

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2025-20-4-81-91>



Мутации в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* в опухолевых клетках различной локализации и их влияние на результаты лечения больных множественной миеломой

М.В. Соловьева, М.В. Соловьев, И.А. Якутик, Б.В. Бидерман, А.В. Попова, Н.В. Рисинская, Е.Е. Никулина, Т.Н. Обухова, А.Б. Судариков, Л.П. Менделеева

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

Контакты: Майя Валерьевна Соловьева solomaiia@yandex.ru

Введение. Множественная миелома (ММ) – генетически сложное заболевание, при котором различающиеся аберрации могут определяться в опухоли различной локализации. Влияние мутаций в генах RAS-ERK-каскада на течение ММ, несмотря на множество публикаций, неясно.

Цель исследования – оценить мутации в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* в опухолевой свободно циркулирующей ДНК в плазме и CD138⁺-клетках костного мозга и проанализировать результаты терапии больных ММ на разных этапах в зависимости от мутационного статуса генов MAP-киназ.

Материалы и методы. В проспективное одноцентровое исследование с сентября 2021 г. по декабрь 2024 г. включены 100 пациентов (45 мужчин и 55 женщин) с впервые диагностированной ММ в возрасте 29–83 лет (медиана – 55 лет): 41 пациент без плазмочитом, 59 – с плазмочитомами. Диагноз устанавливали в соответствии с критериями Международной рабочей группы по миеломе – 2014. Индукционную терапию выполняли по бортезомибсодержащим программам, противоопухолевый ответ оценивали согласно критериям Международной рабочей группы по миеломе – 2016. У всех пациентов исследование мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* проводили на образцах ДНК CD138⁺-клеток костного мозга, у 81 больного – в опухолевой свободно циркулирующей ДНК в плазме. Результаты исследования подвергали статистической обработке с помощью программы MedCalc, также применяли критерий Фишера. Анализ выживаемости проведен методом Каплана–Майера с оценкой статистической значимости *log-rank*-тестом.

Результаты. Частота выявления мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* в свободно циркулирующей ДНК и/или костном мозге во всей группе составила 50 %. Частота выявления мутаций в генах MAP-киназ у больных с плазмочитомами и без таковых была сопоставима. Разницы в частоте обнаружения цитогенетических аберраций высокого риска в группах больных с мутациями в генах RAS-ERK-каскада и без таковых не выявлено. Замечена тенденция к меньшей частоте достижения полной ремиссии после индукционного этапа лечения у больных с мутированным статусом генов по сравнению с пациентами без мутаций в генах MAP-киназ (17 % против 41 %; $p = 0,07$). В контрольные сроки после аутологичной трансплантации тенденция сохранилась: у больных с мутациями в генах MAP-киназ в 2 раза реже достигался глубокий противоопухолевый ответ по сравнению с пациентами, гены которых не были мутированы (30 % против 59,5 %; $p = 0,051$). Вероятность 2-летней выживаемости без прогрессирования больных с мутированным статусом генов MAP-киназ была статистически значимо ниже ($p < 0,05$) и составила 62 % против 92 % для больных без мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*.

Заключение. Ввиду сложной генетической структуры и пространственной анатомической гетерогенности ММ исследование опухоли различной локализации является крайне актуальным. При обнаружении мутаций в генах MAP-киназ параметры противоопухолевого ответа на различных этапах терапии хуже, а вероятность выживаемости без прогрессирования статистически значимо ниже, чем у больных без мутаций в этих генах.

Ключевые слова: множественная миелома, гены *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, жидкостная биопсия, свободно циркулирующая ДНК в плазме, плазмочитома

Для цитирования: Соловьева М.В., Соловьев М.В., Якутик И.А. и др. Мутации в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* в опухолевых клетках различной локализации и их влияние на результаты лечения больных множественной миеломой. Онкогематология 2025;20(4):81–91.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2025-20-4-81-91>

KRAS, NRAS, BRAF genes mutations in tumor cells of various localizations and their impact on the treatment outcomes of patients with multiple myeloma

M.V. Soloveva, M.V. Solovev, I.A. Yakutik, B.V. Biderman, A.V. Popova, N.V. Risinskaya, E.E. Nikulina, T.N. Obukhova, A.B. Sudarikov, L.P. Mendeleeva

National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zыkovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Contacts: Maya Valerevna Soloveva solomaia@yandex.ru

Background. Multiple myeloma (MM) is a genetically complex disease in which different aberrations can be determined in tumors of different localizations. The impact of mutations in the RAS-ERK pathway genes on the MM course, despite numerous publications, is unclear.

Aim. To evaluate mutations in the *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* genes in plasma free circulating tumor DNA and CD138⁺ bone marrow cells and to analyze therapy results of MM patients at different stages depending on MAP kinase genes mutational status.

Materials and methods. A prospective single-center study from September 2021 to December 2024 included 100 patients (45 men and 55 women) with newly diagnosed MM aged 29 to 83 years (median 55 years), 41 patients without plasmacytomas and 59 with plasmacytomas. The diagnosis was established in accordance with International Myeloma Working Group – 2014 criteria. Induction therapy was performed according to bortezomib-containing programs; the antitumor response was assessed according to International Myeloma Working Group – 2016 criteria. Analysis of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* genes mutations on DNA samples of CD138⁺ bone marrow cells was performed in all patients, in free circulating tumor DNA – in 81 patients. Statistical analysis was performed using the MedCalc program, and the Fisher criterion was also used. Survival analysis was performed using the Kaplan–Meier method, with statistical significance assessed using the *log-rank* test.

Results. The frequency of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* genes mutations in free circulating tumor DNA and/or bone marrow in the total group was 50 %. The detection frequency of MAP kinase genes mutations in patients with and without plasmacytomas was comparable. No differences in detection frequency of high-risk cytogenetic aberrations were found in groups of patients with RAS-ERK pathway genes mutations and without them. A tendency towards a lower frequency of achieving complete remission after induction therapy was noted in patients with mutated gene status compared to patients without MAP kinase genes mutations (17 % versus 41 %; $p = 0.07$). At control time points after auto-transplantation, the trend remained: patients with MAP kinase genes mutations achieved a deep antitumor response 2 times less often compared to patients without mutations (30 % versus 59.5 %; $p = 0.051$). The probability of two-year progression-free survival of patients with MAP kinase genes mutations was significantly lower ($p < 0.05$) – 62 % versus 92 % for patients without *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* genes mutations.

Conclusion. Due to the complex genetic structure and spatial anatomical heterogeneity of MM, the study of various localization tumors is extremely relevant. When mutations in the MAP kinase genes are detected, the antitumor response at various therapy stages is worse, and the probability of progression-free survival is significantly lower than in patients without mutations in these genes.

Keywords: multiple myeloma, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* genes, liquid biopsy, plasma free circulating tumor DNA, plasmacytoma

For citation: Soloveva M.V., Solovev M.V., Yakutik I.A. et al. *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* genes mutations in tumor cells of various localizations and their impact on the treatment outcomes of patients with multiple myeloma. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2025;20(4):81–91. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2025-20-4-81-91>

Введение

При множественной миеломе (ММ) существует феномен пространственно-временной гетерогенности опухолевых клонов. Различающиеся генетические нарушения одновременно могут наблюдаться в опухоли различной локализации у одного больного, а по мере прогрессирования появляются новые субклоны, отличающиеся от предкового клона [1, 2]. В рутинной практике применяется цитогенетическое исследование костного мозга для определения группы риска ММ. Однако с учетом анатомической гетерогенности ММ и сложной генетической структуры опухоли результаты исследования одного образца костного мозга в ряде случаев не могут предоставить исчерпывающую, достоверную информацию. Так, в практике врача-гематолога нередко встречаются пациенты с ММ группы

стандартного цитогенетического риска, при этом не удается достичь глубокого противоопухолевого ответа, несмотря на смену линий терапии и высокодозные методы.

В этом аспекте становится актуальной разработка нового или дополнительного диагностического инструмента для уточнения группы риска, которым может стать жидкостная биопсия. В ее основе лежит анализ опухолевой ДНК, свободно циркулирующей в плазме (сцДНК). Метод не является новым, однако в последние годы интерес к нему возрастает. Роль жидкостной биопсии при ММ требует уточнения. Изучается применение сцДНК в плазме для прогнозирования ММ, оценки минимальной остаточной болезни. В 2018 г. опубликованы результаты исследования, в котором сопоставлялись парные образцы опухоли

(сцДНК в плазме и костный мозг) 42 больных ММ для определения минимальной остаточной болезни. Показано, что только в 49 % случаев результаты минимальной остаточной болезни совпали в сцДНК в плазме и костном мозге, при этом наиболее частое расхождение заключалось в неопределяемой резидуальной болезни в плазме при наличии минимальной остаточной болезни в образцах костного мозга [3]. Использование дополнительных молекулярных мишеней, вероятно, позволит улучшить применимость метода [4, 5]. Существуют препятствия для применения жидкостной биопсии. Исследования опухолевой сцДНК обладают определенными ограничениями, обусловленными особенностью ее метаболизма. До внедрения в широкую практику необходима стандартизация используемых методов исследования сцДНК. Пока исследование сцДНК при ММ носит поисковый характер, однако вполне вероятно применение жидкостной биопсии в будущем для решения прикладных задач.

Несмотря на внедрение в практику новых таргетных противоопухолевых препаратов, бурно развивающиеся клеточные технологии, высокодозную терапию, ММ остается неизлечимым заболеванием и неуклонно прогрессирует в большинстве случаев. Недостаточно изученными остаются механизмы развития химиорезистентности опухоли и патогенез плазмочитомы. Санация костного мозга при одновременной резистентности плазмочитомы к проводимой терапии — частая проблема, обусловленная клональной анатомической гетерогенностью миеломы. Продолжается изучение aberrантных сигнальных путей, которые способствуют прогрессированию опухоли. При наличии точки приложения становится оправданной попытка применения препаратов, обычно не используемых для лечения ММ. Так, при гиперэкспрессии BCL-2 у больных с t(11;14) используется венетоклакс, в случае активации пути JAK2 — руксолитиниб, при мутациях в генах сигнального пути RAS (*BRAF* V600E) осуществляются попытки применения вемурафениба. Активно изучаются иные сигнальные пути — NF-κB и PI3K/mTOR, продолжается поиск новых потенциальных мишеней для таргетного воздействия [6]. Поскольку гены *KRAS/NRAS/BRAF* являются участниками пути MAPK, обсуждается вопрос применения у больных ММ и с мутациями в этих генах ингибиторов MAPK в сочетании с иммуномодулирующими препаратами [7–9]. Исследованию мутаций в генах *KRAS, NRAS, BRAF* посвящено множество работ, однако интерес к их изучению не ослабевает [10]. Данные относительно влияния мутаций в генах RAS-ERK-каскада на течение болезни, представленные в литературе, противоречивы [10–12].

Цель исследования — изучение мутаций в генах *KRAS, NRAS, BRAF* в опухолевой сцДНК в плазме и костном мозге у больных впервые диагностированной ММ и анализ результатов терапии в зависимости от статуса генов.

Материалы и методы

В одноцентровое проспективное исследование с сентября 2021 г. по ноябрь 2024 г. включены 100 пациентов (45 мужчин и 55 женщин) с впервые диагностированной ММ в возрасте 29–83 лет (медиана — 55 лет): 41 пациент без плазмочитомы, 59 — с плазмочитомами. Диагноз устанавливали в соответствии с критериями Международной рабочей группы по миеломе — 2014. Индукционную терапию выполняли по бортезомиб-содержащим программам, противоопухолевый ответ оценивали согласно критериям Международной рабочей группы по миеломе — 2016. Кандидатами на трансплантацию аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) являлись 57 пациентов, не являлись кандидатами 43 больных. Результаты исследования подвергали статистической обработке с помощью программы MedCalc. Анализ выживаемости проводили методом Каплана–Майера с оценкой статистической значимости *log-rank*-тестом. Анализ таблиц сопряженности выполнен с использованием двустороннего критерия Фишера для оценки значимости.

Проведена позитивная иммуномагнитная селекция CD138⁺-клеток костного мозга с использованием моноклонального антитела к CD138 (STEMCELL Technologies, Канада) согласно протоколу производителя. Выполнено исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* CD138⁺-клеток с использованием ДНК-зондов для выявления транслокаций 14q32/IgH, 8q24/MYC, делеций 17p13/TP53, 13q14, 1p32, амплификации 1q21 и множественных трисомий (Wuhan HealthCare Biotechnology, Китай). При обнаружении t(4;14), t(14;16), del17p13, амплификации 1q21 больного относили к группе высокого цитогенетического риска.

У 100 пациентов молекулярно-генетическое исследование проводили на геномной ДНК, выделенной из образцов CD138⁺-клеток костного мозга, у 81 пациента дополнительно исследованы образцы опухолевой сцДНК в плазме. Мутации в генах *KRAS* и *NRAS* изучали методом высокопроизводительного секвенирования (MiSeq, Illumina, США) с подтверждением находок методом секвенирования по Сэнгеру (Нанофор 05, ЗАО «Синтол», Россия). Мутацию *BRAF* V600E определяли методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени (CFX96 Touch, Bio-Rad, США).

Результаты

Характеристика больных, включенных в исследование, представлена в табл. 1. У 59 % пациентов отмечены плазмочитомы в дебюте ММ. Превалировали костные плазмочитомы — 88 % наблюдений; экстрамедуллярные плазмочитомы отмечены у 3 % пациентов; еще в 9 % случаев обнаружено сочетание 2 типов плазмочитомы.

Цитогенетическое исследование костного мозга выполнено 98 пациентам, у половины определены цитогенетические aberrации высокого риска.

Таблица 1. Характеристика больных множественной миеломой (n = 100)

Table 1. Characteristics of multiple myeloma patients (n = 100)

Параметр Parameter	Значение Value
Медиана возраста (диапазон), лет Median age (range), years	55 (29–83)
Мужчины/женщины, n Males/females, n	45/55
Тип секретиции, %: Type of secretion, %:	
G	61
A	20
VJ	15
D	4
Тип свободной легкой цепи, %: Free light chain type, %:	
κ	59
λ	41
Стадия по Durie–Salmon, %: Durie–Salmon stage, %:	
IA, IB	7
IIA	17
IIIA	59
IIIB	16
Не определена Not available	1
Стадия по Международной системе стадирования (n = 69), %: International Staging System stage (n = 69), %:	
I	45
II	29
III	26
Медиана концентрации гемоглобина (диапазон), г/л Median hemoglobin concentration (range), g/L	110 (66–156)
Медиана содержания лактатдегидрогеназы (диапазон), Е/л Median lactate dehydrogenase level (range), U/L	173 (65–694)
Медиана концентрации плазматических клеток в миелограмме (диапазон), % Median plasma cells concentration in bone marrow aspiration (range), %	16 (2–47,6)
Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (n = 98), n (%): Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (n = 98), n (%):	
стандартный риск standard risk	46 (47)
высокий риск high risk	52 (53)
Наличие плазмочитом, n (%): Plasmacytomas, n (%):	
есть: yes:	59 (59)
костные bone	52 (88)
экстрamedулярные extramedullary	2 (3)
костные и экстрamedулярные bone and extramedullary	5 (9)
нет no	41 (41)

Частота выявления мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* в сДНК и/или костном мозге во всей группе составила 50 % (50 из 100). Мутация в гене *KRAS* определена у 19 (19 %) больных, в гене *NRAS* – у 17 (17 %), в гене *BRAF* – у 10 (10 %). В 4 % случаев подтверждено наличие одновременно 2 мутаций в различных генах. Мы проанализировали частоту цитогенетических аберраций высокого риска в 2 группах больных – с мутациями в генах MAP-киназ и без таковых. Из 98 пациентов с выполненным цитогенетическим исследованием у 50 больных выявлялись мутации в генах MAP-киназ в каком-либо локусе опухоли, у 48 больных гены не были мутированы. В группе с мутациями в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* высокий риск зафиксирован у 48 % (24 из 50) пациентов, в группе без мутаций аберрации высокого риска встречались в 58 % (28 из 48) случаев.

Частота выявления мутаций в генах MAP-киназ в каком-либо из опухолевых локусов у больных с плазмочитомы и без таковых была сопоставима и составила 53 % (31 из 59) и 42 % (17 из 41) соответственно.

Парные образцы опухоли (CD138⁺-клетки костного мозга и сДНК в плазме) проанализированы у 81 пациента с ММ, у 49 больных с плазмочитомы и у 32 без плазмочитом. У больных с плазмочитомы статистически значимо чаще выявлялись мутации в опухолевой сДНК в плазме по сравнению с пациентами без плазмочитом (24,5 % против 6,3 %; $p = 0,03$). Так, мутации в генах MAP-киназ в опухолевой сДНК обнаружены у 12 из 49 больных группы с плазмочитомы и только у 2 из 32 пациентов без плазмочитом (табл. 2).

Совпадение идентичных мутаций в 2 локализациях опухоли отмечено у 5 больных группы с плазмочитомы. В группе пациентов без плазмочитом совпадения мутаций в костном мозге и сДНК в плазме не отмечено.

Большинство мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* затрагивали классические кодоны: 12, 13 и 61. Исследуя профиль мутаций в генах MAP-киназ во всей группе, мы также обнаружили варианты, когда мутации в гене *KRAS* или *NRAS* носили необычный характер. При анализе частоты выявления классических и неклассических мутаций в различных локализациях опухоли обнаружена следующая закономерность. Мутации в необычных локусах генов *KRAS* и *NRAS* статистически значимо чаще встречались в опухолевой сДНК по сравнению с субстратом костного мозга ($p = 0,006$) (табл. 3).

Примечательно, что в случае обнаружения мутаций в необычных локусах генов *KRAS* и *NRAS* у пациентов преобладали факторы агрессивного течения ММ.

В табл. 4 приведены данные 10 пациентов, в субстрате опухоли которых выявлены экзотические мутации. У всех пациентов с редкими вариантами мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* наблюдалось многообразие факторов неблагоприятного прогноза, спектр которых формирует понятие миеломы высокого риска. Так,

Таблица 2. Мутации в генах MAP-киназ в опухолевой свободно циркулирующей ДНК в зависимости от наличия плазмоцитом

Table 2. MAP kinase genes mutations in free circulating tumor DNA depending on the plasmacytomas presence

Мутации в гене <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> или <i>BRAF</i> Mutations in <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> or <i>BRAF</i> gene	Число пациентов с множественной миеломой Number of patients with multiple myeloma		p
	с плазмоцитомами (n = 49) with plasmacytomas (n = 49)	без плазмоцитом (n = 32) without plasmacytomas (n = 32)	
Есть Yes	12	2	0,03
Нет No	37	30	

Таблица 3. Мутации в различных кодонах генов MAP-киназ в костном мозге и свободно циркулирующей (сцДНК)

Table 3. Mutations in various codons of MAP kinase genes in bone marrow and free circulating tumor DNA (ctDNA)

Мутации в кодонах гена <i>KRAS</i> или <i>NRAS</i> Mutations in codons of <i>KRAS</i> or <i>NRAS</i> gene	Локализация опухоли, n Tumor localization, n		p
	Костный мозг (35 из 100) Bone marrow (35 of 100)	сцДНК (11 из 81) ctDNA (11 of 81)	
Классические Classical	31	5	0,006
Неклассические Non-classical	4	6	

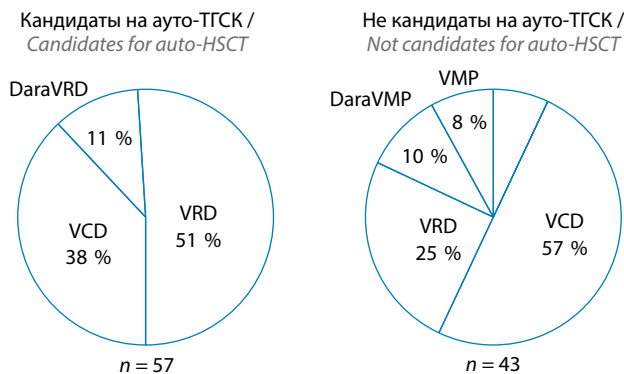


Рис. 1. Схемы 1-й линии индукционной терапии больных множественной миеломой. Здесь и на рис. 2, 3: ауто-ТГСК – трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

Fig. 1. First-line induction therapy regimens for multiple myeloma patients. Here and in Fig. 2, 3: auto-HSCT – autologous hematopoietic stem cell transplantation

у больного 1 с делецией 1 нуклеотида в гене *KRAS*, помимо цитогенетических aberrаций, высокой активности лактатдегидрогеназы, распространенной стадии по Международной системе стадирования, наблюдался сопутствующий AL-амилоидоз, а течение заболевания носило рефрактерно-рецидивирующий характер. У некоторых больных (2, 4, 6), несмотря на реализованную высокодозную химиотерапию с ауто-ТГСК, полная ремиссия так и не достигнута. В 2 других случаях выявления необычных мутаций в генах *NRAS* и *KRAS* (пациенты 3, 5) агрессивное течение заболева-

ния не позволило выполнить необходимый объем терапии, пациенты умерли на этапе индукционного лечения. Таким образом, обнаруженные закономерности диктуют необходимость дальнейшего научного поиска в этом направлении.

Из 100 пациентов, включенных в исследование, 57 рассмотрены в качестве кандидатов на ауто-ТГСК, 43 пациента не являлись кандидатами на высокодозное лечение ввиду пожилого возраста, коморбидности или рефрактерного течения болезни. Схемы 1-й линии индукционной терапии представлены на рис. 1. Кандидатам на ауто-ТГСК в половине случаев проводилась терапия по схеме VRD, в 38 % наблюдений – VCD, еще 11 % больных назначались квадриплеты с добавлением даратумумаба. Не кандидаты на ауто-ТГСК более чем в половине случаев получали схему VCD, в четверти наблюдений – VRD, в 10 % случаев – схемы с включением даратумумаба, еще 8 % больным назначалась схема VMP. На момент анализа ауто-ТГСК выполнена 55 больным, из них 4 пациентам, помимо аутологичной, выполнена аллогенная ТГСК, 2 пациентам запланирована ауто-ТГСК.

После индукционной терапии противоопухолевый ответ оценен у 95 пациентов: 46 с мутациями в генах MAP-киназ в каком-либо из опухолевых локусов и 49 без мутаций в исследуемых генах (табл. 5).

Наблюдалась тенденция к тому, что у лиц с мутациями в генах MAP-киназ полная ремиссия после индукции достигалась реже, чем у пациентов без мутаций

Таблица 4. Неблагоприятные прогностические факторы у больных множественной миеломой (ММ) с редкими вариантами мутаций в генах *KRAS* и *NRAS*
Table 4. Adverse prognostic factors in multiple myeloma (MM) patients with rare mutation variants in *KRAS* and *NRAS* genes

Номер пациента Patient number	Редкие мутации в генах <i>KRAS</i> и <i>NRAS</i> Rare mutation variants in <i>KRAS</i> and <i>NRAS</i> genes		Клинико-лабораторные особенности ММ Clinical and laboratory features of MM
	CD138 ⁺ -клетки костного мозга CD138 ⁺ bone marrow cells	Свободно циркулирующая ДНК Free circulating tumor DNA	
1	Ген не мутирован The gene is not mutated	<i>KRAS</i> del	Высокая активность ЛДГ; III стадия по ISS; double-hit del17p13, 1q21; амилоидоз; рефрактерно-рецидивирующее течение High LDH activity; ISS stage III; double-hit del17p13, 1q21; amyloidosis; refractory/relapsing course
2	Ген не мутирован The gene is not mutated	<i>NRAS</i> L95P	1q21; достижение лишь частичной ремиссии после 1 ауто-ТГСК 1q21; achievement of only partial remission after 1 auto-HSCT
3	<i>KRAS</i> L19F	Ген не мутирован The gene is not mutated	III стадия по ISS; double-hit t(14;16), 1q21; рефрактерно-рецидивирующее течение, смерть на индукции ISS stage III; double-hit t(14;16), 1q21; refractory/relapsing course, induction death
4	<i>KRAS</i> G12S	<i>KRAS</i> V29A	t(4;14); достижение лишь очень хорошей частичной ремиссии после 2 ауто-ТГСК t(4;14); achievement of only very good partial remission after 2 auto-HSCT
5	<i>NRAS</i> Y64N	Ген не мутирован The gene is not mutated	Плазмоклеточный лейкоз; высокая активность ЛДГ; 1q21; экстрамедуллярные плазмоцитомы; D-миелома; смерть на индукции Plasma cell leukemia; high LDH activity; 1q21; extramedullary plasmacytomas; D-myeloma; induction death
6	<i>KRAS</i> A59G	Ген не мутирован The gene is not mutated	Достижение лишь частичной ремиссии после ауто-ТГСК Achievement of only partial remission after auto-HSCT
7	<i>NRAS</i> Q61R	<i>NRAS</i> A83V	Плазмоклеточный лейкоз; экстрамедуллярная плазмоцитома; 1q21; ранний рецидив после ауто-ТГСК Plasma cell leukemia; extramedullary plasmacytoma; 1q21; early relapse after auto-HSCT
8	Ген не мутирован The gene is not mutated	<i>KRAS</i> K88E	Экстрамедуллярная плазмоцитома Extramedullary plasmacytoma
9	Ген не мутирован The gene is not mutated	<i>KRAS</i> L19F	1q21; III стадия по ISS; гломерулонефрит с отложением C3-компонента комплемента 1q21; ISS stage III; glomerulonephritis with C3 complement component deposition

Окончание табл. 4

End of table 4

Номер пациента Patient number	Редкие мутации в генах <i>KRAS</i> и <i>NRAS</i> Rare mutation variants in <i>KRAS</i> and <i>NRAS</i> genes		Клинико-лабораторные особенности ММ Clinical and laboratory features of MM
	CD138 ⁺ -клетки костного мозга CD138 ⁺ bone marrow cells	Свободно циркулирующая ДНК Free circulating tumor DNA	
10	<i>NRAS</i> S87I (G260T)	Нет данных No data	1q21; массивная костная плазмацитома L5 1q21; massive L5 bone plasmacytoma

Примечание. ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ISS – Международная система стадирования; ауто-ТГСК – трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток.

Note. LDH – lactate dehydrogenase; ISS – International Staging System; auto-HSCT – autologous hematopoietic stem cell transplantation.

Таблица 5. Противоопухолевый ответ после индукции у больных множественной миеломой в зависимости от мутаций в генах *RAS-ERK*-каскада
Table 5. Antitumor response after induction therapy in multiple myeloma patients depending on *RAS-ERK* pathway genes mutations

Противоопухолевый ответ Antitumor response	n (%)	
	с мутациями (n = 46) with mutations (n = 46)	без мутаций (n = 49) without mutations (n = 49)
Полная ремиссия Complete remission	8 (17 %)	13 (27 %)
Очень хорошая частичная ремиссия Very good partial remission	13 (28)	12 (24)
Частичная ремиссия Partial remission	16 (35)	18 (37)
Стабилизация Stabilization	5 (11)	5 (10)
Прогрессирование Progression	4 (9)	1 (2)

(17 % против 27 % соответственно), а прогрессирование фиксировалось чаще (9 % против 2 % соответственно). Вторая линия терапии назначалась в одинаковом числе наблюдений – 39 и 41 % больных с мутациями и без мутаций в исследуемых генах соответственно.

В группе 46 больных с мутациями в генах *RAS-ERK*-каскада мы проанализировали противоопухолевый ответ после индукционного этапа лечения в зависимости от того, в каком гене обнаружена мутация (табл. 6).

Распределение больных по категориям противоопухолевого ответа в зависимости от того, в каком гене произошла мутация, примерно одинаково.

В анализ эффективности высокодозной химиотерапии включен 51 больной; 4 больных, которым помимо ауто-ТГСК выполнена аллогенная ТГСК, исключены. Из 51 пациента, которым проведена ауто-ТГСК, у 24 обнаружены мутации в генах *MAP*-киназ; у 27 больных гены не были мутированы в костном мозге и/или сДНК.

Противоопухолевый ответ больных ММ после индукции и на 100-й день после ауто-ТГСК в зависимости от выявления мутаций в каком-либо из 3 генов приведен на рис. 2.

В группе с мутациями в контрольный срок после ауто-ТГСК обследовано 23 пациента, 1 больной погиб от осложнений раннего посттрансплантационного периода. Замечена тенденция к меньшей частоте достижения полной ремиссии после индукционного этапа лечения в группе больных с мутированным статусом генов по сравнению с группой пациентов без мутаций в генах *MAP*-киназ (17 % против 41 %; $p = 0,07$). На сроке 100 дней после ауто-ТГСК тенденция сохранилась: у больных с мутациями в генах *MAP*-киназ в 2 раза реже достигался глубокий противоопухолевый ответ (полная ремиссия) по сравнению с пациентами, гены которых не были мутированы (30 % против 59,5 %; $p = 0,051$).

Оценена выживаемость без прогрессирования (ВБП) в зависимости от мутаций в генах *RAS-ERK*-каскада

Таблица 6. Противоопухолевый ответ после индукции у больных множественной миеломой в зависимости от гена MAP-киназ, несущего мутацию
Table 6. Antitumor response after induction in multiple myeloma patients depending on the MAP kinase gene carrying the mutation

Противоопухолевый ответ Antitumor response	n			
	Мутация в гене KRAS KRAS gene mutation (n = 17)	Мутация в гене NRAS NRAS gene mutation (n = 16)	Мутация в гене BRAF BRAF gene mutation (n = 9)	Мутация в 2 генах Mutation in 2 genes (n = 4)
Полная ремиссия Complete remission	3	2	2	1
Очень хорошая частичная ремиссия Very good partial remission	4	4	3	2
Частичная ремиссия Partial remission	7	5	3	1
Стабилизация Stabilization	2	3	—	—
Прогрессирование Progression	1	2	1	—

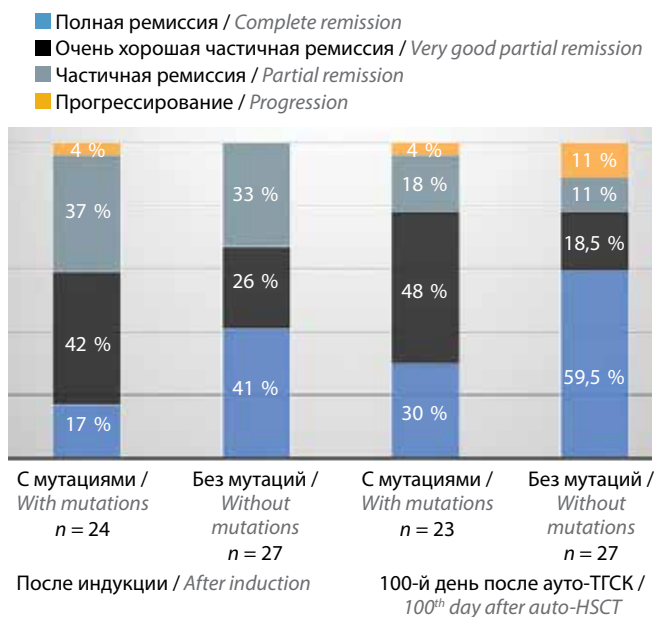


Рис. 2. Противоопухолевый ответ на разных этапах терапии у больных множественной миеломой в зависимости от мутаций в генах MAP-киназ
Fig. 2. Antitumor response at different therapy stages in multiple myeloma patients depending on MAP kinase genes mutations

(рис. 3). Вероятность 2-летней ВБП больных с мутированным статусом генов MAP-киназ была статистически значимо ниже ($p < 0,05$) и составила 62 % против 92 % для больных без мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* в костном мозге и/или сДНК в плазме.

Обсуждение

Сигнальный путь RAS-RAF-МЕК-ERK играет важную роль в фундаментальных биологических процессах, таких как пролиферация, адгезия и миграция клеток, апоптоз, ангиогенез. Мутации в генах в *KRAS*,

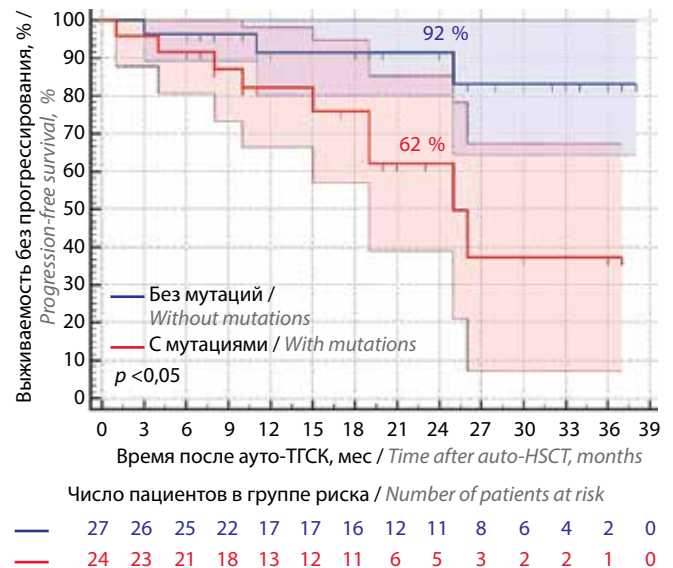


Рис. 3. Выживаемость без прогрессирования больных множественной миеломой в зависимости от мутаций в генах MAP-киназ в субстрате опухоли
Fig. 3. Progression-free survival of multiple myeloma patients depending on MAP kinase genes mutations in tumor substrate

NRAS и *BRAF* являются наиболее частыми драйверными событиями при ММ. Частота выявления мутаций в генах MAP-киназ у больных впервые диагностированной ММ, по данным настоящей работы, составила 50 %, что согласуется с данными литературы [13, 14]. Частота обнаружения мутаций в генах RAS-ERK-каскада возрастает по мере прогрессирования заболевания, что отражает участие сигнального пути в патогенезе. Согласно данным секвенирования всего экзома, мутации в *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* зарегистрированы у 21, 19 и 7 % пациентов с впервые диагностированной ММ соответственно [15]. Результаты, полученные

в настоящей работе, сходны: 19, 17 и 10 % соответственно. Еще в 4 % случаев нами подтверждено наличие одновременно 2 мутаций в различных генах.

При сопоставлении результатов цитогенетического исследования и мутационного статуса генов различия не выявлены: aberrации высокого риска наблюдались у 48 % пациентов с мутациями и у 58 % больных без мутаций в каком-либо из локусов опухоли. При анализе в 2 группах больных — с плазмоцитомами и без таковых — частота обнаружения мутаций в генах RAS-ERK-каскада в какой-либо локализации опухоли оказалась сопоставимой, однако получены интересные данные при изучении парных образцов опухоли. Так, у больных с плазмоцитомами статистически значимо чаще выявлялись мутации в опухолевой сцДНК в плазме по сравнению с пациентами без плазмоцитом. Это наблюдение является возможным свидетельством того, что жидкостная биопсия может быть альтернативой тканевой биопсии и применяться для прогнозирования плазмоцитом. В литературе мы нашли подтверждение этой гипотезе [16].

Ранее мы упоминали, что жидкостная биопсия может стать ценным инструментом поиска новых факторов неблагоприятного прогноза ММ [17]. В качестве таких факторов, предположительно, рассматриваются мутации, затрагивающие необычные, неклассические кодоны генов *KRAS*, *NRAS*. В настоящем исследовании приведены данные 10 пациентов, у которых в сцДНК или костном мозге выявлены неканонические мутации. У этих пациентов прослеживается множество различных клинико-лабораторных параметров, ассоциированных с неблагоприятным течением ММ. На наш взгляд, необходимо дальнейшее исследование в этом направлении на большей выборке больных.

Мутации в гене *BRAF*, обнаруживаемые при различных видах рака, нечасты при ММ. Мы определяли мутацию V600E в гене *BRAF*. Известно, что при ММ могут затрагиваться и другие кодоны. Так, в исследовании 2018 г. отмечено уникальное преобладание вариантов *BRAF* D594N в подгруппе t(14;16) [18]. Требуется дальнейшее изучение *BRAF*-положительной миеломы для понимания механизмов активации сигнального пути RAS-RAF-MEK-ERK и определения роли таргетных препаратов в лечении.

Уточнение, какая мутация в гене *BRAF* присутствует у пациента, имеет прикладное значение, так как *BRAF*-ингибиторы селективны в отношении мутации *BRAF* V600E [19]. В силу иного биологического механизма действия применять ингибиторы *BRAF* у больных с мутациями в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* D594N нецелесообразно [20]. В литературе представлены немногочисленные данные о применении ингибиторов *BRAF* у пациентов с ММ с мутацией в гене *BRAF* V600E. В 2017 г. U.J.M. Меу и соавт. представили опыт успешного применения комбинации вемурафениба и кобиметиниба у молодого пациента с рефрактерной экстрамедуллярной ММ с мутацией в гене *BRAF*

V600E [21]. В 2018 г. докладывались результаты многоцентрового клинического исследования по изучению эффективности вемурафениба у больных с разными видами неоплазий (VE-BASKET). В это исследование включены 9 больных с рефрактерным течением ММ. У 2 из них терапия вемурафенибом оказалась высокоэффективной, пациенты находились в длительной ремиссии (более 20 мес) на момент окончания исследования. Отсутствие противоопухолевого эффекта у остальных пациентов свидетельствовало о том, что мутация в гене *BRAF* V600E не оказывала первостепенного влияния на течение болезни, являясь лишь одной из поломок в сложном геномном ландшафте ММ [22]. В проспективном многоцентровом исследовании II фазы, результаты которого опубликованы в 2023 г., оценивались эффекты ингибирования *BRAF*/MEK с использованием энкорафениба и биниметиниба у 12 пациентов с рецидивирующей/рефрактерной ММ с мутацией *BRAF* V600E. В исследование включались больные, в среднем получившие 5 линий терапии. Общий уровень ответа был высоким и составил 83,3 %, а медиана ВБП составила 5,6 мес, что характеризует эту терапию как успешный подход таргетного воздействия [23]. В другом исследовании изучались вопросы приобретения резистентности опухолевых миеломных клеток к лечению ингибиторами *BRAF*. Авторы показали, что в основе адаптации опухолевой клетки к таргетной терапии лежат изменения в транскрипции и эпигенетической регуляции генов [24, 25].

Несмотря на равное распределение больных по группам цитогенетического риска, у больных с мутациями в генах MAP-киназ прослежена тенденция к худшим результатам противоопухолевого лечения. Так, на группе 95 больных показано, что у пациентов с мутациями полная ремиссия после индукции достигалась реже, чем у пациентов без мутаций (17 % против 27 %), а прогрессирование фиксировалось чаще (9 % против 2 %). Эти результаты согласуются с данными, опубликованными в 2023 г. [12].

В целом, анализируя литературу, можно заметить неоднозначные выводы о влиянии мутаций в генах RAS-ERK-каскада на результаты лечения больных ММ. Исследователи не едины во мнении, мутация в каком из генов приводит к отрицательным последствиям [11, 14, 26]. По данным настоящего исследования, при изучении категорий противоопухолевого ответа в выборке пациентов — кандидатов на ауто-ТГСК тенденция к меньшей частоте достижения полной ремиссии сохранялась и в контрольные сроки после трансплантации. Статистически значимые различия отмечены в оценке ВБП группы больных, которым проведена ауто-ТГСК. Так, вероятность 2-летней ВБП больных с мутациями в генах MAP-киназ была значимо ниже и составила 62 % против 92 % для больных без мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* в одном из локусов опухоли. Сходные данные о худших показателях ВБП больных с мутациями в генах MAP-киназ по сравнению

с больными без мутаций опубликованы N. Li и соавт. в 2023 г. [25]. В то же время есть данные, напротив, демонстрирующие взаимосвязь между мутированным статусом этих генов и более продолжительными показателями выживаемости, а также отрицающие ассоциацию мутаций генов *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* с прогнозом течения ММ [15, 27]. Таким образом, этот вопрос остается открытым, требует исследования на представительной выборке пациентов, получающих единообразное лечение современными классами препаратов.

Заключение

Ввиду сложной генетической структуры и пространственной анатомической гетерогенности ММ

исследование опухоли различной локализации является крайне актуальным. Жидкостная биопсия при ММ может применяться для поиска новых факторов неблагоприятного прогноза. Такими факторами, вероятно, станут мутации в генах *KRAS* и *NRAS*, затрагивающие неклассические локусы. По данным проведенного исследования, при обнаружении мутаций в генах MAP-киназ в какой-либо локализации опухоли отмечается тенденция к худшим показателям противоопухолевого ответа. Вероятность 2-летней ВБП статистически значимо ниже при обнаружении мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* у больных – кандидатов на ауто-ТГСК по сравнению с пациентами без мутаций в исследуемых генах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rasche L., Chavan S.S., Stephens O.W. et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun* 2017;8(1):268. DOI: 10.1038/s41467-017-00296-y
- Bolli N., Avet-Loiseau H., Wedge D.C. et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun* 2014;5:2997. DOI: 10.1038/ncomms3997
- Mazzotti C., Buisson L., Maheo S. et al. Myeloma MRD by deep sequencing from circulating tumor DNA does not correlate with results obtained in the bone marrow. *Blood Adv* 2018;2(21):2811–3. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018025197
- Kis O., Kaedbey R., Chow S. et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nat Commun* 2017;8:15086. DOI: 10.1038/ncomms15086
- Mithraprabhu S., Khong T., Ramachandran M. et al. Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma. *Leukemia* 2017;31(8):1695–705. DOI: 10.1038/leu.2016.366
- Anwer F., Gee K.M., Ifiikhar A. et al. Future of personalized therapy targeting aberrant signaling pathways in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2019;19(7):397–405. DOI: 10.1016/j.clml.2019.03.017
- Shirazi F., Jones R.J., Singh R.K. et al. Activating *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* mutants enhance proteasome capacity and reduce endoplasmic reticulum stress in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117(33):20004–14. DOI: 10.1073/pnas.2005052117
- Yang Y., Bolomsky A., Oellerich T. et al. Oncogenic RAS commandeers amino acid sensing machinery to aberrantly activate mTORC1 in multiple myeloma. *Nat Commun* 2022;13(1):5830. DOI: 10.1038/s41467-022-33618-w
- Pasca S., Tomuleasa C., Teodorescu P. et al. *KRAS/NRAS/BRAF* mutations as potential targets in multiple myeloma. *Front Oncol* 2019;9:1137. DOI: 10.3389/fonc.2019.01137
- Laganà A., Perumal D., Melnekoﬀ D. et al. Integrative network analysis identifies novel drivers of pathogenesis and progression in newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 2018;32(1):120–30. DOI: 10.1038/leu.2017.197
- Mulligan G., Lichter D.I., Di Bacco A. et al. Mutation of *NRAS* but not *KRAS* significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy. *Blood* 2014;123(5):632–9. DOI: 10.1182/blood-2013-05-504340
- Perroud C., Thurian D., Andres M. et al. Effect of MAPK activation via mutations in *NRAS*, *KRAS* and *BRAF* on clinical outcome in newly diagnosed multiple myeloma. *Hematol Oncol* 2023;41(5):912–21. DOI: 10.1002/hon.3208
- Hu Y., Chen W., Wang J. Progress in the identification of gene mutations involved in multiple myeloma. *Onco Targets Ther* 2019;12:4075–80. DOI: 10.2147/OTT.S205922
- Chng W.J., Gonzalez-Paz N., Price-Troska T. et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 2008;22(12):2280–4. DOI: 10.1038/leu.2008.142
- Walker B.A., Boyle E.M., Wardell C.P. et al. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol* 2015;33(33):3911–20. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.1503
- Vlachová M., Pečinka L., Gregorová J. et al. Liquid biopsy of peripheral blood using mass spectrometry detects primary extramedullary disease in multiple myeloma patients. *Sci Rep* 2024;14(1):18777. DOI: 10.1038/s41598-024-69408-1
- Soloveva M., Solovev M., Risinskaya N. et al. Loss of heterozygosity and mutations in the RAS-ERK pathway genes in tumor cells of various loci in multiple myeloma. *Int J Mol Sci* 2024;25(17):9426. DOI: 10.3390/ijms25179426
- Walker B.A., Mavrommatis K., Wardell C.P. et al. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood* 2018;132(6):587–97. DOI: 10.1182/blood-2018-03-840132
- Chapman P.B., Hauschild A., Robert C. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with *BRAF* V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364(26):2507–16. DOI: 10.1056/NEJMoa1103782
- Heidorn S.J., Milagre C., Whittaker S. et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010;140(2):209–21. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.040
- Mey U.J.M., Renner C., von Moos R. Vemurafenib in combination with cobimetinib in relapsed and refractory extramedullary multiple myeloma harboring the *BRAF* V600E mutation. *Hematol Oncol* 2017;35(4):890–3. DOI: 10.1002/hon.2353
- Raje N., Chau I., Hyman D.M. et al. Vemurafenib in patients with relapsed refractory multiple myeloma harboring *BRAF*^{V600E} mutations: a cohort of the histology-independent VE-BASKET study. *JCO Precis Oncol* 2018;2:PO.18.00070. DOI: 10.1200/PO.18.00070
- Giesen N., Chatterjee M., Scheid C. et al. A phase 2 clinical trial of combined BRAF/MEK inhibition for *BRAF*^{V600E}-mutated multiple myeloma. *Blood* 2023;141(14):1685–90. DOI: 10.1182/blood.2022017789

24. Waldschmidt J.M., Kloeber J.A., Anand P. et al. Single-cell profiling reveals metabolic reprogramming as a resistance mechanism in *BRAF*-mutated multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2021;27(23):6432–44. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-2040
25. Li N., Lin P., Zuo Z. et al. Plasma cell myeloma with *RAS/BRAF* mutations is frequently associated with a complex karyotype, advanced stage disease, and poorer prognosis. *Cancer Med* 2023;12(13):14293–304. DOI: 10.1002/cam4.6103
26. Liu P., Leong T., Quam L. et al. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* 1996;88(7):2699–706.
27. Gebauer N., Biersack H., Czerwinski A.C. et al. Favorable prognostic impact of RAS mutation status in multiple myeloma treated with high-dose melphalan and autologous stem cell support in the era of novel agents: a single center perspective. *Leuk Lymphoma* 2016;57(1):226–9. DOI: 10.3109/10428194.2015.1046863

Вклад авторов

М.В. Соловьева: разработка концепции исследования, обзор публикаций, анализ данных, написание и окончательное одобрение текста статьи;

М.В. Соловьев: анализ и интерпретация данных, статистическая обработка данных, редактирование и окончательное одобрение текста статьи;

И.А. Якутик, Б.В. Бидерман, Н.В. Рисинская, Е.Е. Никулина, Т.Н. Обухова: проведение исследований, анализ данных, окончательное одобрение текста статьи;

А.В. Попова: сбор данных для анализа, окончательное одобрение текста статьи;

А.Б. Судариков, Л.П. Менделеева: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование и окончательное одобрение текста статьи.

Authors' contributions

M.V. Soloveva: concept development, review of publications, data analysis, article writing, final article approval;

M.V. Solovjev: data analysis and interpretation, statistical analysis, article editing, final article approval;

I.A. Yakutik, B.V. Biderman, N.V. Risinskaya, E.E. Nikulina, T.N. Obukhova: conducting research, data analysis, final article approval;

A.V. Popova: data collection for analysis, final article approval;

A.B. Sudarikov, L.P. Mendeleeva: concept and design development, article editing, final article approval.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.В. Соловьева / M.V. Soloveva: <https://orcid.org/0000-0003-4142-171X>

М.В. Соловьев / M.V. Solovjev: <https://orcid.org/0000-0002-7944-6202>

И.А. Якутик / I.A. Yakutik: <https://orcid.org/0000-0002-5532-1122>

Б.В. Бидерман / B.V. Biderman: <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

А.В. Попова / A.V. Popova: <https://orcid.org/0009-0008-2681-7365>

Н.В. Рисинская / N.V. Risinskaya: <https://orcid.org/0000-0003-2957-1619>

Е.Е. Никулина / E.E. Nikulina: <https://orcid.org/0000-0003-3914-8611>

Т.Н. Обухова / T.N. Obukhova: <https://orcid.org/0000-0003-1613-652X>

А.Б. Судариков / A.B. Sudarikov: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

Л.П. Менделеева / L.P. Mendeleeva: <https://orcid.org/0000-0002-4966-8146>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 25-25-20201.

Funding. The study was performed with the financial support of the Russian Science Foundation, project No. 25-25-20201.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (протокол № 165 от 10.06.2021).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 165 dated 10.06.2021).

All patients gave written informed consent to participate in the study.