализа, позволило определить группу больных, у которых было документировано развитие миеломной каст-нефропатии. В анализ также были включены значения экскреции белка Бенс-Джонса в дебюте заболевания. Результаты представлены на **рисунке 18**.

Группы точек, соответствующие больным с миеломной каст-нефропатией (синие ромбы) и нормальной функцией почек (зеленые квадраты) хорошо разделяются двумя линиями (горизонтальной и вертикальной), которые соответствуют пороговым значениям ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1 и экскреции белка Бенс-Джонса. В результате образуются группы больных относительно риска развития миеломной каст-нефропатии в дебюте ММ.



**Рисунок 18.** Определение риска развития миеломной каст-нефропатии в дебюте ММ в зависимости от числа ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, и показателей экскреции белка Бенс-Джонса.

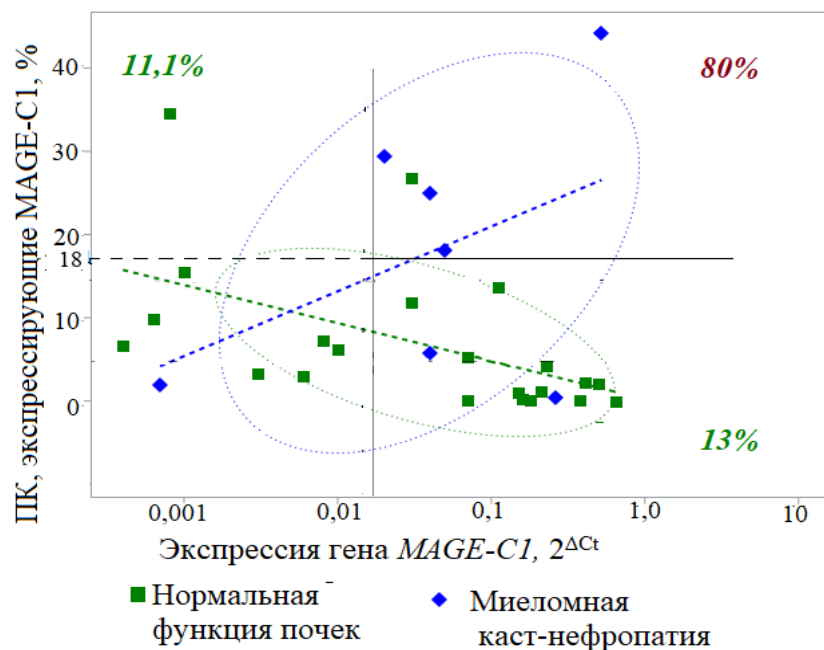
Удалось определить, что наименьший риск развития миеломной каст-нефропатии у тех больных, процент ПК, экспрессирующих MAGE-C1, которых соответствовал значению  $<18\%$ , а показатели экскреции белка Бенс-Джонса были менее  $0,5$  г/сут. Эту группу составили 13 больных с нормальной функцией почек. Тогда как при числе ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, равному  $\geq 18\%$  и экскреции белка Бенс-Джонса  $>0,5$  г/сут, вероятность развития каст-нефропатии составила уже  $66,6\%$ . Отдельно удалось выделить группу из 10 больных промежуточного риска, у которых в  $30\%$  случаев было документировано нарушение почечной функции. Число ПК, экспрессирующих MAGE-C1, у них соответствовало  $<18\%$ , а протеинурия составила  $>0,5$  г/сут. Несмотря на немногочисленность исследуемой группы, наблюдалась явная тенденция, отражающая достоверность полученных результатов ( $p=0,07$ ).

### 7.5. Влияние экспрессии гена MAGE-C1 и белка MAGE-C1 на развитие миеломной каст-нефропатии в дебюте ММ

При оценке вероятности выявления миеломной каст-нефропатии в дебюте ММ у больных с выявленной экскрецией белка Бенс-Джонса в зависимости от числа ПК, экспрессирующих

белок MAGE-C1 (ПЦМ) и экспрессии гена *MAGE-C1* (ПЦР-РВ) было определено, что решающее значение играет не столько уровень экспрессии гена *MAGE-C1*, сколько увеличение числа плазматических клеток, экспрессирующих исследуемый белок. Результаты распределения больных на группы относительно риска развития миеломной каст-нефропатии в дебюте ММ представлены на рисунке 19.

В группе больных с низкими показателями экспрессии гена *MAGE-C1* и любым числом ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, вероятность развития нефропатии была также мала как и у больных с повышенными показателями экспрессии исследуемого гена, но числом ПК, экспрессирующих MAGE-C1, равном <18%. В этих группах миеломная каст-нефропатия регистрировалась в 11,1% и 13% случаев. Достоверное же увеличение числа больных ММ с документированной миеломной каст-нефропатией наблюдается на фоне роста процентного содержания ПК, экспрессирующих MAGE-C1, одновременно с повышением уровня экспрессии гена *MAGE-C1*, и составляет уже 80% ( $p=0,01$ ).



**Рисунок 19.** Определение риска развития миеломной каст-нефропатии в дебюте ММ в зависимости от числа ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1, и показателей экспрессии гена *MAGE-C1*.



### **Клинический случай 1.**

*Больная С.Е.В., 55 лет, в августе 2020 года отметила появление образования третьего ребра справа на уровне сочленения грудины, которое в последующем увеличивалось в размерах, появились боли в ребрах, грудном, поясничном отделах позвоночника.*

*По месту жительства в октябре 2020 года выполнено УЗИ грудной клетки, по данным которого выявлено образование по парастернальной линии 3 ребра, уходящее глубоко в межреберный промежуток, размерами 38x24 мм. В гемограмме анемия 105 г/л, в биохимическом анализе повышение содержания общего белка до 105 г/л, креатинина до 405 мкмоль/л на фоне олигурии. По данным иммунохимического исследования сыворотки крови — секреция парапротеина Gk 41,5 г/л, содержание  $\beta$ 2-микроглобулина - 27 мг/л. При рентгенографии органов грудной клетки выявлены патологические переломы ThVI, XI, XII, объемные образования ThV-VII (5-18 мм), двусторонняя плевропневмония. Был заподозрен парапротеинемический гемобластоз, в конце ноября 2020 г. направлена на дообследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.*

*При обследовании в гемограмме анемия 55 г/л, тромбоцитопения  $110 \times 10^9$ /л, ускорение СОЭ до 61 мм/ч. В биохимическом анализе крови — ЛДГ 200 Е/л, повышение общего белка до 129,2 г/л (гипоальбуминемия 20,7 г/л), общего кальция до 3,07 ммоль/л, креатинина до 411 мкмоль/л, снижение СКФ (СКД-ЕРІ) до 10 мл/мин $1,73\text{м}^2$ . Иммунохимическое исследование белков сыворотки крови и мочи выявило моноклональную секрецию Gk 73,3 г/л, соотношение к/λ-СЛЦ 69, экскрецию белка Бенс-Джонса к 0,64 г/сут. Содержание  $\beta$ 2-микроглобулина превышало 18,5 мг/л.*

*В миелограмме — 58 % плазматических клеток, трепанобиоптат костного мозга представлен диффузным пролифератом плазматических клеток со зрелой морфологией. Результаты молекулярно-цитогенетического исследования (FISH) костного мозга позволили определить высокий цитогенетический риск- в 97% ядер выявлена транслокация t(4;14)(p16;q32), делеция 13q-/моносомия13, в 10% ядер выявлена амплификация 1q21 (1 дополнительный сигнал).*

*По данным КТ исследования костей черепа и грудной клетки: во всех видимых костях документированы множественные остеолитические очаги с наличием образований мягкотканной плотности. Передний отрезок 3 ребра слева разрушен, муфтообразно окружен мягкотканым компонентом, с распространением на окружающие ткани, размерами 67,5x44,5x51 мм. В Th10 очаг деструкции размерами 19x5x18 мм, с распространением плазмоцитомы за пределы кости на небольшом протяжении. Компрессионный патологический*

перелом тела Th11, множественные патологические переломы ребер.

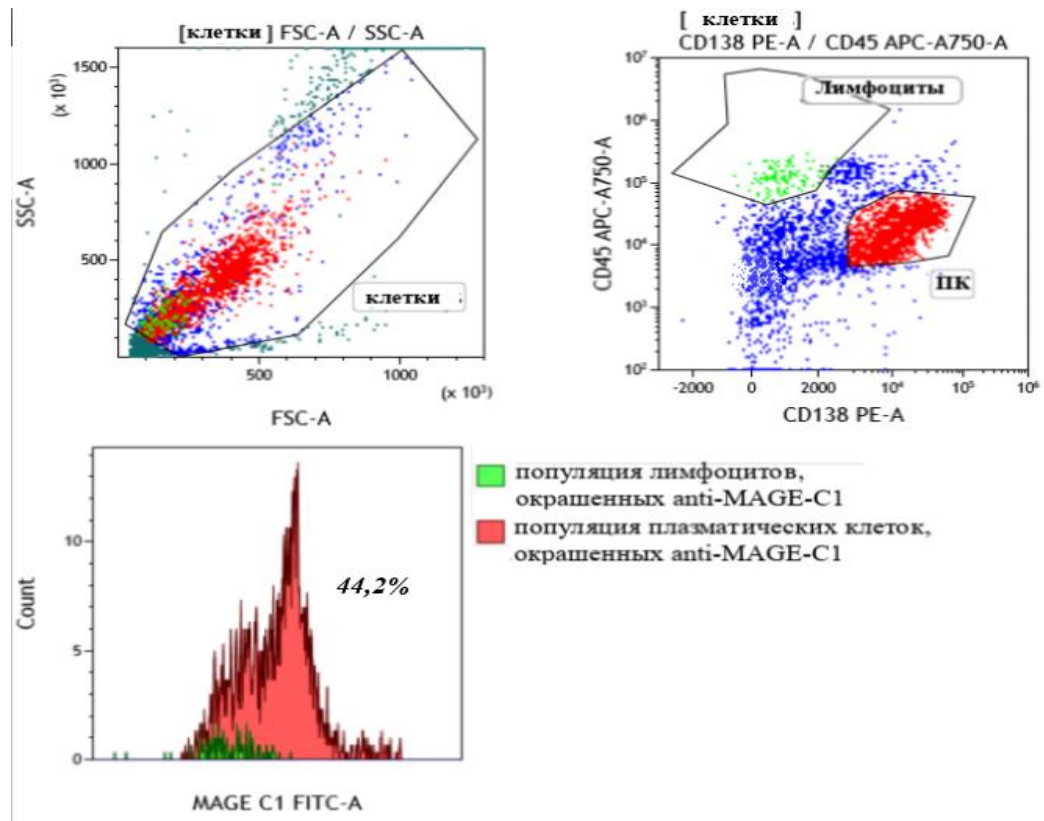
По данным КТ костей таза: визуализированы множественные остеолитические очаги с наличием образований мягкой тканной плотности. Наиболее крупные очаги: в теле правой подвздошной кости- размерами 75x30 мм, в правых отделах крестца с каудальным и экстраоссальным распространением плазмоцитомы в область малого таза на 20-23 мм, размерами до 82,5x37,8 мм.

Кроме того, по данным КТ органов грудной клетки в обеих плевральных полостях определяли жидкость: справа до 150 мл, слева — не менее 1000 мл. При цитологическом исследовании плевральной жидкости обнаружено 44% плазматических клеток, при исследовании методом проточной цитофлуориметрии – 66,5% плазматических клеток с aberrантным иммунофенотипом CD138+CD38dimCD45±CD19-CD56+CD27-CD117±CD200-.

Таким образом, установлен диагноз: Множественная миелома, протекающая с парапротеинемией G<sub>κ</sub> и СЛЦ-κ, протеинурией Бенс-Джонса κ, распространенным остеодеструктивным процессом, наличием костной плазмоцитомы Th10, 3 ребра слева, правой подвздошной кости, крестца. Патологические переломы Th10, ребер. Экстремедулярное поражение плевры. IIIB стадия по Durie-Salmon, III стадия по ISS, III стадия по R-ISS. Миеломная нефропатия, острое повреждение почек 2-3 стадии по AKIN.

При исследовании экспрессии гена MAGE-C1 плазматическими клетками костного мозга были выявлены повышенные показатели. Так, методом ПЦР-РВ значение экспрессии гена MAGE-C1 составило 0,52 ( $2^{\Delta C_t}$ ).

При исследовании костного мозга методом мультипараметрической проточной цитофлуориметрии обнаружено 64,24% плазматических клеток с aberrантным иммунофенотипом CD138+CD38+CD45-CD19-CD56highCD27-CD117+CD200high и 44,2% плазматических клеток, экспрессирующих белок MAGE-C1. Стратегия гейтирования представлена на **рисунке 20**.



**Рисунок 20.** Стратегия гейтирования для определения экспрессии белка MAGE-C1 плазматическими клетками методом МПЦ у больной С.Е.В.

Наличие таких неблагоприятных факторов прогноза ММ как костные плазмоцитомы больших размеров, экстрамедуллярное поражение плевры, III стадия по R-ISS, развитие миеломной нефропатии позволяют наглядно продемонстрировать тяжелое клиническое течение дебюта ММ у больной с повышенным значением экспрессии гена *MAGE-C1* и высоким процентным содержанием плазматических клеток, экспрессирующих белок MAGE-C1.

### Клинический случай 2.

Больной Ш.А.Г., 58 лет, в октябре 2019 года отметил появление болей в грудном и поясничном отделах позвоночника. При обследовании по данным КТ грудного и пояснично-крестцового отделов позвоночника во всех видимых костях определялись очаги деструкции разного размера. По данным МРТ пояснично-крестцового отдела позвоночника выявлено образование крестца слева размерами 66x57 мм, компрессионный перелом Th12. В последующем интенсивность оссалгий нарастала, отметил уменьшение роста на 10 см, потерю веса на 20

кг. При очередном обследовании в августе 2020 года по месту жительства при рентгенографии костей скелета множественные очаги деструкции всех видимых костей. Был заподозрен парапротеинемический гемобластоз, в октябре 2020 года направлена на дообследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

При обследовании в гемограмме содержание гемоглобина 143 г/л, СОЭ 7 мл/ч. В биохимическом анализе крови — ЛДГ 262 Е/л, общий белок 73,4 г/л (альбумин 44,1 г/л), креатинин 61,2 мкмоль/л, сывороточный кальций 2,35 ммоль/л. Иммунохимическое исследование белков сыворотки крови и мочи выявило моноклональную секрецию Gk 8,2 г/л, увеличение концентрации СЛЦ-к до 529 мг/л, соотношение к/л-СЛЦ 25, экскреция белка Бенс-Джонса к составила 1,31 г/сут. Содержание  $\beta$ 2-микроглобулина составило 3,93 мг/л.

В миелограмме — 12,4% плазматических клеток, гистологическая картина трепанобиоптата костного мозга представлена инфильтрацией плазматическими клетками со зрелой морфологией.

По данным КТ костей черепа, грудного и пояснично-крестцового отделов позвоночника: множественные очаги деструкции костной ткани, размеры очагов в костях черепа не превышают 6-8 мм, часть из них выходят на контур кости, заполнены содержимым мягкотканной и пониженной мягкотканной плотности. Высота тел Th3-6, 9, 10, 12, L3-5 резко снижена, тело L4 разрушено, заполнено содержимым мягкотканной плотности без признаков распространения за пределы кости, множественные патологические переломы ребер. Крупная зона деструкции в боковых массах крестца, размерами до 39x32 мм.

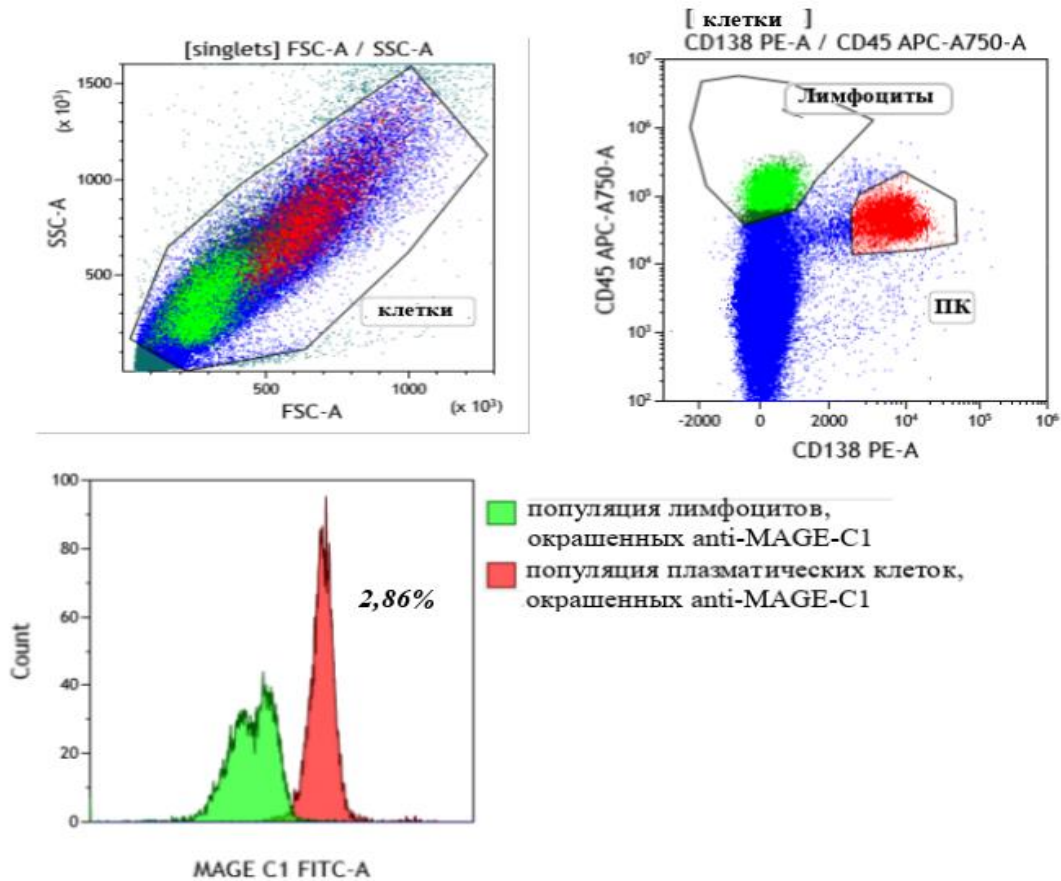
По данным МРТ всего тела: признаки диффузно-очаговой инфильтрации костного мозга костей скелета, наибольший очаг в левых боковых массах крестца, размерами 40x38 мм, компрессионные переломы тел С3, Th3-6, 9, 10, 12, L3-5, множественные переломы ребер.

При молекулярно-цитогенетическом исследовании (FISH) цитогенетических аномалий высокого риска не выявлено.

Таким образом, установлен диагноз: Множественная миелома, протекающая с парапротеинемией Gk и СЛЦ-к, протеинурией Бенс-Джонса к, распространенным остеодеструктивным процессом, вовлечением костного мозга левых боковых масс крестца. Множественные патологические переломы ребер, компрессионные переломы тел С3, Th3-6, 9, 10, 12, L3-5. IIIA стадия по Durie-Salmon, II стадия по ISS, II стадия по R-ISS.

При исследовании экспрессии гена MAGE-C1 плазматическими клетками костного мозга были выявлены низкие показатели экспрессии. Так, методом ПЦР-РВ значение экспрессии гена MAGE-C1 составило 0,07 ( $2^{\Delta Ct}$ ).

При исследовании костного мозга методом мультипараметрической проточной цитофлуориметрии обнаружено 5,22% плазматических клеток с aberrантным иммунофенотипом  $CD138+CD38+CD319+CD45-CD19-CD56-/+CD27dimCD117+CD20-$  и 2,86% плазматических клеток, экспрессирующих белок *MAGE-C1*. Стратегия гейтирования представлена на рисунке 21.



**Рисунок 21.** Стратегия гейтирования для определения экспрессии белка *MAGE-C1* плазматическими клетками методом МПЦ у больного Ш.А.Г.

Данный клинический случай демонстрирует сочетание низких показателей экспрессии *MAGE-C1* и небольшого числа ПК костного мозга, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, с отсутствием факторов неблагоприятного прогноза заболевания у больного ММ.

## Глава 8. Оценка противоопухолевого ответа после выполнения индукционного и трансплантационного этапов терапии больных ММ

### 8.1. Оценка противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие курсы в зависимости от экспрессии гена *MAGE-C1*

Противоопухолевый ответ был оценен у 75 из 81 больного ММ, которым в качестве первого этапа индукционной терапии были применены схемы, включающие бортезомиб. Остальные 6 больных не достигли контрольных точек оценки противоопухолевого ответа, 3 из них по причине летальности в раннем индукционном периоде.

У 8 (10,7%) больных противоопухолевый ответ на индукционную терапию был оценен как полный (ПО), у 20 (26,8%) — очень хороший частичный (ОХЧО), у 26 (34,7%) — частичный (ЧО), еще у 18 (26,8%) констатирована рефрактерность опухоли к бортезомибу.

В ходе исследования проанализирована эффективность бортезомиб-содержащей индукционной терапии в группах с нормальной и повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*. В **таблице 24** указаны результаты индукционной терапии в зависимости от выявления нормальной и повышенной экспрессии гена *MAGE-C1*.

Оценку противоопухолевого ответа производили после 4-6 курсов терапии, так как в случае рефрактерности опухоли к бортезомибу, требовался переход на вторую и последующие линии терапии.

**Таблица 24.** Результаты индукционной терапии бортезомиб-содержащими курсами у больных с нормальной и повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*.

Экспрессия гена <i>MAGE-C1</i> (n=75)	Частота достижения противоопухолевого ответа					
	ПО+ОХЧО +ЧО	ПО+ОХЧО	ПО	ОХЧО	ЧО	Рефрактерное течение
Нормальная (n=25)	88% 22/25	40% 10/25	12% 3/25	28% 7/25	48% 12/25	12% 3/25
Повышенная (n=50)	64% 32/50	36% 18/50	10% 5/50	26% 13/50	28% 14/50	36% 18/50
<i>P</i>	0,03	0,73	0,79	0,85	0,08	0,03

Анализируя данные, представленные в таблице 24, была выявлена значимая разница в частоте достижения противоопухолевого ответа в зависимости от нормальной и повышенной экспрессии гена *MAGE-C1*. Так, у больных с нормальной экспрессией исследуемого гена частота достижения общего ответа (ПО+ОХЧО+ЧО) составила 88%, в то время как у больных с повышенной экспрессией - 64% ( $p=0,03$ ). Достижение глубокого ответа в каждой группе документировали с одинаковой частотой.

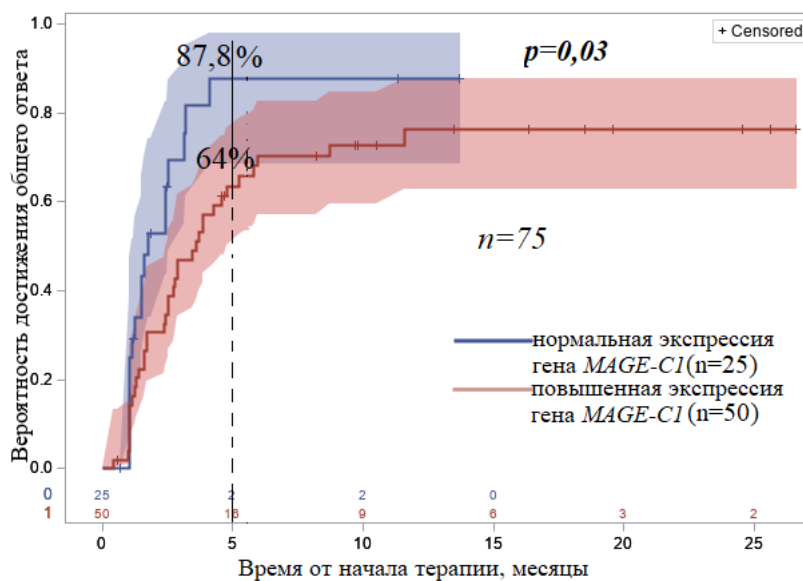
Кроме того, был проведен анализ, направленный на поиск возможной взаимосвязи экспрессии гена *MAGE-C1* со сроками достижения противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие схемы терапии. В **таблице 25** представлены сроки достижения общего ответа у больных с нормальной и повышенной экспрессией исследуемого гена.

**Таблица 25.** Сроки достижения общего противоопухолевого ответа от начала индукционной терапии у больных с нормальной и повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*.

Экспрессия гена <i>MAGE-C1</i>	Время достижения общего противоопухолевого ответа (медиана и разброс значений), мес.
Нормальная (n=25)	1,77 (1,08-3,11)
Повышенная (n=50)	3,6 (1,6-11,6)

Из таблицы видно, что у больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1* достижение общего ответа регистрировали значимо раньше по сравнению с больными, у которых документировали повышенную экспрессию исследуемого гена. Медиана времени достижения общего ответа в группе больных с нормальной экспрессией составила 1,77 месяцев от начала терапии, тогда как у больных с повышенной экспрессией гена *MAGE-C1* потребовалось в два раза больше времени — 3,6 месяца.

**Рисунок 22** иллюстрирует представленные результаты.



**Рисунок 22.** Вероятность достижения общего ответа у больных с нормальной или повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*.

Для оценки частоты достижения общего ответа на индукционную терапию в зависимости от экспрессии исследуемого гена, больные были распределены на три группы в соответствии с уровнем экспрессии (см. главу 3.2.). Результаты представлены в **таблице 26**.

**Таблица 26.** Результаты индукционной терапии бортезомиб-содержащими курсами в зависимости от уровня экспрессии гена *MAGE-C1*.

Уровень экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> (n=75)	Частота достижения противоопухолевого ответа					
	ПО+ОХЧО+ЧО	ПО+ОХЧО	ПО	ОХЧО	ЧО	Рефрактерное течение
Нормальный (n=25)	88% 22/25	40% 10/25	12% 3/25	28% 7/25	48% 12/25	12% 3/25
Промежуточный (n=38)	66% 25/38	36,8% 14/38	7,9% 3/38	28,9% 11/38	28,9% 11/38	34% 13/38
Высокий (n=12)	58,3% 7/12	33,3% 4/12	16,7% 2/12	16,7% 2/12	25% 3/12	41,7% 5/12



Как представлено в таблице 26, после разделения больных на три группы относительно уровня экспрессии гена *MAGE-C1*, было определено, что наименьшая частота достижения общего ответа наблюдалась в группе больных с высоким уровнем экспрессии исследуемого гена и составила 58,3%. У больных с промежуточным уровнем экспрессии общий ответ достигался чаще и соответствовал 66%. Явных отличий в достижении более глубокого ответа в трех группах больных выявлено не было.

Также была определена разница во времени достижения общего ответа от начала индукционной терапии у больных с нормальным, промежуточным и высоким уровнями экспрессии исследуемого гена. Результаты приведены в таблице 27.

**Таблица 27.** Сроки достижения общего противоопухолевого ответа от начала индукционной терапии у больных с нормальным, промежуточным и высоким уровнями экспрессии гена *MAGE-C1*.

Уровень экспрессии гена <i>MAGE-C1</i>	Время достижения общего противоопухолевого ответа (медиана и разброс значений), мес.
Нормальный (n=54)	1,77 (1,08-3,11)
Промежуточный (n=38)	3,44 (1,6-7,9)
Высокий (n=12)	4,22 (1,2 -11,6)

Из таблицы 27 видно, что медиана времени достижения общего ответа у больных с промежуточным уровнем экспрессии составила 3,44 месяца, а у больных с высоким уровнем экспрессии возростала до 4,22 месяца. Результаты представлены на **рисунке 23**.

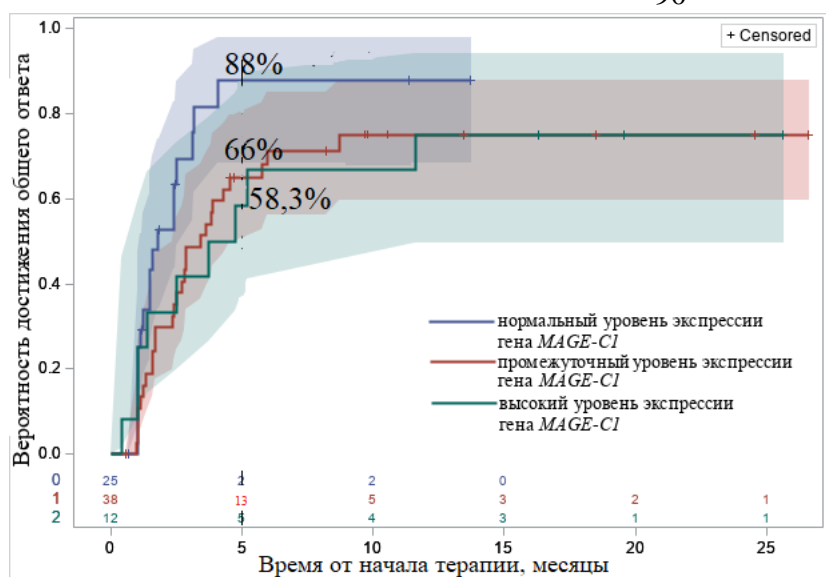
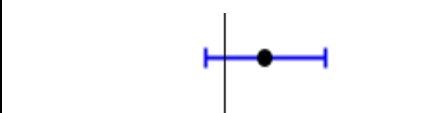
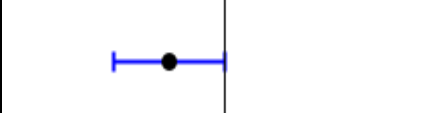
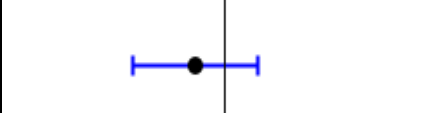

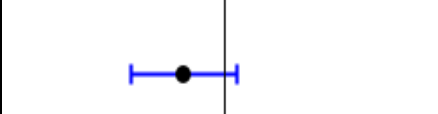
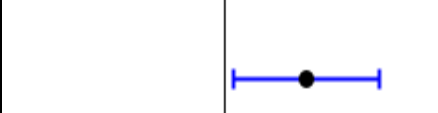


Рисунок 23. Вероятность достижения общего ответа в зависимости от нормального, промежуточного или высокого уровня экспрессии гена *MAGE-C1*.

Поскольку кроме изучаемого целевого фактора, а именно экспрессии гена *MAGE-C1*, на вероятность достижения ответа могут влиять и другие клиничко-лабораторные характеристики опухоли, нами была изучена прогностическая роль других параметров, известных на момент диагностики заболевания.

Таким образом, с целью поиска выводов о влиянии экспрессии гена *MAGE-C1* на достижение противоопухолевого ответа, был проведен многофакторный логистический анализ. Пошаговая модель отобрала ключевые признаки, оказывающие влияние на достижение противоопухолевого ответа, к ним были отнесены: экспрессия гена *MAGE-C1*, наличие костных плазмоцитом, стадия заболевания по Durie-Salmon и ISS, значения секреции парапротеина и концентрация  $\beta 2$ -микроглобулина. Клиничко-лабораторные параметры, предварительно отобранные в попарном частотном анализе и вошедшие в многофакторную модель, представлены в **таблице 28**.

**Таблица 28.** Вероятность достижения противоопухолевого ответа в зависимости от клинико-лабораторных параметров.

Клинико-лабораторные параметры	Вероятность достижения противоопухолевого ответа	ОШ	95% ДИ	<i>p</i>
Нормальная экспрессия гена <i>MAGE-C1</i>		2,4	0,68-8,38	0,17
Наличие костных плазмоцитом		0,32	0,10-1,02	0,05
III стадия по Durie-Salmon		0,55	0,15-2,02	0,36
III стадия по ISS		0,26	0,07-0,95	0,04
Секреция парапротеина >30 г/л		0,43	0,14-1,29	0,13
$\beta$ 2-микроглобулин <5,5 мг/л		5,65	1,23-25,93	0,02

0.1    0.5    1    2    10  
уменьшается    |    возрастает

Многофакторный кокс-регрессионный анализ, сопоставивший влияние клинико-лабораторных параметров на вероятность достижения противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие схемы индукционной терапии позволил определить, что фактором, который наиболее достоверно влиял на достижение общего ответа, оказался низкий уровень  $\beta$ 2-микроглобулина, равный <5,5 мг/л. Нормальная экспрессия гена *MAGE-C1* также оказывала положительное влияние на достижение общего противоопухолевого ответа, однако достоверных результатов получить не удалось.

При этом, наличие костных плазмоцитом и III стадия по ISS достоверно снижали вероятность достижения общего ответа, так же как и высокая секреция парапротеина (>30 г/л), однако при анализе этого фактора достоверности получено не было.

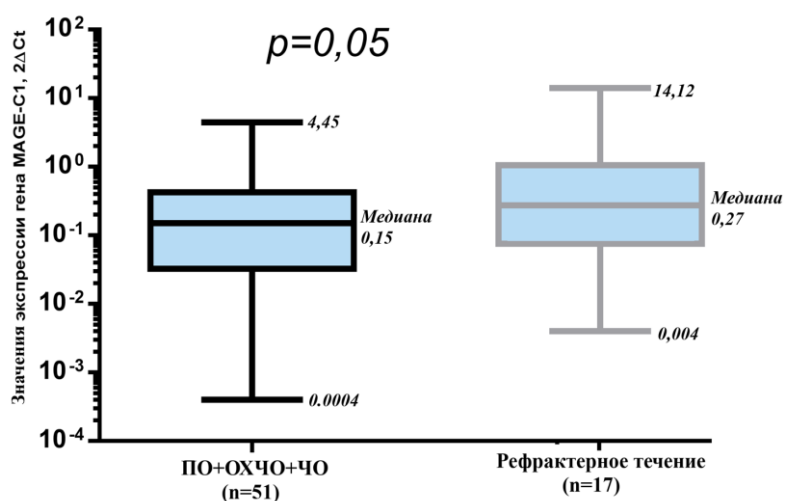
Далее было выполнено сопоставление значений экспрессии гена *MAGE-C1* в дебюте ММ у больных, достигших и не достигших общего противоопухолевого ответа

(ПО+ОХЧО+ЧО) на бортезомиб-содержащие схемы индукционного этапа терапии. Результаты представлены в **таблице 29**.

**Таблица 29.** Значения экспрессии гена *MAGE-C1* в зависимости от ответа на бортезомиб-содержащие схемы терапии.

Противоопухолевый ответ на бортезомиб-содержащие схемы терапии	Значения экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> , $2^{\Delta Ct}$		<i>p</i>
	Медиана	Разброс значений	
ОП+ОХЧО+ЧО (n=55)	0,15	0,0004-4,45	0,05
Рефрактерное течение (n=17)	0,27	0,004-14,12	

Как представлено в таблице 30, значения экспрессии гена *MAGE-C1* в дебюте ММ были достоверно ниже у больных, достигших как минимум частичного ответа по сравнению с больными, у которых наблюдалось рефрактерное к бортезомиб-содержащей терапии течение заболевания: 0,15 ( $2^{\Delta Ct}$ ) против 0,27 ( $2^{\Delta Ct}$ ),  $p=0,05$ . **Рисунок 24** иллюстрирует, представленные в таблице 29, результаты.



**Рисунок 24.** Показатели экспрессии гена *MAGE-C1* в зависимости от ответа на бортезомиб-содержащие схемы терапии.

## 8.2. Оценка противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие курсы в зависимости от экспрессии белка MAGE-C1

Наличие взаимосвязи противоопухолевого ответа от экспрессии белка MAGE-C1, исследованного методом ИГХ, было изучено у 28 больных. Индукционный этап терапии включал 4-7 курсов бортезомиб-содержащими программами. У 3 (10,7%) больных был достигнут полный противоопухолевый ответ, у 12 (42,9%) - ОХЧО, у 8 (28,6%) был достигнут ЧО и у 5 (17,8%) была констатирована рефрактерность опухоли к бортезомибу.

Была произведена оценка частоты достижения противоопухолевого ответа у больных с нормальной и повышенной экспрессией белка MAGE-C1. Достоверной зависимости между достижением общего или глубокого противоопухолевого ответа и уровнем экспрессии белка MAGE-C1 выявлено не было. Несмотря на это, определено, что нормальная экспрессия белка MAGE-C1 сопровождалась достижением общего противоопухолевого ответа у всех больных из этой группы, тогда как повышенная экспрессия снижала вероятность достижения ремиссии. Результаты представлены в **таблице 30**.

**Таблица 30.** Результаты индукционной терапии бортезомиб-содержащими курсами в зависимости от наличия экспрессии белка MAGE-C1.

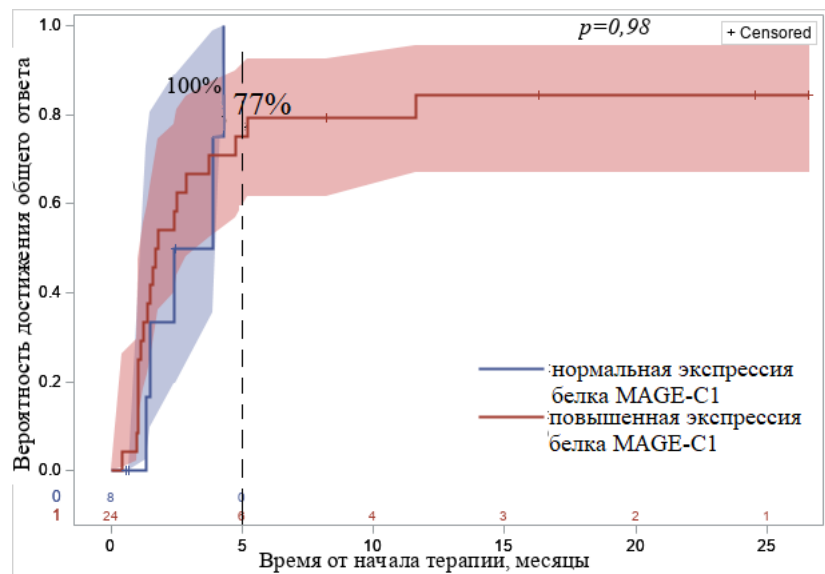
Экспрессия белка MAGE-C1 (n=28)	Частота достижения противоопухолевого ответа					
	ПО+ОХЧО +ЧО	ПО+ОХЧО	ПО	ОХЧО	ЧО	Рефрактерное течение
Нормальная (n=5)	100% 5/5	60% 3/5	20% 1/5	40% 2/5	40% 2/5	0% 0/5
Повышенная (n=23)	77% 18/23	56,5% 13/23	8,7% 2/23	43% 10/23	26% 6/23	22% 5/23
<i>P</i>	0,25	0,88	0,45	0,88	0,53	0,25

Как представлено в таблице 30, отмечена тенденция некоторого улучшения показателей как общего так и полного противоопухолевого ответа у больных с нормальной экспрессией исследуемого белка. Полученные различия оказались недостоверны, вероятно, ввиду малой выборки.

Так, на **рисунке 25** представлено, что у всех больных с нормальной экспрессией

исследуемого белка было констатировано достижение общего ответа уже к 5 месяцам от начала лечения, тогда как у больных с повышенной экспрессией белка MAGE-C1 общий ответ на бортезомиб –содержащие схемы терапии к этому же сроку составил 77%, а предельный процент больных, которые достигали минимум частичный ответ был равен 82% к году от начала лечения после назначения им препаратов второй и последующих линий,  $p=0,98$ .

**Рисунок 25** демонстрирует анализ оценки вероятности достижения общего противоопухолевого ответа в группах больных с нормальной и повышенной экспрессией белка MAGE-C1.



**Рисунок 25.** Вероятность достижения противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие схемы терапии у больных с нормальной и повышенной экспрессией белка MAGE-C1.

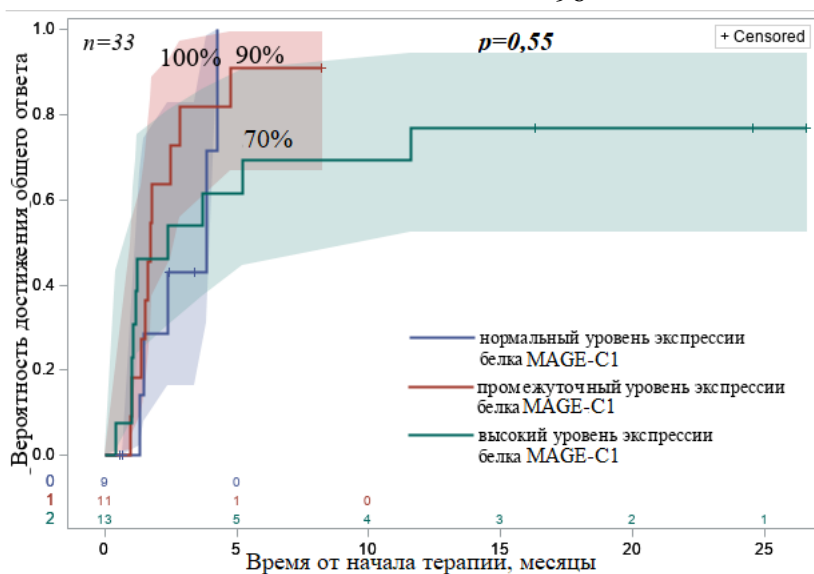
После разделения больных на три группы в зависимости от уровня экспрессии исследуемого белка (см главу 4.2.), удалось определить, что наименьшую вероятность достижения общего и глубокого ответа наблюдали у больных с высоким уровнем экспрессии белка MAGE-C1. Результаты представлены в таблице **31**.

**Таблица 31.** Результаты индукционной терапии бортезомиб-содержащими курсами в зависимости от уровня экспрессии белка MAGE-C1.

Уровень экспрессии белка MAGE-C1 в дебюте заболевания (n=28)	Частота достижения противоопухолевого ответа					
	ПО+ОХЧО +ЧО	ПО+ОХЧО	ПО	ОХЧО	ЧО	Рефрактерное течение
Нормальный (n=5)	100% 5/5	60% 3/5	20% 1/5	40% 2/5	40% 2/5	0% 0/5
Промежуточный (n=10)	90% 9/10	60% 6/10	10% 1/10	50% 5/10	30% 3/10	20% 1/10
Высокий (n=13)	70% 9/13	39% 5/13	8% 1/13	31% 4/13	38% 5/13	30% 4/13

Как представлено в таблице 31, разделение больных на три группы в зависимости от уровня экспрессии белка MAGE-C1 позволило определить, что вероятность достижения общего противоопухолевого ответа к 5 месяцам от начала терапии у больных с промежуточной экспрессией исследуемого белка составила 90% и приближалась к таковой у больных с нормальной экспрессией белка MAGE-C1. В то же время, наиболее неблагоприятное влияние оказывало выявление высокого уровня экспрессии белка MAGE-C1, вероятность достижения общего противоопухолевого ответа у больных из этой группы к 5 месяцам от начала терапии снижалась до 70%, а достижение полного ответа регистрировалось более чем в два раза реже чем у больных с нормальной экспрессией. Включение в схемы лечения иммуномодулирующих препаратов, моноклональных антител, позволило увеличить частоту достижения противоопухолевого ответа в группе больных с высокой экспрессией исследуемого белка максимально до 77% к году от начала индукционного этапа терапии.

**Рисунок 36** иллюстрирует полученные результаты.



**Рисунок 26.** Вероятность достижения противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие схемы терапии в зависимости от уровня экспрессии белка MAGE-C1.

С целью подтверждения неблагоприятного влияния повышенной экспрессии гена MAGE-C1 и белка MAGE-C1, приводим клинические наблюдения двух больных ММ.

### Клинический случай 1.

Больной Т.С.В., 58 лет, с сентября 2018 года стал отмечать появление болей в грудном отделе позвоночника, самостоятельно принимал НПВС с кратковременным эффектом. В последующем интенсивность оссалгий возрастала, боли распространились на поясничный отдел позвоночника. По месту жительства в сентябре 2019 года выполнено МРТ грудного отдела позвоночника, по данным которого выявлено снижение высоты Th10, замещение тела позвонка патологической тканью с распространением на правую дужку и суставные отростки, аналогичные очаги определяли в Th6, Th7, Th9. При дообследовании в биохимическом анализе крови выявлена гиперпротеинемия (общий белок 97,8 г/л, преимущественно за счет глобулиновой фракции), увеличение креатинина до 89 мкмоль/л. Был заподозрен парапротеинемический гемобластоз, направлен на дообследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России.

При обследовании в гемограмме отмечалось ускорение СОЭ до 45 мм/ч, остальные показатели в пределах нормы. В биохимическом анализе крови — повышение общего белка до 99,2 г/л (альбумин 40,4 г/л), креатинин 91,5 мкмоль/л, кальций общий 2,38 ммоль/л, ЛДГ 331 Е/л.



Иммунохимическое исследование белков сыворотки крови и мочи выявило моноклональную секрецию  $G\lambda$  32,4 г/л, экскрецию белка Бенс-Джонса  $\lambda$  0,54 г/сут. Содержание  $\beta$ 2-микроглобулина составило 5,43 мг/л.

В миелограмме - 26,6% плазматических клеток, в трепанобиоптате - крупноочаговая инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией.

По данным ПЭТ/КТ исследования всего тела: во всех видимых костях документированы множественные остеолитические очаги с наличием образований мягкотканной плотности, наиболее крупный очаг в Th10 - размерами 50x40x15мм (SUVmax 6,99), с распространением плазмоцитомы в спинномозговой канал со сдавлением спинного мозга. Патологический перелом Th10, заднего отрезка X ребра справа.

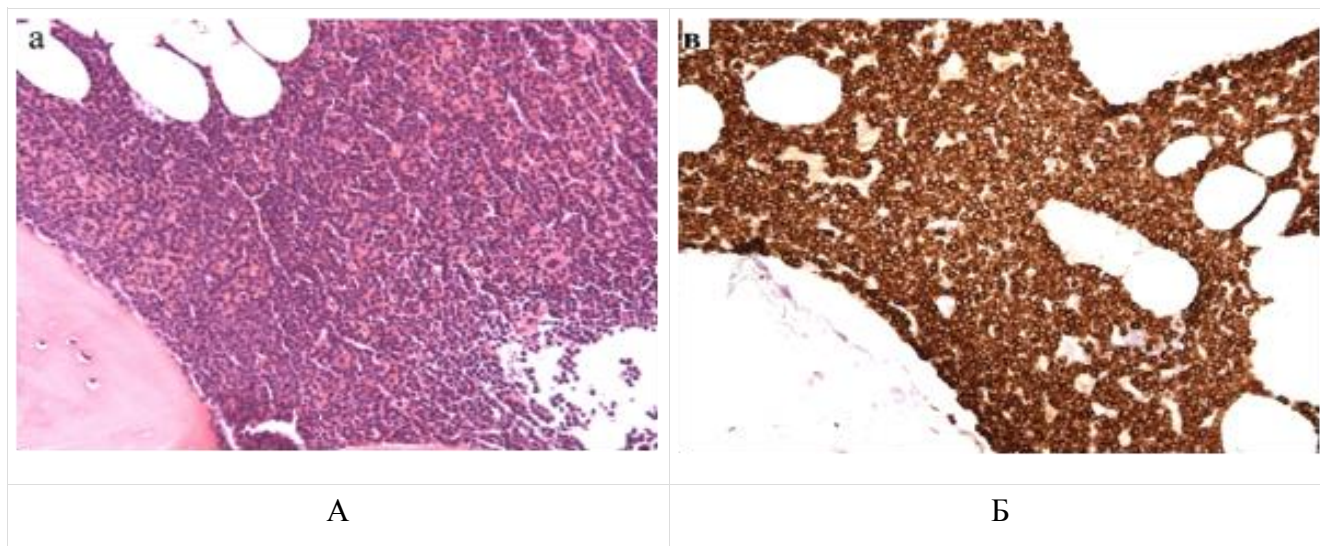
Кроме того, выполнены дополнительные методы исследования. При иммунофенотипировании выявлено 8,93% плазматических клеток с абберантным иммунофенотипом  $CD138+CD38+CD117-CD19-CD56+CD27+CD81-CD45\pm\lambda$  от всех проанализированных клеток. Результаты молекулярно-цитогенетического исследования (FISH) позволили определить высокий цитогенетический риск - в 34% ядер выявлена делеция 17p13/TP53, в 85% ядер выявлена амплификация 1q21 (1 дополнительный сигнал).

Таким образом, установлен диагноз: Множественная миелома, протекающая с парапротеинемией  $G\lambda$  и протеинурией Бенс-Джонса  $\lambda$ , распространенным остеодеструктивным процессом, наличием костной плазмоцитомы Th10 с признаками распространения в спинномозговой канал и сдавлением спинного мозга. Патологический перелом Th10, заднего отрезка X ребра справа. IIIA стадия по Durie-Salmon, II стадия по ISS, II стадия по R-ISS.

При исследовании экспрессии гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга были выявлены повышенные показатели. Так, методом ПЦР-РВ значение экспрессии гена *MAGE-C1* составило 0,48 ( $2^{\Delta Ct}$ ).

При иммуногистохимическом исследовании трепанобиоптата костного мозга наблюдали окрашивание антителом к *MAGE-C1* практически всех плазматических клеток (реакция цитоплазматическая), что свидетельствовало о высоком уровне экспрессии белка *MAGE-C1*.

На рисунке 27 представлены результаты гистологического и иммуногистохимического исследования трепанобиоптата костного мозга.



**Рисунок 27.** Гистологическая и иммуногистохимическая картины трепанобиоптата костного мозга больного Т.С.В., увеличение  $\times 200$ :

*А (окраска гематоксилином и эозином) — диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией;*

*Б (окраска антителом к MAGE-C1, цитоплазматическая реакция) — практически все клетки плазмноклеточного инфильтрата экспрессируют MAGE-C1.*

*После двух курсов терапии по схеме VCD (бортезомиб, циклофосфан, дексаметазон) отмечено снижение моноклональной секреции G $\lambda$  до 24,2 г/л, экскреции белка Бенс-Джонса  $\lambda$  до следовых значений. После следующих двух курсов VCD дальнейшего снижения секреции парапротеина не наблюдалось, уровень составлял 27,2 г/л, сохранялись следы белка Бенс-Джонса в моче. По результатам КТ размеры костной плазмоцитомы Th10 52x49 мм (плотность 55 НУ), с сохранением распространения на ножку дужки справа и паравертебральные мягкие ткани. При оценке противоопухолевого ответа на проводимую терапию констатирована стабилизация заболевания.*

*Больной был переведен на вторую линию индукционной терапии с применением комбинированной схемы IRD (иксазомиб, леналидомид, дексаметазон). После четырех курсов терапии по схеме IRD секреция парапротеина снизилась до 15,9 г/л, сохранялась следовая секреция белка Бенс-Джонса в моче. Число плазматических клеток по данным миелограммы составило 14,4%. По данным КТ регрессировало распространение плазмоцитомы в теле Th10 за его пределы, размеры составили 46x36мм (плотность 31 НУ), отмечено появление костных перемычек, восстановление коркового слоя не визуализировалось. Таким образом, после проведения двух линий терапии противоопухолевый ответ по-прежнему расценивался как стабилизация заболевания.*

Далее, больному была выполнена мобилизация гемопоэтических стволовых клеток на фоне стабильного кроветворения с применением Г-КСФ 10 мкг/кг. За 4 процедуры лейкафереза заготовлено  $2,89 \times 10^6$ /кг CD34+ клеток. Ауто-ТГСК выполнена 23.06.2020 года в условиях применения высокодозного мелфалана ( $200 \text{ мг/м}^2$ ).

При обследовании на сроке +100 дней после ауто-ТГСК по результатам иммунохимического исследования моноклональная секреция составила 12,6 г/л, экскреция белка Бенс-Джонса не выявлялась. В миелограмме плазматические клетки 1,2%. Состояние костных структур, в том числе Th10 позвонка- прежние. С целью поддерживающей терапии было начато лечение леналидомидом в монорежиме.

Контрольные обследования выполнялись один раз в два месяца. На фоне поддерживающей терапии, на сроке +17 месяцев после ауто-ТГСК выявлено увеличение моноклональной секреции до 24,5 г/л и возобновление экскреции белка Бенс-Джонса (0,42 г/сут). В миелограмме плазматические клетки 9,2%, в трепанобиоптате картина, характеризующая субстрат ММ: гипоплазия кроветворной ткани на фоне интерстициально- очаговой (скопления по 10-20 клеток) инфильтрации плазматическими клетками со зрелой морфологией и морфологией проплазмоцитов. По данным гемограммы панцитопения: гемоглобин 89 г/л, тромбоциты  $67 \times 10^9$ /л, лейкоциты  $2,4 \times 10^9$ /л.

При этом, новых костных плазмоцитом выявлено не было, а в состоянии ранее выявляемого поражения наблюдалась положительная динамика. Так, по данным КТ грудного отдела позвоночника отмечалось уменьшение размеров плазмоцитомы Th10 более чем на 50%, снижение плотности до 10 НУ, грубое утолщение коркового слоя с сохранением единичного участка фрагментарного прерывания до 5-7 мм.

В связи с иммунохимической и костномозговой прогрессией заболевания через 1,5 года после ауто-ТГСК на фоне проводимой поддерживающей терапии, в тактику были включены препараты изатуксимаб, помалидамид, дексаметазон (схема IsaRomDex). После двух курсов достигнуто снижение моноклональной секреции G $\lambda$  до 12 г/л, экскреции белка Бенс-Джонса до следового количества, что также указывает на невозможность достижения глубокого противоопухолевого ответа.

Данный клинический пример демонстрирует сочетание повышенной экспрессии гена MAGE-C1 и высокой экспрессии белка MAGE-C1 с недостаточным противоопухолевым ответом на бортезомиб-содержащие курсы, отсутствием ответа после применения высокодозного мелфалана, развитием ранней рефрактерности к леналидомиду.

**Клинический случай 2.**

*Больная С.Н.П., 62 лет. В марте 2018 года после перенесенной вирусной инфекции в общем анализе крови было зафиксировано ускорение СОЭ до 60 мм/ч, остальные показатели гемограммы находились в пределах нормальных значений. По результатам УЗИ внутренних органов, МРТ головного мозга патологии выявлено не было. Обратилась к гематологу по месту жительства. По результатам электрофореза белков сыворотки крови выявлен М-градиент 23 г/л, в миелограмме 3,5% плазматических клеток. Биохимические показатели крови в норме. Учитывая отсутствие CRAB-синдрома, низкий уровень секреции, был установлен диагноз МГНЗ, лечение не назначалось, проводилось динамическое наблюдение.*

*При контрольном обследовании в июне 2019 года в ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России по результатам иммунохимического исследования белков сыворотки крови и мочи выявлена секреция моноклонального парапротеина  $\text{Al}$  38,1 г/л, экскреция белка Бенс-Джонса  $\lambda$ - 0,62 г/сут. Содержание  $\beta$ 2-микроглобулина составило 3,96 мг/л. В гемограмме умеренная анемия 114 г/л, лейкопения  $3,72 \times 10^9$ /л. В биохимическом анализе крови — повышение общего белка до 91 г/л (альбумин 36,4 г/л), остальные показатели в пределах нормальных значений: креатинин 69,1 мкмоль/л, кальций общий 2,42 ммоль/л, ЛДГ 233 Е/л. В миелограмме 28,8% плазматических клеток, в трепанобиоптате - крупные скопления плазматических клеток со зрелой морфологией, расположенные паратрабекулярно.*

*По данным низкодозной КТ костей скелета: признаки диффузного остеопороза, местами очаговоподобного вида. На этом фоне, в боковых отделах тела Th5 мелкий (до 3 мм) очаг разрежения костной ткани, целостность коркового слоя не нарушена. В костно- мозговых каналах больших трубчатых костей содержимое пониженной мягкотканной плотности, диффузно-узлового вида.*

*По данным МРТ всего тела: очаги измененного Mr- сигнала в С4 до 5 мм в диаметре, головке левой плечевой кости размерами 11x9мм, в задней ости правой подвздошной кости до 7мм в диаметре.*

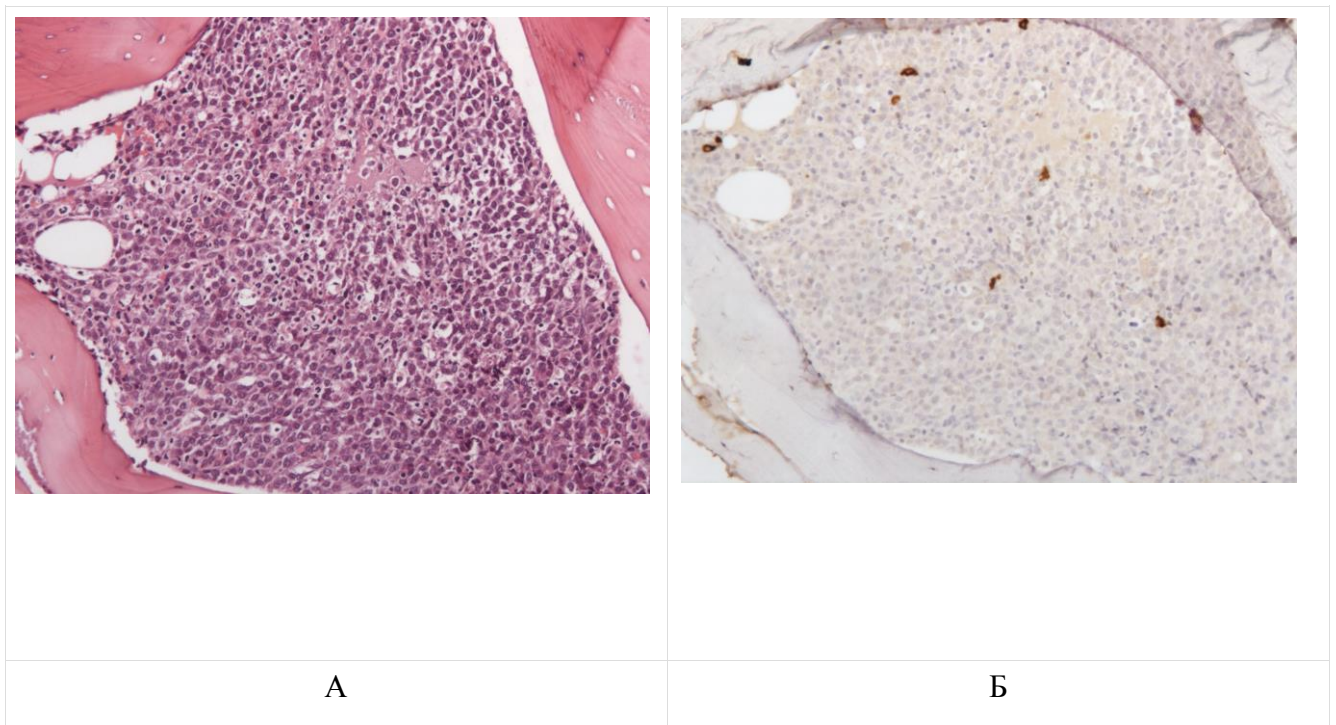
*При молекулярно-цитогенетическом исследовании (FISH) в 90% ядер выявлена транслокация (4;14)(p16;q32), делеция 13q-/моносомия 13, что соответствует высокому цитогенетическому риску.*

*Таким образом, установлен диагноз: Множественная миелома, протекающая с парапротеинемией  $\text{Al}$  и протеинурией Бенс-Джонса  $\lambda$ , диффузным остеопорозом, вовлечением костного мозга С4, головки левой плечевой кости, задней ости правой подвздошной кости, III стадия по Durie-Salmon, II стадия по ISS, II стадия по R-ISS.*

При исследовании экспрессии гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга были выявлены низкие показатели, соответствующие таковым у доноров. Так, методом ПЦР-РВ значение экспрессии гена *MAGE-C1* составило 0,002 ( $2^{\Delta Ct}$ ).

При иммуногистохимическом исследовании трепанобиоптата костного мозга наблюдали окрашивание антителом к *MAGE-C1* единичных плазматических клеток (реакция цитоплазматическая).

На рисунке 28 представлены результаты гистологического и иммуногистохимического исследования трепанобиоптата костного мозга.



**Рисунок 28.** Гистологическая и иммуногистохимическая картины трепанобиоптата костного мозга больной С.Н.П., увеличение  $\times 200$ :

А (окраска гематоксилином и эозином) — диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией;

Б (окраска антителом к *MAGE-C1*, цитоплазматическая реакция) - среди диффузного плазмноклеточного инфильтрата единичные клетки экспрессируют *MAGE-C1*.

В рамках индукционной терапии выполнено 7 курсов по схеме VCD (бортезомиб, циклофосфан, дексаметазон). После двух курсов терапии констатирован ОХЧО (моноклональная секреция А $\lambda$  в следовом количестве, экскреция белка-Бенс-Джонса не выявлена). После 5 курсов констатирован ПО заболевания.

*Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток проводилась по схеме циклофосфан 4 г/м<sup>2</sup> и Г-КСФ 5 мкг/кг. За 2 процедуры лейкафереза заготовлено 14,9х10<sup>6</sup>/кг CD34+ клеток.*

*Далее, с целью консолидации достигнутого противоопухолевого ответа, в условиях применения высокодозного мелфалана (200 мг/м<sup>2</sup>), 21.04.2020 года выполнена ауто-ТГСК, перелито 5,5х10<sup>6</sup>/кг CD34+ клеток.*

*При обследовании на сроке +100 дней после ауто-ТГСК результаты иммунохимического исследования сыворотки крови и мочи, иммунофенотипирования клеток костного мозга свидетельствовали о достижении строгого полного ответа. В течение года проводилась поддерживающая терапия леналидомидом. Пациентка находится под амбулаторным наблюдением, последнее обследование произведено на сроке +18 месяцев после ауто-ТГСК, сохраняется строгий полный ответ.*

Данный клинический случай демонстрирует стойкое достижение глубокого противоопухолевого ответа на стандартные бортезомиб-содержащие схемы терапии, у больной с низкими значениями экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1*, соответствующие таковым у здоровых доноров. Кроме того, документировано длительное сохранение строгого полного противоопухолевого ответа после всех этапов лечения (в том числе ауто-ТГСК) несмотря на выявленные в дебюте заболевания цитогенетические нарушения, классифицируемые как высокий риск.

### **8.3. Экспрессия гена *MAGE-C1* как маркер рецидива или прогрессии у больных ММ после ауто-ТГСК**

Следующим этапом работы являлась оценка вероятности развития рецидива или прогрессии у 31 больного с нормальной или повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*. В качестве индукционного этапа лечения 29 больным проводили курсы терапии с применением бортезомиба, у двух больных были использованы комбинированные схемы с применением двух таргетных препаратов (бортезомиб и леналидомид). Проведение двух линий терапии с включением леналидомид-содержащих курсов, схем с использованием химиотерапевтических препаратов (DHAP), потребовалось 13 больным.

Из 31 больного, включенного в данный этап анализа, у 11 больных экспрессия гена *MAGE-C1* была определена как нормальная - медиана  $2^{\Delta Ct}$  0,003 (0,0006-0,04), у остальных 20 документирована повышенная экспрессия исследуемого гена – медиана  $2^{\Delta Ct}$  0,4 (0,07-4,45).

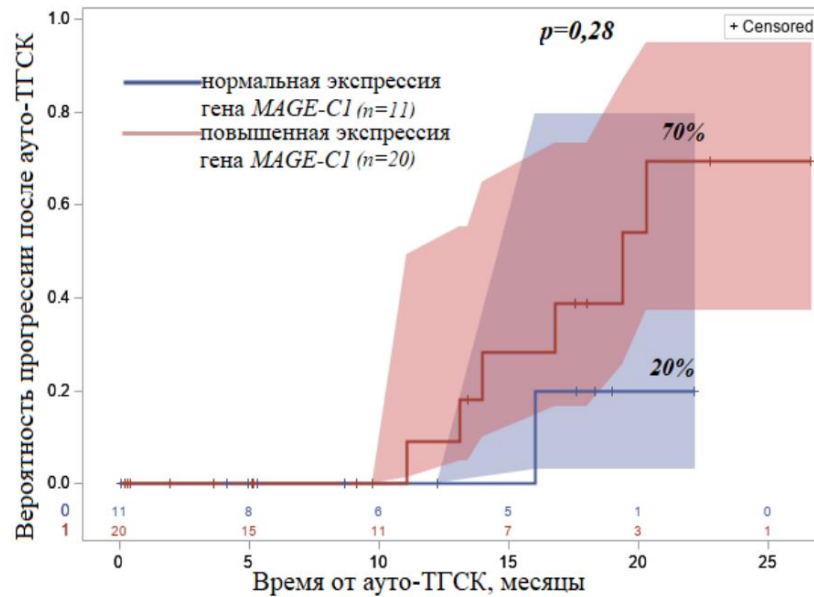
У 2 (6,5%) больных перед ауто-ТГСК противоопухолевый ответ был оценен как ПО, у 11 (35,5%) – ОХЧО, у 14 (45,1%) - ЧО, у 4 (12,9%) документирована стабилизация заболевания. В **таблице 32** представлены варианты достигнутого противоопухолевого ответа у больных ММ перед выполнением высокодозного этапа терапии в зависимости от нормальной и повышенной экспрессии гена *MAGE-C1*.

**Таблица 32.** Противоопухолевый ответ у больных с нормальной и повышенной экспрессией гена *MAGE-C1* перед выполнением ауто-ТГСК.

Экспрессия гена <i>MAGE-C1</i> (n=31)	Частота достигнутого противоопухолевого ответа перед ауто-ТГСК			
	ПО	ОХЧО	ЧО	Стабилизация
Нормальная (n=11)	9% 1/11	45,5% 5/11	36,5% 4/11	9% 1/11
Повышенная (n=20)	5% 1/20	40% 8/20	40% 8/20	15% 3/20

Таким образом, из таблицы 32 видно, что распределение больных в группах с нормальной и повышенной экспрессией исследуемого гена, относительно достигнутого противоопухолевого ответа перед выполнением ауто-ТГСК было примерно одинаковым, что позволяет рассматривать группы как сопоставимые.

На **рисунке 29** представлены результаты анализа вероятности развития рецидива после ауто-ТГСК в зависимости от экспрессии гена *MAGE-C1*.



**Рисунок 29.** Вероятность рецидива или прогрессии у больных ММ после ауто-ТГСК в зависимости от экспрессии гена *MAGE-C1*.

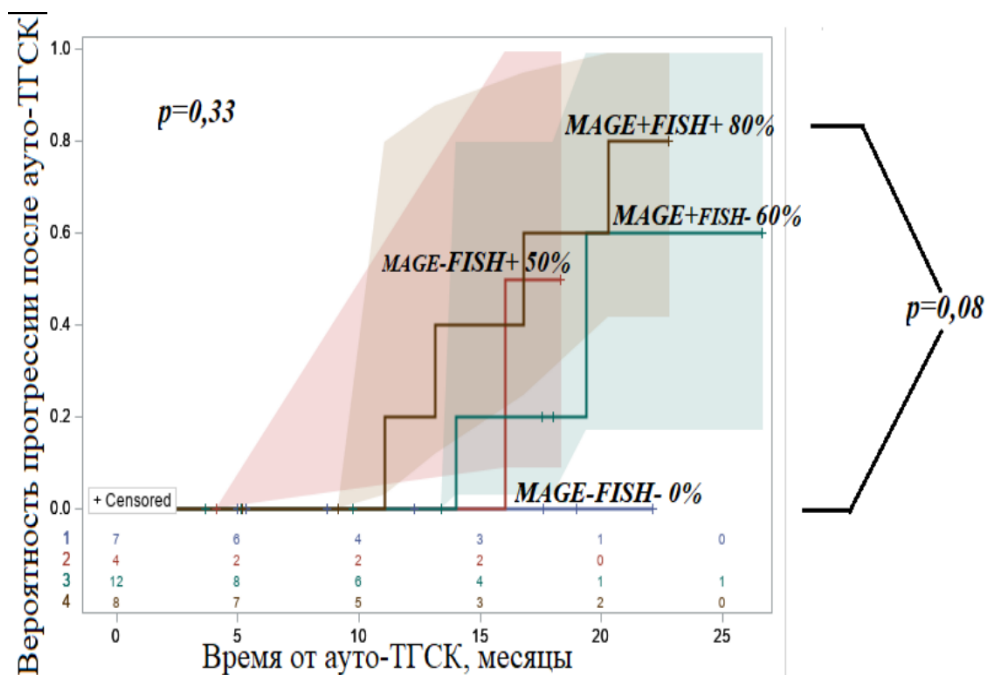
Как представлено на рисунке 29, у больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1* в течение 15 месяцев после ауто-ТГСК сохранялась ремиссия заболевания, к 20 месяцу не более чем у 20% больных констатировали развитие рецидива или прогрессии. В то же время в эти же сроки уже у 70% больных с повышенной экспрессией исследуемого гена наблюдалось развитие рецидива или прогрессии. Кроме того, в группе больных с повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*, развитие рецидива или прогрессии констатировали раньше на полгода по сравнению с больными, у которых экспрессия исследуемого гена была определена как нормальная. Таким образом, повышенная экспрессия гена *MAGE-C1* втрое увеличивает вероятность рецидива после высокодозного этапа терапии с последующей ауто-ТГСК у больных ММ, однако, достоверность полученных результатов не была подтверждена статистически ( $p=0,28$ ), вероятно, ввиду малой выборки больных.

У 19 больных, которым была выполнена ауто-ТГСК, отмечено наличие стандартного цитогенетического риска, у остальных 12 - документирован высокий цитогенетический риск. Из 12 больных с высоким цитогенетическим риском у 4 экспрессия гена *MAGE-C1* расценена как нормальная, у 8 - повышенная. Чтобы определить какой фактор имеет наибольшее влияние на вероятность развития рецидива или прогрессии у больных ММ после ауто-ТГСК, нами были определены 4 группы больных.



Первой группе больных соответствовали нормальные показатели экспрессии исследуемого гена и стандартный цитогенетический риск ( $n=7$ ), во вторую группу вошли 4 больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1* и высоким цитогенетическим риском, к третьей группе отнесены 12 больных с повышенной экспрессией гена *MAGE-C1* и стандартным риском, четвертая группа — 8 больных, включивших совокупность двух неблагоприятных признаков.

Результаты оценки вероятности рецидива или прогрессии в этих 4 группах представлены на **рисунке 30**.



**Рисунок 30.** Вероятность рецидива или прогрессии у больных ММ после ауто-ТГСК в зависимости от экспрессии гена *MAGE-C1* и цитогенетического риска.

FISH «-» — стандартный цитогенетический риск, FISH «+» — высокий цитогенетический риск, MAGE «-» - экспрессия гена *MAGE-C1* нормальная, MAGE «+» - экспрессия гена *MAGE-C1* повышенная.

На рисунке 30 представлено, что наиболее благоприятное течение заболевания наблюдалось у больных с нормальной экспрессией исследуемого гена и стандартным цитогенетическим риском, у всех больных из этой группы сохранялась ремиссия заболевания к

20 месяцам после ауто-ТГСК. В то же время, совокупность сразу двух факторов (повышенная экспрессия исследуемого гена и высокий цитогенетический риск) значимо увеличивала вероятность развития рецидива или прогрессии у больных ММ после ауто-ТГСК до 80%. Столь значительная разница на небольшой выборке больных может рассматриваться как достоверная ( $p=0,08$ ).

При этом, в рамках нашей работы, не удалось определить какой из этих факторов (повышенная экспрессия гена *MAGE-C1* или высокий цитогенетический риск) оказывает наибольшее влияние на вероятность развития рецидива или прогрессии у больных после ауто-ТГСК. Как повышенная экспрессия исследуемого гена, так и наличие цитогенетических аномалий высокого риска, одинаково влияли на развитие рецидива или прогрессии у больных ММ после ауто-ТГСК (60% и 50%, соответственно).

Множественная миелома представляет собой генетически гетерогенное заболевание, при котором сочетание нескольких геномных событий приводит к развитию гемобластоза и его прогрессированию.

Молекулярно-биологические методы, такие как иммуногистохимическое исследование, кариотипирование, флуоресцентная гибридизация *in situ*, сравнительная геномная гибридизация, ПЦР-РВ, а также секвенирование нового поколения, позволили выявить многочисленные хромосомные и генетические изменения при ММ. Многие из этих аномалий хорошо изучены в крупных исследованиях, с включением большого числа больных, и подтвердили свое влияние на течение заболевания, показатели ОВ и ВБП больных ММ. Примером таких хромосомных нарушений стали, включенные в пересмотренную систему стадирования R-ISS del 17p, t(4;14) и t(14;16) [20, 68, 102].

Разнообразие генетических нарушений лежит в основе гетерогенности множественной миеломы, обуславливая лекарственную чувствительность или устойчивость опухоли, а также широкий диапазон клинических проявлений этого заболевания [102]. Несмотря на активное изучение биологии опухоли, характеристика механизмов, ответственных за трансформацию нормальных плазматических клеток в злокачественные, все также затруднена, в связи с чем исследование патобиологических основ ММ на сегодняшний день является актуальной задачей.

Раково-тестикулярные антигены (РТА) представляют собой группу опухоле-ассоциированных антигенов, изучение которых в течение последних 15 лет позволило идентифицировать более 40 семейств [11]. Исследования, посвященные определению экспрессии РТА при разных гематологических заболеваниях, позволили выявить меланома-ассоциированный антиген MAGE-C1, наиболее часто экспрессируемый aberrантными плазматическими клетками при множественной миеломе [26, 27, 29, 31, 32, 34, 42, 87].

Немногочисленные исследования, направленные на изучение экспрессии гена, кодирующего антиген MAGE-C1, ограничены малой выборкой больных ММ, обследованных на разных этапах течения заболевания. Наша работа носит проспективный характер, в исследование включено значительное число больных (n=97) симптоматической ММ, что позволило провести подробный анализ и получить достоверные результаты. Кроме того, наличие современных лабораторных возможностей позволило реализовать исследование экспрессии изучаемого параметра тремя методами и определить сопоставимость полученных

результатов.

Результаты нашей работы позволили определить, что частота детекции повышенной экспрессии гена *MAGE-C1*, при исследовании методом ПЦР-РВ, составила 68%. Одновременно с этим, ИГХ метод позволил выявить повышенную экспрессию белка *MAGE-C1* плазматическими клетками у 73,5% больных. Эти данные согласуются с результатами работ, представленных в литературе. Так, по данным разных авторов, частота детекции экспрессии гена *MAGE-C1*, определяемая методом ПЦР-РВ, и белка *MAGE-C1*, выявляемая методом ИГХ, варьирует от 57% до 89% [11, 29, 32, 45, 93, 95, 98, 101, 103].

При этом, учитывая неоднородность показателей повышенной экспрессии исследуемых параметров, нами было произведено распределение больных на группы с промежуточной и высокой экспрессией гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1* для сопоставления результатов двух методов исследования и последующей интерпретации результатов.

В работе М. Tinguely и соавт. при детекции экспрессии белка *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга ИГХ методом была определена внутриклеточная локализация белка. У 31% больных была определена цитоплазматическая реакция с антителом к *MAGE-C1*, у 7%- ядерная и у 62% - комбинированная картина окрашивания [93]. В нашей работе также было произведено определение реакции с антителом к *MAGE-C1*. У наибольшего числа больных (78,5%) имела место цитоплазматическая реакция окрашивания, тогда как ядерно-цитоплазматическая определялась лишь у 21,5% больных.

Ранее, ни в одной из опубликованных работ не проводился анализ сопоставимости результатов двух методов при детекции экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1*. Нам удалось выявить, что при нормальных показателях экспрессии гена *MAGE-C1* никогда не определялись высокие значения экспрессии белка *MAGE-C1*, в то же время высокая экспрессия исследуемого гена всегда соответствовала повышенной экспрессии белка *MAGE-C1* ( $p=0,003$ ). Кроме того, значимые различия были определены при сравнении показателей экспрессии гена *MAGE-C1* у больных с нормальным, промежуточным и высоким уровнем исследуемого белка. Средние значения экспрессии у больных из этих групп составили:  $0,2 \pm 0,09$ ,  $0,87 \pm 0,39$  и  $2,27 \pm 0,7$  ( $2^{\Delta Ct}$ ), соответственно ( $p=0,008$ ).

Таким образом, выбранные нами методы исследования можно рассматривать как взаимозаменяемые и применять ИГХ исследование трепанобиоптатов костного мозга в случае низкой клеточности пунктата костного мозга, что может составлять трудности для выполнения ПЦР-РВ.

Исследованию экспрессии белка *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга

методом МПЦ в литературе посвящено только две работы. В этих работах анализ экспрессии белка *MAGE-C1* производили у 12 больных ММ в дебюте заболевания или на разных этапах лечения, рассматривая этот показатель как вероятный маркер мониторинга минимальной остаточной болезни [84, 101].

Задачей нашего исследования было определение экспрессии белка *MAGE-C1* плазматическими клетками методом МПЦ в дебюте заболевания. Сопоставив результаты иммунофенотипирования плазматических клеток костного мозга и результаты исследования экспрессии белка *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга, удалось подтвердить специфичность экспрессии белка *MAGE-C1* именно злокачественными плазматическими клетками.

Кроме того, была определена взаимосвязь этих показателей с числом плазматических клеток в миелограмме. Так, процентное содержание aberrантных плазматических клеток и плазматических клеток, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, у больных с числом плазматических клеток в миелограмме  $<30\%$  было достоверно ниже такового у больных с числом ПК  $\geq 30\%$  ( $p=0,009$  при анализе доли aberrантных ПК и  $p<0,0001$  при анализе доли ПК, экспрессирующих исследуемый белок).

Согласно данным мировой литературы, вопрос о наличии взаимосвязи экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1* с различными клинико-лабораторными характеристиками ММ до сих пор остается дискуссионным. Вероятно, это обусловлено немногочисленностью больных, у которых проводили анализ экспрессии исследуемых целевых показателей.

Так, в некоторых работах представлены сведения о прямой взаимосвязи экспрессии гена *MAGE-C1* или белка *MAGE-C1* с уровнем парапротеина в крови,  $\beta 2$ -микроглобулина, а также числом плазматических клеток в костном мозге [11, 45, 84, 93, 103]. Имеются данные о прямой корреляции возраста больного с уровнем экспрессии гена *MAGE-C1*, его взаимосвязи с содержанием гемоглобина и сывороточного альбумина (обратная корреляция). Однако, статистическая достоверность этих результатов не была доказана [11, 103]. В свою очередь, F. de Carvalho и соавторы, при анализе экспрессии гена *MAGE-C1* методом ПЦР-РВ у 46 больных множественной миеломой, не обнаружил какой-либо корреляции между уровнем экспрессии и клиническими характеристиками заболевания. В частности, приведены данные о том, что исследуемый ген одинаково часто определялся в образцах костного мозга независимо от стадии заболевания по ISS [32].

Результаты нашего исследования позволили выявить отличия некоторых клинико-лабораторных параметров у больных с нормальной и повышенной экспрессией гена *MAGE-C1*.

Достоверные отличия были определены в зависимости от пола пациента, наличия костных плазмоцитом и их размеров, активности лактатдегидрогеназы, содержания гемоглобина, доли плазматических клеток в костном мозге.

Было выявлено, что нормальную экспрессию исследуемого гена регистрировали у мужчин в три раза реже чем у женщин (26,6% против 73,4%),  $p=0,02$ . При этом повышенную экспрессию гена *MAGE-C1* документировали у представителей обоих полов одинаково часто.

У больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1* наличие костных плазмоцитом документировали значительно реже (33,3%) чем у больных с повышенной экспрессией исследуемого гена (57,2%),  $p=0,02$ .

Только у 10% больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1* размеры плазмоцитомы превышали 50 мм хотя бы в одном измерении в отличие от больных с повышенной экспрессией исследуемого гена, размеры костных плазмоцитом у которых превышали 50 мм в одном измерении уже в 58,3% случаев,  $p=0,006$ . При этом удалось определить, что наиболее часто (83,3%) костные плазмоцитомы размерами более 50 мм регистрировали у больных с высоким уровнем экспрессии гена *MAGE-C1*,  $p=0,01$ .

Известно, что наличие плазмоцитомы в дебюте множественной миеломы значительно снижает показатели выживаемости больных ММ [7, 55]. В то же время, факторы, способствующие развитию плазмоцитомы в настоящее время до конца не определены, открытым остается вопрос о том, могут ли геномные изменения способствовать распространению опухолевых клеток за пределы костного мозга и создавать благоприятные условия для их роста и выживания [7, 18].

Повышенные показатели активности лактатдегидрогеназы у больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1* регистрировали значимо реже (23,3%) по сравнению с больными с повышенной экспрессией исследуемого гена (47,6%),  $p=0,01$ . Распределение больных с повышенной экспрессией исследуемого гена на группы с промежуточным и высоким уровнем экспрессии позволило обнаружить, что высокая активность ЛДГ регистрировалась достоверно более чем в два раза чаще у больных с гиперэкспрессией гена (84,6% против 38%),  $p=0,0008$ .

Кроме того, была выявлена достоверная разница значений экспрессии гена *MAGE-C1* у больных с нормальной и повышенной активностью ЛДГ: медиана составила 0,09 против 0,35 ( $2^{\Delta Ct}$ ),  $p=0,001$ .

Доказано, что повышение активности ЛДГ сопровождается агрессивным течением заболевания, этот фактор выступает в качестве дополнительного признака, отражающего активность опухолевого процесса и значительно снижает продолжительность общей

выживаемости [36, 68, 92].

В нашем исследовании, как и в работах других авторов, не было выявлено значимой корреляции между детекцией экспрессии гена *MAGE-C1* и наличием комплекса цитогенетических аномалий высокого риска [11, 45, 93, 103]. Однако, удалось определить, что обнаружение del17p чаще ассоциировалось с выявлением повышенной экспрессии гена *MAGE-C1* чем нормальной (91% против 9%)  $p=0,05$ .

Одновременно с этим, обнаружено, что средние значения экспрессии гена *MAGE-C1* были достоверно ниже у больных с I-II стадиями по R-ISS по сравнению с больными, у которых была определена III стадия (0,69 против 1,77 ( $2^{\Delta Ct}$ ),  $p=0,04$ ).

Полученные результаты являются закономерными, так как в критерии пересмотренной системы стадирования R-ISS включены такие показатели как активность ЛДГ и цитогенетические аномалии высокого риска, а III стадия характеризуется высокой активностью ЛДГ и/или наличием цитогенетических аномалий высокого риска в сочетании с III стадией по ISS [68].

Анемию разной степени тяжести (содержание гемоглобина от 55 до 119 г/л) регистрировали у 90% больных с нормальной экспрессией против 60,4% больных с повышенной экспрессией исследуемого гена,  $p=0,003$ . При распределении больных на три группы в зависимости от уровня экспрессии гена, данная тенденция сохранялась,  $p=0,02$ .

Также была обнаружена взаимосвязь показателей экспрессии гена *MAGE-C1* и содержания гемоглобина. Нормальному содержанию гемоглобина соответствовали более высокие значения экспрессии исследуемого гена по сравнению с показателями экспрессии, зарегистрированными при анемии: медиана 0,26 против 0,1 ( $2^{\Delta Ct}$ ),  $p=0,02$ .

Данная закономерность может быть обусловлена следующим наблюдением. Известно, что одной из причин развития анемии при ММ может выступать плазмноклеточная инфильтрация костного мозга, угнетающая нормальный эритропоэз. В нашем исследовании у 56,6% больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1* инфильтрация костного мозга плазматическими клетками превышала 30%, у больных с повышенной экспрессией исследуемого гена такое процентное содержание плазматических клеток в миелограмме регистрировали лишь у 31,8%,  $p=0,05$ .

При сравнительном анализе клинико-лабораторных характеристик у больных с нормальной и повышенной экспрессией белка *MAGE-C1*, достоверные отличия были определены только по отношению к наличию костных плазмоцитом и их размерам.

Однако костные плазмоцитомы значимо чаще были документированы у больных с

нормальной экспрессией белка *MAGE-C1* по сравнению с больными, у которых регистрировали повышенные показатели экспрессии исследуемого белка: 77,8% против 36%,  $p=0,03$ . В то же время, распределение больных относительно размера костных плазмочитом, соответствовало тенденции, выявленной при анализе взаимосвязи клинико-лабораторных характеристик больных ММ с экспрессией гена *MAGE-C1*. У больных с нормальной экспрессией исследуемого белка костные плазмочитомы размерами более 50 мм выявлены значительно реже, чем у больных с повышенной экспрессией белка *MAGE-C1*: 28,6% против 77,8%,  $p=0,03$ .

При сопоставлении значений процентного содержания плазматических клеток костного мозга, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, определенного методом МПЦ, с клинико-лабораторными характеристиками больных ММ, удалось обнаружить взаимосвязь с нарушением почечной функции. Было продемонстрировано, что у больных с нормальной функцией почек, доля плазматических клеток, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, была достоверно ниже (медиана 3,78%), чем у больных с миеломной каст-нефропатией (медиана 18%),  $p=0,03$ .

Ранее в нашем Центре уже проводилось исследование, направленное на изучение геномных факторов, влияющих на развитие миеломной каст-нефропатии в дебюте ММ. Так, в диссертационной работе Горчаковой С.В. изучали нуклеотидные последовательности переменных регионов легких цепей иммуноглобулинов и поиск особенностей их геномной структуры у больных ММ с миеломной каст-нефропатией. Это исследование рассматривали как один из первых шагов в данном направлении, потому как имеющиеся в то время биоинформационные инструменты не позволяли изучить аномальную экспрессию генов в плазматических клетках [3].

Нами были проанализированы значения процентного содержания плазматических клеток, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, экспрессии гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга и показатели экскреции белка Бенс-Джонса у больных ММ с документированной миеломной каст-нефропатией в дебюте заболевания. Основываясь на этих параметрах, мы построили прогностические модели и выделили группы больных относительно риска развития миеломной каст-нефропатии. Группа высокого риска развития миеломной каст-нефропатии была выделена на основании высокого процентного содержания ПК ( $\geq 18\%$ ), экспрессирующих белок *MAGE-C1*, и экскреции белка Бенс-Джонса  $>0,5$  г/сут. Вероятность развития каст-нефропатии в этом случае составила 66,6%. Столь значимые отличия на немногочисленной выборке больных, можно считать достоверными,  $p=0,07$ .

Прогностическая модель, основанная на параметрах процентного содержания



плазматических клеток, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, и экспрессии гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга, позволила обнаружить, что решающим фактором, влияющим на развитие нефропатии, является не столько уровень экспрессии гена *MAGE-C1*, сколько увеличение числа плазматических клеток, экспрессирующих исследуемый белок. Как низкие, так и высокие показатели экспрессии гена *MAGE-C1*, выявленные у больных с <18% плазматических клеток, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, позволили документировать миеломную каст-нефропатию лишь в 11,1% и 13% случаев. Тогда как достоверно большее число больных ММ с документированной миеломной каст-нефропатией (80%,  $p=0,01$ ) было выявлено на фоне одновременного роста процентного содержания ПК, экспрессирующих *MAGE-C1*, и уровня экспрессии гена *MAGE-C1*.

Не смотря на высокий интерес к изучению экспрессии раково-тестикулярных антигенов при различных нозологиях, долгое время не было ни одного исследования, анализирующего экспрессию РТА на фоне терапии или после ее завершения. Результаты немногочисленных публикаций, позволяющие предположить, что экспрессия раково-тестикулярных антигенов может выступать в качестве прогностического фактора, определяющего эффективность химиотерапевтического воздействия, вызывают большой интерес. Предполагается, что экспрессия гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1* может выступать в качестве дополнительного маркера неблагоприятного течения заболевания и предиктора раннего рецидива или прогрессии ММ [11, 33, 84, 95, 101].

В мировой литературе мы не нашли работ, посвященных длительному наблюдению больных ММ, у которых определяли экспрессию гена *MAGE-C1* или белка *MAGE-C1*. Единичные работы позволили определить, что высокая экспрессия гена *MAGE-C1* снижала вероятность достижения противоопухолевого ответа и увеличивали риск развития прогрессии заболевания [11, 95].

Результаты нашего исследования позволили оценить связь экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *MAGE-C1* с риском формирования резистентности опухоли. Нормальные показатели экспрессии исследуемого гена и белка ассоциировались с более высокой вероятностью достижения общего (ПО+ОХЧО+ЧО) ответа в короткие сроки после начала специфической терапии.

У больных с нормальной экспрессией исследуемого гена вероятность достижения общего ответа составила 87,8% в среднем через 1,77 месяцев от начала терапии против 64% через 3,6 месяцев в группе больных с повышенной экспрессией ( $p=0,03$ ). При этом распределение больных в зависимости от уровня экспрессии гена *MAGE-C1*, позволило определить, что

наименьшая вероятность достижения общего ответа наблюдалась в группе больных с высоким уровнем экспрессии исследуемого гена и составила 58,3%. У больных с промежуточным уровнем экспрессии вероятность достижения ответа была чуть выше и соответствовала 66%. Медиана времени достижения общего ответа у больных с промежуточным уровнем экспрессии возрасала до 3,44 месяца, а у больных с высоким уровнем экспрессии до 4,22 месяца,  $p=0,09$ .

Кроме того, выявлено, что значения экспрессии гена *MAGE-C1* в дебюте ММ были достоверно ниже у больных, достигших общего ответа, и составили 0,15 ( $2^{\Delta Ct}$ ) против 0,27 ( $2^{\Delta Ct}$ ) у больных с рефрактерным к бортезомибу течением заболевания,  $p=0,05$ .

Оценка вероятности достижения общего ответа у больных с нормальным и повышенными показателями экспрессии белка *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга, определенными методом ИГХ, не позволила получить достоверные результаты. Вероятно, это обусловлено малым объемом выборки больных. Однако, удалось показать, что достижение общего ответа регистрировали у всех больных с нормальной экспрессией исследуемого белка уже к 5 месяцам от начала терапии, у больных с промежуточной экспрессией — у 90% к этому же сроку, тогда как при высокой экспрессии белка *MAGE-C1* только 70% больных достигали общий ответ,  $p=0,55$ .

Многочисленными клиническими исследованиями доказано, что применение высокодозного мелфалана с последующей ауто-ТГСК у больных ММ способствует достижению более глубокого противоопухолевого ответа, увеличению продолжительности ОБ и ВВП [21, 66, 281].

В мировой литературе мы не нашли работ, посвященных оценке показателей выживаемости больных ММ после ауто-ТГСК в зависимости от экспрессии гена *MAGE-C1*. Только в исследовании D. Atanaskovic и соавт. приведены результаты оценки вероятности развития рецидива или прогрессии у больных после алло-ТГСК в зависимости от показателей экспрессии исследуемого гена. Вероятность развития рецидива или прогрессии после алло-ТГСК была достоверно выше у больных с высоким уровнем экспрессии гена *MAGE-C1* и составила 75% к 14 месяцам против 7% у больных с нормальной экспрессией исследуемого гена к 41 месяцу наблюдения после алло-ТГСК,  $p<0,001$  [11].

Убедительные результаты были получены нами при оценке вероятности развития рецидива или прогрессии у больных после ауто-ТГСК с нормальной и повышенной экспрессией гена *MAGE-C1* в дебюте заболевания. Удалось определить, что вероятность рецидива или прогрессии у больных с повышенной экспрессией исследуемого гена в течение 20 месяцев после ауто-ТГСК составила 70%, тогда как у больных с нормальной экспрессией гена *MAGE-C1*

к этому же сроку наблюдения - 20%,  $p=0,28$ .

Одновременно с этим, вероятность развития рецидива или прогрессии существенно возрастала у больных с наличием повышенной экспрессии гена *MAGE-C1* и высоким цитогенетическим риском и составила 80%, тогда как у всех больных с нормальной экспрессией исследуемого гена и стандартным цитогенетическим риском сохранялась ремиссия заболевания к практически двум годам наблюдения после ауто-ТГСК,  $p=0,08$ .

Представляется важным продолжить наблюдение этой группы больных. Возможно, более длительный период наблюдения и большее число больных, включенных в представленный этап анализа, позволит подтвердить выявленную зависимость в этих двух группах.

## Заключение

Результаты исследований, направленные на изучение экспрессии генов, кодирующих раково-тестикулярные антигены, до сих пор не позволяют однозначно ответить на вопросы о биологической роли экспрессии гена *MAGE-C1* как в зародышевой линии, так и в плазматических клетках при множественной миеломе.

Выполненная работа посвящена изучению экспрессии гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1 плазматическими клетками костного мозга у больных ММ. Актуальность темы подтверждается многочисленными публикациями в литературе, посвященными поиску патобиологических механизмов, ответственных за трансформацию нормальных плазматических клеток в злокачественные и способствующих развитию заболевания.

Результаты проведенного исследования продемонстрировали возможность рассматривать экспрессию гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1 в качестве дополнительного фактора, влияющего на клиническое течение множественной миеломы.

Доказано, что риск формирования ререфрактерности опухоли к бортезомиб-содержащим схемам терапии ассоциирован с повышенной экспрессией гена *MAGE-C1* и белка MAGE-C1.

Показано, что наличие повышенной экспрессии гена *MAGE-C1* осложняет течение ММ, повышая вероятность рецидива или прогрессии после ауто-ТГСК.

Полученные нами данные диктуют необходимость дальнейших исследований в этом направлении в целях получения более достоверных результатов и определения исследуемых параметров как возможных предикторов, помогающих определить персонифицированную тактику терапии уже на этапе индукции.

1. Определено, что в дебюте множественной миеломы повышенная экспрессия гена *MAGE-C1* плазматическими клетками костного мозга выявляется методом ПЦР-РВ у 68% больных, а экспрессия белка *MAGE-C1* методом ИГХ – у 73,5% больных. Методом проточной цитометрии подтверждено, что экспрессия внутриядерного белка *MAGE-C1* присутствует в 95-100% aberrантных плазматических клеток.

2. Показано, что высокая экспрессия гена *MAGE-C1* по сравнению с нормальной достоверно чаще ассоциируется с наличием костных плазмоцитом крупных размеров (83,3% против 10%,  $p=0,001$ ), повышенной активностью ЛДГ (84,6% против 23,3%,  $p=0,0008$ ), низким (<30%) содержанием плазматических клеток в миелограмме (69,2% против 43,4%,  $p=0,02$ ), наличием del 17p (91% против 9%,  $p=0,05$ ). При этом достоверная взаимосвязь высокой экспрессии белка *MAGE-C1* обнаружена только с наличием крупных (более 50 мм) костных плазмоцитом (100% против 28,6%,  $p=0,02$ ).

3. Доказано, что при одновременном повышении уровня экспрессии гена *MAGE-C1* и содержания плазматических клеток, экспрессирующих белок *MAGE-C1*, вероятность развития миеломной каст-нефропатии у больных с выявленной экскрецией белка Бенс-Джонса возрастает до 80% ( $p=0,01$ ).

4. Показано, что высокая экспрессия гена *MAGE-C1* ассоциируется с достоверным снижением вероятности достижения общего ответа на бортезомиб-содержащие схемы индукционной терапии (64% против 87,8%), а также с увеличением в 2 раза медианы времени достижения общего ответа (3,6 против 1,77 месяцев),  $p=0,03$ .

5. Определено, что повышенная экспрессия гена *MAGE-C1* в сочетании с высоким цитогенетическим риском увеличивает вероятность рецидива или прогрессии после выполнения ауто-ТГСК по сравнению с нормальной экспрессией и стандартным цитогенетическим риском (80% против 0%,  $p=0,08$ ).

**Список используемых сокращений**

- алло-ТГСК- трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток  
ауто-ТГСК – трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток  
ВБП – выживаемость без прогрессирования  
ВХТ – высокодозная химиотерапия  
ДИ – доверительный интервал  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ИФТ – иммунофенотипирование  
ИГХ - иммуногистохимия  
КТ – компьютерная томография  
ЛДГ – лактатдегидрогеназа  
МГНЗ – моноклональная гаммапатия неясного значения  
ММ – множественная миелома  
МРТ – магнитно-резонансная томография  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
МПЦ – мультипараметрическая проточная цитофлуориметрия  
ОВ – общая выживаемость  
ОХЧО – очень хороший частичный ответ  
ОШ – отношение шансов  
ПК – плазматические клетки  
ПКЛ – плазмноклеточный лейкоз  
ПР – полный ответ  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени  
РТА – раково-тестикулярный антиген  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
ПЭТ/КТ – позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией  
СЛЦ – свободные легкие цепи  
ЧР – частичный ответ  
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты  
VAGE/CT2 - V melanoma antigen/cancer testis 2  
bFGF – basic fibroblast growth factor - фактор роста фибробластов  
BCR – В-клеточный рецептор

CD – кластер дифференцировки

CRAB – гиперкальциемия, почечная недостаточность, анемия, поражение костей

FISH – флюоресцентная гибридизация in situ

GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа

Ig - иммуноглобулин

IMWG – международная рабочая группа по изучению множественной миеломы (International Myeloma Working Group)

MAGE-A1/CT1 - melanoma antigen gene family member A1/cancer testis 1

MAGE C1/CT7 - melanoma antigen gene family member C1/cancer testis 7

NF-κB – nuclear factor kappa B – ядерный фактор каппа В

IKBKG - inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma - ингибитор гамма-субъединицы киназы ядерного фактора каппа-В

IRAK1 - interleukin-1 receptor-associated kinase 1  
киназа, ассоциированная с рецептором интерлейкина-1

ISS – международная система стадирования ММ

R-ISS – обновленная международная система стадирования ММ

SUVmax - standard uptake volume - максимальное стандартизированное значение накопления радиофармпрепарата

TNFα – tumor necrosis factor alpha – фактор некроза опухоли альфа

VEGF – vascular endothelial growth factor - фактор роста эндотелия сосудов

VISTA - Velcade as Initial Standard Therapy in Multiple Myeloma

Курсы терапии:

CRD- циклофосфан, леналидомид, дексаметазон

DHAP – дексаметазон, цисплатин, цитарабин

MP - мелфалан, преднизолон

MPT – мелфалан, преднизолон, талидомид

Rd – леналидомид, дексаметазон

RVD – леналидомид, бортезомиб, дексаметазон

TAD - талидомид, доксорубицин, дексаметазон

VAD – винкристин, доксорубицин, дексаметазон

VCD – бортезомиб, циклофосфан, дексаметазон

VD – бортезомиб, дексаметазон

VMP - бортезомиб, мелфалан, преднизолон

**Список литературы**

1. Бессмельцев С. С. Множественная миелома (лечение первичных больных): обзор литературы и собственные данные. Часть II // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2013. – Т. 6. – №. 4.
2. Гальцева И. В. Исследование минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитофлуориметрии у больных множественной миеломой после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток / И.В. Гальцева, Л.П. Менделеева, Ю.О. Давыдова, М. В. Соловьев, Н. М. Капранов, Л.А. Кузьмина, Е.О. Грибанова, Т.В. Гапонова, В.Г. Савченко // Онкогематология. – 2017 – Т.12 – 62-69 с.
3. Горчакова С. В. Структура вариабельного региона легких цепей иммуноглобулинов в патогенезе миеломной нефропатии: дис. – Федеральное государственное бюджетное учреждение "Гематологический научный центр" / Горчакова С. В. - Москва, 2011. - 108 с.
4. Каприн А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (Заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова – 2018. – 250с.
5. Менделеева Л. П. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению множественной миеломы / Менделеева Л.П., Вотякова О.М., Покровская О.С., Рехтина И.Г., Дарская Е.И., Гальцева И.В., Капланов К.Д., Моторин Д.В., Самойлова О.С., Семочкин С.В., Скворцова Н.В., Соловьев М.В., Урнова Е.С., Савченко В.Г. // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т. 61. – №. 1. – С. 1-24.
6. Соловьев М. В. Детекция и мониторинг минимальной остаточной болезни после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой: дис. – Национальный медицинский исследовательский центр гематологии / Соловьев М. В. - Москва, 2018. - 136 с.
7. Фирсова М. В. Особенности множественной миеломы, протекающей с костными и экстрамедуллярными плазмочитомами / Фирсова М.В., Менделеева Л.П., Ковригина А.М., Покровская О.С., Соловьев М. В., Нарейко М.В., Дейнеко Н.Л., Костина И.Э., Кузьмина Л.А., Грибанова Е.О., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. // Гематология и трансфузиология. – 2017. – Т. 62. – №. 2. – С. 75-82.



8. Adams J. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents / Adams, J., Palombella, V. J., Sausville, E. A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D. D., Maas J., Pien Ch. S., Prakash S., Elliott, P. J. // *Cancer research*. – 1999. – T. 59. – №. 11. – C. 2615-2622.

9. Andrade V. C. C. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients / Andrade, V. C., Vettore, A. L., Felix, R. S., Almeida, M. S., de Carvalho, F., de Oliveira, J. S. R., Ferrari Chauffaille, M.L.L., Andriolo, A., Caballero, O. L., Zago M. A., Colleoni, G. W // *Cancer immunity*. – 2008. – T. 8. – №. 1.

10. Antoine-Pepeljugoski C. Management of newly diagnosed elderly multiple myeloma patients / Antoine-Pepeljugoski C., Braunstein M. J. // *Current Oncology Reports*. – 2019. – T. 21. – №. 7. – C. 1-11.

11. Atanackovic D. Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma / Atanackovic, D., Luetkens, T., Hildebrandt, Y., Arfsten, J., Bartels, K., Horn, C., Stahl, T., Cao, Y., Zander, A.R., Bokemeyer, C., Kröger, N. // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – T. 15. – №. 4. – C. 1343-1352.

12. Bahlis N. J. Darwinian evolution and tiding clones in multiple myeloma // *Blood*. – 2012. – T. 120. – №. 5. – C. 927-928.

13. Balaton B. P. The eXceptional nature of the X chromosome / Balaton, B. P., Dixon-McDougall, T., Peeters, S. B., Brown, C. J. // *Human molecular genetics*. – 2018. – T. 27. – №. R2. – C. R242-R249.

14. Barakat T. S. X chromosome inactivation in the cycle of life / Barakat T. S., Gribnau J. // *Development*. – 2012. – T. 139. – №. 12. – C. 2085-2089.

15. Barlogie B. High-dose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma / Barlogie, B., Alexanian, R., Dicke, K. A., Zagars, G., Spitzer, G., Jagannath, S., Horwitz, L. // *Blood*. – 1987. – T. 70. – №. 3. – C. 869-872.

16. Bergsagel P. L. Molecular classification and risk stratification of myeloma / Bergsagel P. L., Chesi M. V. // *Hematological oncology*. – 2013. – T. 31. – №. 0 1. – C. 38.

17. Biomarkers Definitions Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred

definitions and conceptual framework / Atkinson Jr, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Zeger, S. L. // *Clinical pharmacology & therapeutics*. – 2001. – T. 69. – №. 3. – C. 89-95.

18. Bladé J. Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach / Bladé, J., Fernandez de Larrea, C., Rosinol, L., Cibeira, M. T., Jiménez, R., Powles, R. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2011. – T. 29. – №. 28. – C. 3805-3812.

19. Brown C. J. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus / Brown, C. J., Hendrich, B. D., Rupert, J. L., Lafreniere, R. G., Xing, Y., Lawrence, J., Willard, H. F // *Cell*. – 1992. – T. 71. – №. 3. – C. 527-542.

20. Cardona-Benavides I. J. Genetic abnormalities in multiple myeloma: prognostic and therapeutic implications / Cardona-Benavides I. J., de Ramón C., Gutiérrez N. C. // *Cells*. – 2021. – T. 10. – №. 2. – C. 336.

21. Cavo M. Autologous stem cell transplantation versus bortezomib-melphalan-prednisone for newly diagnosed multiple myeloma: second interim analysis of the phase 3 EMN02/HO95 study / Cavo, M., Hájek, R., Pantani, L., Beksac, M., Oliva, S., Dozza, L., Johnsen, H.E., Petrucci, M.T., Mellqvist, U., Conticello, C., Driessen, C., Marzocchi, G., Dimopoulos, M.A., Zweegman, S., Wu, K.L., Gamberi, B., Grippa, C., der Holt, B., Offidani, M., Wester, R., Vincelli, I.D., Troia, R., Cornelisse, P., Boccadoro, M., Sonneveld, P // *Blood*. – 2017. – T. 130. – C. 397.

22. Cavo M. International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation / Cavo, M., Rajkumar, S. V., Palumbo, A., Moreau, P., Orłowski, R., Bladé, J., Sezer, O., Ludwig, H., Dimopoulos, M.A., Attal, M., Sonneveld, P., Boccadoro, M., Anderson, K.C., Richardson, P.G., Bensinger, W., Johnsen, H.E., Kröger, N., Gahrton, G., Bergsagel, P.L., Vesole, D.H., Einsele, H., Jagannath, S., Niesvizky, R., Durie, B.G.M., San Miguel, J., Lonial, S. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2011. – T. 117. – №. 23. – C. 6063-6073.

23. Chen Y. T. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening / Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Türeci, Ö., Gure, A. O., Tsang,

S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., Old, L. J. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94. – №. 5. – C. 1914-1918.

24. Chen Y. T. Expression of cancer testis antigen CT45 in classical Hodgkin lymphoma and other B-cell lymphomas / Chen, Y. T., Chadburn, A., Lee, P., Hsu, M., Ritter, E., Chiu, A., Gnjatic, S., Pfreundschuh, M., Knowles, D. M., Old, L. J. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – T. 107. – №. 7. – C. 3093-3098.

25. Chen Y. T. Identification of cancer/testis-antigen genes by massively parallel signature sequencing / Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Venditti, C. A., Chua, R., Theiler, G., Stevenson, B. J., Iseli, C., Gure, A.O., Vasicek, T., Strausberg, R.L., Jongeneel, C.V., Old, L.J., Simpson, A. J. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – T. 102. – №. 22. – C. 7940-7945.

26. Chen Y. T. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library / Chen, Y. T., Güre, A. O., Tsang, S., Stockert, E., Jäger, E., Knuth, A., Old, L. J. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – T. 95. – №. 12. – C. 6919-6923.

27. Cho H. J. Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6) / Cho, H. J., Caballero, O. L., Gnjatic, S., Andrade, V. C., Colleoni, G. W., Vettore, A. L., Outtz, H.H., Fourtunato, S., Altorki, N., Ferrera, C.A., Chua, R., Jungbluth, A.A., Chen, Y.T., Old, L.J., G Simpson, A. J. // Cancer immunity. – 2006. – T. 6. – №. 1.

28. Clark C. A. Prospective trial of minimal residual disease assessment by multiparametric flow cytometry for multiple myeloma in the era of bortezomib-based chemotherapy / Clark, C. A., Mosse, C. A., Chen, H., Byrne, M., Chinratanalab, W., Engelhardt, B. G., Goodman, S.A., Harrell, S.L., Kassim, A.A., Savani, B.N., Sengsayadeth, S., Jagasia, M., Cornell, R. F. // Bone Marrow Transplantation. – 2018. – T. 53. – №. 12. – C. 1589-1592.

29. Condomines M. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis / Condomines, M., Hose, D., Raynaud, P., Hundemer, M., De Vos, J., Baudard, M., Moehler, T., Pantesco, V., Moos, M., Schved, J., Rossi, J., Reme, T., Goldschmidt, H., Klein, B. // The Journal of Immunology. – 2007. – T. 178. – №. 5. – C. 3307-3315.

30. Cornell R. F. Evolving paradigms in the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma:

increased options and increased complexity / Cornell R. F., Kassim A. A. //Bone marrow transplantation. – 2016. – T. 51. – №. 4. – C. 479-491.

31. De Carvalho F. Cancer/Testis Antigen MAGE-C1/CT7: new target for multiple myeloma therapy / De Carvalho F., Vettore A. L., Colleoni G. W. B. //Clinical and Developmental Immunology. – 2012. – T. 2012.

32. De Carvalho F. MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 are frequently expressed in multiple myeloma and can be explored in combined immunotherapy for this malignancy / de Carvalho, F., Alves, V. L., Braga, W. M., Xavier, C. V., Colleoni, G. W //Cancer Immunology, Immunotherapy. – 2013. – T. 62. – №. 1. – C. 191-195.

33. De Carvalho F. Targeting MAGE-C1/CT7 expression increases cell sensitivity to the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma cell lines / Carvalho, F. D., Costa, E. T., Camargo, A. A., Gregorio, J. C., Masotti, C., Andrade, V. C., Strauss, B.E., Caballero, O.L., Atanackovic, D., Colleoni, G. W. //PloS one. – 2011. – T. 6. – №. 11. – C. E27707.

34. De Plaen E. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family / De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C., Brasseur, R. //Immunogenetics. – 1994. – T. 40. – №. 5. – C. 360-369.

35. Dhodapkar M. V. et al. Expression of cancer/testis (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease / Dhodapkar, M. V., Osman, K., Teruya-Feldstein, J., Filippa, D., Hedvat, C. V., Iversen, K., Kolb, D., Geller, M.D., Hassoun, H., Kewalramani, T., Comenzo, R.L., Coplan, K., Chen, Y.T., Jungbluth, A. A. //Cancer Immunity. – 2003. – T. 3. – №. 1.

36. Dimopoulos M. A. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma / Dimopoulos, M. A., Barlogie, B., Smith, T. L., & Alexanian, R. //Annals of internal medicine. – 1991. – T. 115. – №. 12. – C. 931-935.

37. Facon T. Final analysis of survival outcomes in the phase 3 FIRST trial of up-front treatment for multiple myeloma / Facon, T., Dimopoulos, M. A., Dispenzieri, A., Catalano, J. V., Belch, A., Cavo, M., Pinto, A., Weisel, K., Ludwig, H., Bahlis, N.J., Banos, A., Tiab, M., Delforge, M.,

Cavenagh, J.D., Geraldles, C., Lee, J., Chen, C., Oriol, A., De La Rubia, J., White, D., Binder, D., Lu, J., Anderson, K.C., Moreau, P., Attal, M., Perrot, A., Arnulf, B., Qiu, L., Roussel, M., Boyle, E., Manier, S., Mohty, M., Avet-Loiseau, H., Leleu, X., Eryin-Haynes, A., Chen, G., Houck, V., Benboubker, L., Hulin, C. //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2018. – T. 131. – №. 3. – C. 301-310.

38. Fayers P. M. Thalidomide for previously untreated elderly patients with multiple myeloma: meta-analysis of 1685 individual patient data from 6 randomized clinical trials / Fayers, P. M., Palumbo, A., Hulin, C., Waage, A., Wijermans, P., Beksac, M., Bringhen, S., Mary, J.Y., Gimsing, P., Termorshuizen, F., Haznedar, R., Caravita, T., Moreau, F., Turesson, I., Musto, P., Benboubker, L., Schaafama, M., Sonneveld, P., Facon, T., Turkish Myeloma Study Group, Hemato-Oncologie voor Volwassenen Nederland, Intergroupe Francophone du Myélome, and European Myeloma Network.//Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2011. – T. 118. – №. 5. – C. 1239-1247.

39. Furukawa Y., Molecular pathogenesis of multiple myeloma / Furukawa Y., Kikuchi J. //International journal of clinical oncology. – 2015. – T. 20. – №. 3. – C. 413-422.

40. González D. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma / González, D., van der Burg, M., García-Sanz, R., Fenton, J. A., Langerak, A. W., González, M., van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., Morgan, G. J. //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2007. – T. 110. – №. 9. – C. 3112-3121.

41. Greipp P. R. International staging system for multiple myeloma / Greipp, P. R., Miguel, J. S., Durie, B. G., Crowley, J. J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Avet-Loiseau, H.,Обезболивающий эффект достигнут Kyle, R.A., Lahuerta, J.J., Ludwig, G., Powles, K., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I., Westin, J. //Journal of clinical oncology. – 2005. – T. 23. – №. 15. – C. 3412-3420.

42. He L. Expression of cancer-testis antigen in multiple myeloma / He, L., Ji, J. N., Liu, S. Q., Xue, E., Liang, Q., Ma, Z. //Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]. – 2014. – T. 34. – №. 2. – C. 181-185.

43. Inaoka R. J. Cancer/testis antigens expression and autologous serological response in a set of Brazilian non-Hodgkin's lymphoma patients / Inaoka, R. J., Jungbluth, A. A., Gnjatic, S., Ritter, E.,

Hanson, N. C., Frosina, D., Tassello, J., Etto, L.Y., Bortoluzzo, A.B., Alves, A.C., Colleoni, G. W. //Cancer Immunology, Immunotherapy. – 2012. – T. 61. – №. 12. – C. 2207-2214.

44. Jäger N. Hypermutation of the inactive X chromosome is a frequent event in cancer / Jäger, N., Schlesner, M., Jones, D. T., Raffel, S., Mallm, J. P., Junge, K. M., Weichenhan, D., Bauer, T., Ishaque, N., Korshunov, A., Drews, R.M., Koster, J., Versteeg, R., Richter, J., Hummel, M., Mack, S.C., Taylor, M.D., Witt, H., Swartman, B., Schulte-Bockholt, D., Sultan, M., Yaspo, M.L., Lehrach, H., Hutter, B., Brors, B., Wolf, S., Plass, C., Siebert, R., Trumpp, A., Rippe, K., Lehmann, I., Lichter, P., Pfister, S.M., Kool, M., Northcott, P.A., Eils, R. //Cell. – 2013. – T. 155. – №. 3. – C. 567-581.

45. Jungbluth A. A. The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation / Jungbluth, A. A., Ely, S., DiLiberto, M., Niesvizky, R., Williamson, B., Frosina, D., Chen, Y.T., Bhardwaj, N., Chen-Kiang, S., Old, L.J., Cho, H. J. //Blood. – 2005. – T. 106. – №. 1. – C. 167-174.

46. Kumar S. K. Multiple myeloma / Kumar S. K., Rajkumar V., Kyle R.A. van Duin M., Sonneveld P., Mateos M.V., Gay F., Anderson K.C. //Nature Reviews Disease Primers. – 2017. – T. 3. – №. 1. – C. 1-20.

47. Kumar S. Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma / Kumar, S., Flinn, I., Richardson, P. G., Hari, P., Callander, N., Noga, S. J., Stewart, A.K., Turturro, F., Rifkin, R., Wolf, J., Estevam, J., Mulligan G, Shi H, Webb IJ Rajkumar, S. V. //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2012. – T. 119. – №. 19. – C. 4375-4382.

48. Kyle R. A. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma / Kyle, R. A., Remstein, E. D., Therneau, T. M., Dispenzieri, A., Kurtin, P. J., Hodnefield, J. M., Larson, D.R., Plevak, M.F., Jelinek, D.F., Fonseca, R., Melton, L.J., Rajkumar, S. V. //New England Journal of Medicine. – 2007. – T. 356. – №. 25. – C. 2582-2590.

49. Kyle R. A. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management / Kyle, R. A., Durie, B. G. M., Rajkumar, S. V., Landgren, O., Bladé, J., Merlini, G., Kröger N, Einsele H, Vesole DH, Dimopoulos M, San Miguel J, Avet-Loiseau H, Hajek R, Chen WM, Anderson KC, Ludwig H, Sonneveld P, Pavlovsky S, Palumbo A,

Richardson PG, Barlogie B, Greipp P, Vescio R, Turesson I, Westin J, Boccadoro, M. //Leukemia. – 2010. – T. 24. – №. 6. – C. 1121-1127.

50. Kyle R. A. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma / Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.E., Therneau, T.M., Greipp, P. R. //Mayo Clinic Proceedings. – Elsevier, 2003. – T. 78. – №. 1. – C. 21-33.

51. Lahuerta J. J. Influence of pre-and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival / Lahuerta, J. J., Mateos, M. V., Martínez-López, J., Rosinol, L., Sureda, A., de la Rubia, J., García-Laraña J, Martínez-Martínez R, Hernández-García MT, Carrera D, Besalduch J, de Arriba F, Ribera JM, Escoda L, Hernández-Ruiz B, García-Frade J, Rivas-González C, Alegre A, Bladé J, San Miguel, J. F. //Journal of Clinical Oncology. – 2008. – T. 26. – №. 35. – C. 5775-5782.

52. Landgren O. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis / Landgren O., Weiss B. M. //Leukemia. – 2009. – T. 23. – №. 10. – C. 1691-1697.

53. Larocca A. First-line therapy with either bortezomib-melphalan-prednisone or lenalidomide-dexamethasone followed by lenalidomide for transplant-ineligible multiple myeloma patients: a pooled analysis of two randomized trials / Larocca, A., Mina, R., Offidani, M., Liberati, A. M., Ledda, A., Patriarca, F., Evangelista, A., Spada, S., Benevolo, G, Oddolo, D., Innao, V., Cangiolosi, C., Bernardini, A., Musto, P., Amico, V., Fraticelli, V., Paris, L., Giuliani, N., Pia Falcone, A., Zambello, R., De Paoli, L., Romano, A., Palumbo, A., Montefusco, V., Hajek, R., Boccadoro, M., Bringhen, S. //Haematologica. – 2020. – T. 105. – №. 4. – C. 1074.

54. Lim S. H. Expression of testicular genes in haematological malignancies / Lim, S. H., Austin, S., Owen-Jones, E., Robinson, L. //British journal of cancer. – 1999. – T. 81. – №. 7. – C. 1162-1164.

55. Lonial S. How I treat high-risk myeloma / Lonial S., Boise L. H., Kaufman J. //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2015. – T. 126. – №. 13. – C. 1536-1543.

56. Lucas S. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by

representational difference analysis / Lucas, S., De Smet, C., Arden, K. C., Viars, C. S., Lethé, B., Lurquin, C., Boon, T. //Cancer research. – 1998. – T. 58. – №. 4. – C. 743-752.

57. Mateos M. V. Management of multiple myeloma in the newly diagnosed patient / Mateos M. V., San Miguel J. F. //Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book. – 2017. – T. 2017. – №. 1. – C. 498-507.

58. Mateos M. V. Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015 / Mateos, M. V., Ocio, E. M., Paiva, B., Rosiñol, L., Martínez-López, J., Bladé, J., Lahuerta, J.J, García-Sanz R, San Miguel, J. F. //Blood Reviews. – 2015. – T. 29. – №. 6. – C. 387-403.

59. Mateos M. V. Sequential vs alternating administration of VMP and Rd in elderly patients with newly diagnosed MM / Mateos, M. V., Martínez-López, J., Hernández, M. T., Ocio, E. M., Rosiñol, L., Martínez, R., Teruel AI, Gutiérrez NC, Martín Ramos ML, Oriol A, Bargay J, Bengoechea E, González Y, Pérez de Oteyza J, Gironella M, Encinas C, Martín J, Cabrera C, Paiva B, Cedena MT, Puig N, Bladé J, Lahuerta JJ, San-Miguel, J. //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2016. – T. 127. – №. 4. – C. 420-425.

60. Medina A. Molecular profiling of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements unveils new potential prognostic markers for multiple myeloma patients / Medina, A., Jiménez, C., Sarasquete, M. E., González, M., Chillón, M. C., Balanzategui, A., Prieto-Conde I, García-Álvarez M, Puig N, González-Calle V, Alcoceba M, Cuenca I, Barrio S, Escalante F, Gutiérrez NC, Gironella M, Hernández MT, Sureda A, Oriol A, Bladé J, Lahuerta JJ, San Miguel JF, Mateos MV, Martínez-López J, Calasanz MJ, García-Sanz, R. //Blood cancer journal. – 2020. – T. 10. – №. 2. – C. 1-12.

61. Mitsiades N. et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications / Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P. G., Hideshima, T., Munshi NC, Treon SP, Anderson, K. C. //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2002. – T. 99. – №. 12. – C. 4525-4530.

62. Moreau P. Frontline therapy of multiple myeloma / Moreau P., Attal M., Facon T. //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2015. – T. 125. – №. 20. – C. 3076-3084.

63. Morgan G. J. The genetic architecture of multiple myeloma / Morgan G. J., Walker B. A., Davies F. E. //Nature Reviews Cancer. – 2012. – T. 12. – №. 5. – C. 335-348.



64. Nowell P. C. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations: Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression / Nowell P. C. //Science. – 1976. – T. 194. – №. 4260. – C. 23-28.

65. Ocio E. M. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG) / Ocio, E. M., Richardson, P. G., Rajkumar, S. V., Palumbo, A., Mateos, M. V., Orłowski, R., S. Kumar, S. Usmani, D. Roodman, R. Niesvizky, H. Einsele, K. C. Anderson, M. A. Dimopoulos, H. Avet-Loiseau, U-H Mellqvist, I. Turesson, G. Merlini, R. Schots, P. McCarthy, L. Bergsagel C. S. Chim, J. J. Lahuerta, J. Shah, A. Reiman, J. Mikhael, S. Zweegman, S. Lonial, R. Comenzo, W. J. Chng, P. Moreau, P. Sonneveld, H. Ludwig, B. G. M. Durie, Miguel, J. F. S. //Leukemia. – 2014. – T. 28. – №. 3. – C. 525-542.

66. Palumbo A. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma / Palumbo, A., Cavallo, F., Gay, F., Di Raimondo, F., Ben Yehuda, D., Petrucci, M. T., Pezzatti, S., Caravita, T., Cerrato, C., Ribakovskiy, E., Genuardi, M., Cafro, A., Marcatti, M., Catalano, L., Offidani, M., Carella, A. M., Zamagni, E., Patriarca, F., Musto, P., Evangelista, A., Ciccone, G., Omedé, P., Crippa, C., Corradini, P., Nagler, A., Boccadoro, M., Cavo, M //New England Journal of Medicine. – 2014. – T. 371. – №. 10. – C. 895-905.

67. Palumbo A. International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation / Palumbo, A., Rajkumar, S. V., San Miguel, J. F., Larocca, A., Niesvizky, R., Morgan, G., Landgren, O., Hajek, R., Einsele, H., Anderson, K.C., Dimopoulos, M. A., Richardson, P. G., Cavo, M., Spencer, A., Stewart, A. K., Shimizu, K., Lonial, S., Sonneveld, P., Durie, Brian G.M., Moreau, P., Orłowski, R. Z. //Journal of clinical oncology. – 2014. – T. 32. – №. 6. – C. 587.

68. Palumbo A. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group / Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Richardson, P., Caltagirone, S., Lahuerta, J.J., Facon, T., Bringhen, S., Gay, F., Michel Attal, M., Passera, R., Spencer, A., Offidani, M., Kumar, S., Musto, P., Lonial, S., Maria T. Petrucci, Orłowski, R. Z., Zamagni, E., Morgan, G., Dimopoulos, M. A., Durie, Brian G.M., Anderson, K.C., Sonneveld, P., San Miguel, J. F., Cavo, M., Moreau, P. //Journal of clinical oncology. – 2015. – T. 33. – №. 26. – C. 2863.

69. Paszekova H. High-risk multiple myeloma: different definitions, different outcomes? / Paszekova, H., Kryukov, F., Kubiczikova, L., Hajek, R., Sevcikova, S. //Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. – 2014. – T. 14. – №. 1. – C. 24-30.
70. Prideaux S. M. The genetic architecture of multiple myeloma / Prideaux S. M., Conway O'Brien E., Chevassut T. J. //Advances in hematology. – 2014. – T. 2014.
71. Rajkumar S. V. et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma //Blood. – 2005. – T. 106. – №. 13. – C. 4050-4053.
72. Rajkumar S. V., Kumar S. Multiple myeloma: diagnosis and treatment //Mayo Clinic Proceedings. – Elsevier, 2016. – T. 91. – №. 1. – C. 101-119.
73. Rajkumar S. V. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk- stratification, and management //American Journal of Hematology. – 2014. – T. 89. – №. 10. – C. 998-1009.
74. Rajkumar S. V. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma //The lancet oncology. – 2014. – T. 15. – №. 12. – C. e538-e548.
75. Rajkumar S. V. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma //The lancet oncology. – 2014. – T. 15. – №. 12. – C. e538-e548.
76. Rajkumar S. V. et al. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group //Journal of clinical oncology. – 2006. – T. 24. – №. 3. – C. 431-436.
77. Richardson P. G. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2007. – T. 110. – №. 10. – C. 3557-3560.
78. Rizzieri D. Metabolic alterations and the potential for targeting metabolic pathways in the treatment of multiple myeloma / Rizzieri D., Paul B., Kang Y. //Journal of cancer metastasis and treatment. – 2019. – T. 5.
79. San Miguel J. F. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple

myeloma / San Miguel, J. F., Schlag, R., Khuageva, N. K., Dimopoulos, M. A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoiloa OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson, P. G. //New England Journal of Medicine. – 2008. – T. 359. – №. 9. – C. 906-917.

80. San Miguel J. F. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma / San Miguel, J. F., Schlag, R., Khuageva, N. K., Dimopoulos, M. A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoiloa OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Delforge M, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Deraedt W, Cakana A, van de Velde H, Richardson, P. G //Journal of clinical oncology. – 2012.

81. Scanlan M. J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary / Scanlan M. J., G Simpson A. J., Old L. J. //Cancer immunity. – 2004. – T. 4. – №. 1.

82. Schafer P. H. Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs / Schafer, P. H., Gandhi, A. K., Loveland, M. A., Chen, R. S., Man, H. W., Schnetkamp, P. P., Wolbring, G., Govinda, S., Corral, L. G., Pavvandi, F., Muller. G. W., Stirling, D. I //Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2003. – T. 305. – №. 3. – C. 1222-1232.

83. Scott E. C. Staging systems for newly diagnosed myeloma patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation: the Revised International Staging System shows the most differentiation between groups / Scott, E. C., Hari, P., Kumar, S., Fraser, R., Davila, O., Shah, N., Gale RP, Diaz MA, Agrawal V, Cornell RF, Ganguly S, Akpek G, Freytes C, Hashmi S, Malek E, Kamble RT, Lazarus H, Solh M, Usmani SZ, Kanate AS, Saad A, Chhabra S, Gergis U, Cerny J, Kyle RA, Lee C, Kindwall-Keller T, Assal A, Hildebrandt GC, Holmberg L, Maziarz RT, Nishihori T, Seo S, Kumar S, Mark T, D'Souza, A. //Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2018. – T. 24. – №. 12. – C. 2443-2449.

84. Shires K. Cancer testis antigen MAGE C1 can be used to monitor levels of circulating malignant stem cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients / Shires K., Wienand K. //Journal of cancer research and clinical oncology. – 2016. – T. 142. – №. 11. – C. 2383-2396.

85. Shires K. The role of Cancer/Testis Antigens in Multiple Myeloma pathogenesis and their

application in disease monitoring and therapy / Shires K., Van Wyk T. //Critical reviews in oncology/hematology. – 2018. – T. 132. – C. 17-26.

86. Siegel R. L. Cancer statistics, 2015 / Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. //CA: a cancer journal for clinicians. – 2015. – T. 65. – №. 1. – C. 5-29.

87. Simpson A. J. G. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer / Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T., & Old, L. J. //Nature Reviews Cancer. – 2005. – T. 5. – №. 8. – C. 615-625.

88. Sirohi B. Single-center results of 200 mg/m<sup>2</sup> melphalan and autograft in 451 myeloma patients: identifying patients with prolonged survival based upon albumin and B2-microglobulin at transplant / Sirohi, B., Powles, R., & Mehta, J. //Program and abstracts of the American Society of Clinical Oncology 38th Annual Meeting. – 2002. – C. 1072.

89. Sneyd M. J. Trends in myeloma incidence, mortality and survival in New Zealand (1985–2016) / Sneyd M. J., Cox B., Morison I. M. //Cancer Epidemiology. – 2019. – T. 60. – C. 55-59.

90. Sticca T. Genomic studies of multiple myeloma reveal an association between X chromosome alterations and genomic profile complexity / Sticca, T., Caberg, J. H., Wenric, S., Poulet, C., Herens, C., Jamar, M., Josse C, El Guendi S, Max S, Beguin Y, Gothot A, Caers J, Bours, V //Genes, Chromosomes and Cancer. – 2017. – T. 56. – №. 1. – C. 18-27.

91. Stetler- Stevenson M. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition / Stetler- Stevenson, M., Paiva, B., Stoolman, L., Lin, P., Jorgensen, J. L., Orfao, A., Van Dongen J, Rawstron, A. C. //Cytometry Part B: Clinical Cytometry. – 2016. – T. 90. – №. 1. – C. 26-30.

92. Terpos E. High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international myeloma staging system even in the era of novel agents / Terpos, E., Katodritou, E., Roussou, M., Pouli, A., Michalis, E., Delimpasi, S., Parcharidou A, Kartasis Z, Zomas A, Symeonidis A, Viniou NA, Anagnostopoulos N, Economopoulos T, Zervas K, Dimopoulos MA; Greek Myeloma Study Group, Greece //European journal of haematology. – 2010. – T. 85. – №. 2. – C. 114-119.

93. Tinguely M. et al. MAGE- C1/CT- 7 expression in plasma cell myeloma: sub- cellular

localization impacts on clinical outcome / Tinguely, M., Jenni, B., Knights, A., Lopes, B., Korol, D., Rousson, V., Curioni Fontecedro A, Cogliatti SB, Bittermann AG, Schmid U, Dommann-Scherrer C, Maurer R, Renner C, Probst-Hensch NM, Moch H, Knuth A, Zippelius, A //Cancer science. – 2008. – T. 99. – №. 4. – C. 720-725.

94. Traversari C. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E / Traversari, C., van der Bruggen, P., Luescher, I. F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen E, Amar-Costesec A, Boon T. //The Journal of experimental medicine. – 1992. – T. 176. – №. 5. – C. 1453-1457.

95. Tyler E. M. Cancer–Testis Antigen 7 Expression and Immune Responses Following Allogeneic Stem Cell Transplantation for Multiple MyelomaCT7 Expression and Immune Responses in Multiple Myeloma / Tyler, E. M., Jungbluth, A. A., Gnjjatic, S., O'Reilly, R. J., Koehne, G. //Cancer immunology research. – 2014. – T. 2. – №. 6. – C. 547-558.

96. Usmani S. Z. Defining and treating high-risk multiple myeloma / Usmani, S. Z., Rodriguez-Otero, P., Bhutani, M., Mateos, M. V., & Miguel, J. S. //Leukemia. – 2015. – T. 29. – №. 11. – C. 2119-2125.

97. Van der Bruggen P. et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma / van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth A, Boon, T. //Science. – 1991. – T. 254. – №. 5038. – C. 1643-1647.

98. Van Duin M. et al. Cancer testis antigens in newly diagnosed and relapse multiple myeloma: prognostic markers and potential targets for immunotherapy / van Duin, M., Broyl, A., de Knecht, Y., Goldschmidt, H., Richardson, P. G., Hop, W. C., van der Holt B, Joseph-Pietras D, Mulligan G, Neuwirth R, Sahota SS, Sonneveld, P //Haematologica. – 2011. – T. 96. – №. 11. – C. 1662.

99. Wallington-Beddoe C. T. Prognostic and predictive biomarker developments in multiple myeloma / Wallington-Beddoe C. T., Mynott R. L. //Journal of Hematology & Oncology. – 2021. – T. 14. – №. 1. – C. 1-15.

100. Weisel K. A systematic literature review and network meta-analysis of treatments for patients with untreated multiple myeloma not eligible for stem cell transplantation / Weisel, K.,

Doyen, C., Dimopoulos, M., Yee, A., Lahuerta, J. J., Martin, A., Travers K, Druyts E, Toor K, Abildgaard N, Lu J, Van Droogenbroeck J, Geraldès C, Petrini M, Voillat L, Voog E, Facon, T //Leukemia & lymphoma. – 2017. – T. 58. – №. 1. – C. 153-161.

101. Wienand K. The use of MAGE C1 and flow cytometry to determine the malignant cell type in multiple myeloma / Wienand K., Shires K //PLoS One. – 2015. – T. 10. – №. 3. – C. E0120734.

102. Ziogas D. C. Prognostic factors for multiple myeloma in the era of novel therapies / Ziogas D. C., Dimopoulos M. A., Kastritis E. //Expert review of hematology. – 2018. – T. 11. – №. 11. – C. 863-879.

103. Zhang Y. The clinical value of the quantitative detection of four cancer-testis antigen genes in multiple myeloma / Zhang, Y., Bao, L., Lu, J., Liu, K. Y., Li, J. L., Qin, Y. Z., Chen H, Li LD, Kong Y, Shi HX, Lai YY, Liu YR, Jiang B, Chen SS, Huang XJ, Ruan, G. R //Molecular cancer. – 2014. – T. 13. – №. 1. – C. 1-8.

104. Miltenyi Biotec. Available at: <http://www.miltenyibiotec.com>. Accessed February 1, 2018.

105. [https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/m-mlv-reverse-transcriptase-protocol.pdf?rev=9e0bafab791145b9928f4231d4b6eacf&sc\\_lang=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/m-mlv-reverse-transcriptase-protocol.pdf?rev=9e0bafab791145b9928f4231d4b6eacf&sc_lang=en)

106. [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)

*Приложение 1. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов костного мозга у больных симптоматической ММ в дебюте заболевания.*

№	Пол, возраст, инициалы	Порядковый номер в исследовании	Гистологическое исследование	Иммуногистохимическое исследование	
				% ПК, экспрессирующих белок MAGE-C1	Локализация белка MAGE-C1
1	М, 46 О.Д.В.	ММ196	Плазматические клетки со зрелой морфологией расположены разрозненно в виде множественных скоплений меж- и паратрабекулярно	<1	-
2	М, 55 Л.С.В.	ММ198	Интерстициально-диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией, рассеянными среди элементов миелопоэза	<1	-
3	М, 56 Н.Д.Е.	ММ204	Зрелые плазматические клетки в несколько увеличенном количестве расположены интерстициально разрозненно, по 2-5 клеток и периваскулярно	<1	-
4	Ж, 57, Г.Н.А	ММ207	Диффузный пролиферат из плазматических клеток со зрелой морфологией, часть – с морфологией проплазматитов, на некотором протяжении отмечаются скопления плазмобластов, встречаются фигуры митозов.	<1	цитоплазматическая

## Продолжение приложения 1.

5	Ж, 62 С.Н.П.	ММ208	Крупные скопления из плазматических клеток со зрелой морфологией среди элементов гемопоэза, расположенные паратрабекулярно	<1	-
6	М, 65, Б.А.А.	ММ210	Интерстициальная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией и их небольшие скопления	<1	-
7	Ж, 63, К.Е.С.	ММ212	Плазматические клетки со зрелой морфологией, расположенные интерстициально разрозненно и в виде множественных небольших скоплений, расположенных меж- и паратрабекулярно	<1	-
8	Ж, 58, К.М.М.	ММ232	Интерстициальная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией, расположенные разрозненно и в виде множественных небольших скоплений до 25 клеток среди элементов миелопоэза, меж- и паратрабекулярно	<1	-
9	М, 56, Х.Б.В.	ММ236	Интерстициально-очаговая инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией, расположенным меж- и паратрабекулярно	<1	ядерно-цитоплазматическая
10	М, 60 К.Л.А.	ММ193	Интерстициально рассеянные и образующие скопления плазматические клетки со зрелой морфологией	> 1 - < 50	ядерно-цитоплазматическая



## Продолжение приложения 1.

11	Ж, 62 А.У.Ш.	ММ195	Интерстициально рассеянные и образующие скопления плазматические клетки со зрелой морфологией	>1 - <50	цитоплазматическая
12	Ж, 65 П.Е.Г.	ММ199	Очаговая инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>1 - <50	цитоплазматическая
13	М, 50 И.А.А.	ММ203	Интерстициальная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией, расположенные разрозненно меж- и паратрабекулярно	>1 - <50	ядерно-цитоплазматическая
14	Ж, 58 Щ.Е.А	ММ213	Интерстициально-очаговая инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>1 - <50	ядерно-цитоплазматическая
15	М, 48 А.Т.А.	ММ220	Интерстициально-очаговая инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>1 - <50	цитоплазматическая
16	Ж, 65 А.И.М.	ММ223	Интерстициальная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией и их крупные скопления	>1 - <50	цитоплазматическая
17	М, 68 В.В.А.	ММ225	Интерстициально-очаговая инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>1 - <50	цитоплазматическая
18	Ж, 42 Е.Н.А.	ММ226	Интерстициально-диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>1 - <50	ядерно-цитоплазматическая

## Продолжение приложения 1.

19	М, 63 К.Г.Ю.	MM228	Интерстициально рассеянные и образующие скопления плазматические клетки со зрелой морфологией	>1 - <50	цитоплазматическая
20	М, 57 В.А.Н.	MM239	Интерстициально рассеянные и образующие скопления плазматические клетки со зрелой морфологией	>1 - <50	цитоплазматическая
21	Ж, 52 К.С.И.	MM192	Интерстициально-очаговая инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая
22	М, 47 С.Д.В.	MM201	Скопления плазматических клеток со зрелой морфологией расположенные меж- и паратрабекулярно	>50	ядерно-цитоплазматическая
23	М, 42 С.Ю.Л.	MM214	Интерстициальная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая
24	Ж, 48 В.Б.М.	MM217	Интерстициальная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией и их крупные скопления	>50	цитоплазматическая
25	Ж, 47 Т.Е.А.	MM218	Интерстициально-диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая
26	М, 57 Т.С.В.	MM219	Крупноочаговая инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая
27	Ж, 67 А.О.А.	MM221	Интерстициально-диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая

## Продолжение приложения 1.

28	М, 35 П. А.А.	ММ222	Интерстициально рассеянные и образующие мелкие скопления плазматические клетки со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая
29	Ж, 63 В.О.Н.	ММ229	Интерстициально рассеянные и образующие разного размера скопления плазматические клетки со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая
30	М, 68 А.Ю.А.	ММ230	Интерстициально рассеянные плазматические клетки со зрелой морфологией и их крупные скопления, расположенные меж- и паратрабекулярно	>50	цитоплазматическая
31	М, 60 А.Г.В.	ММ235	Интерстициально-диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая
32	Ж, 68 К.Н.Ф.	ММ238	Интерстициально-диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая
33	Ж, 55 А.О.Ю.	ММ240	Интерстициально-диффузная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией	>50	цитоплазматическая
34	М, 66 Ц.И.Е.	ММ241	Интерстициальная инфильтрация плазматическими клетками со зрелой морфологией и их разного размера скопления	>50	цитоплазматическая