

УДК 576.316:616-007.1:616-006.44:616.71-018.46-089.843

## МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНІ КРИТЕРІЇ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ПЛАЗМОКЛІТИННОЇ МІЄЛОМИ

Ж. А. МІШАРІНА<sup>1</sup>, Ж. М. МІНЧЕНКО<sup>2</sup>, А. І. КУРЧЕНКО<sup>1</sup>,  
Т. Ф. ЛЮБАРЕЦЬ<sup>2</sup>, О. О. ДМИТРЕНКО<sup>2</sup>, В. Г. БЕБЕШКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

<sup>2</sup> Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини  
Національної академії медичних наук України», м. Київ

За результатами проведеного молекулярно-цитогенетичного обстеження 61 хворого на плазмоклітинну мієлому (ПКМ) на різних етапах поліхіміотерапії (ПХТ), хромосомні аномалії виявлені майже у 80 % хворих. Переважали кількісні зміни хромосом 3, 8, 11 та 13, у більшості пацієнтів, які були асоційовані з гіпердиплоїдним типом хромосомних аберацій. У 15 % пацієнтів визначені транслокації *IgH* із залученням хромосом 4, 11 та 16. Отримані дані свідчать про суттєвий зв'язок виявлених хромосомних аномалій з ризиком формування первинної рефрактерності до терапії та виникнення ускладнень (значення діапазону коефіцієнта Спірмена від  $R_0 \text{ Spearman} = 0,33$  до  $R_0 \text{ Spearman} = 0,5$ ;  $p < 0,05$ ), що дозволяє вважати їх прогностичними критеріями перебігу ПКМ.

**Ключові слова:** плазмоклітинна мієлома, М-градієнт, парапротеїн Бенс-Джонса, флуоресцентна *in situ* гібридизація (FISH), цитогенетичні аномалії

**Вступ.** Плазмоклітинна мієлома (ПКМ), яка в літературі також представлена як множинна мієлома або мієломна хвороба, належить до групи зрілих В-клітинних лімфоїдних новоутворень відповідно до переглянутої класифікації ВООЗ (2016) [1]. За даними різних авторів, захворюваність на ПКМ становить 1–10 %, а в Україні складає приблизно 1,5–2 випадки на

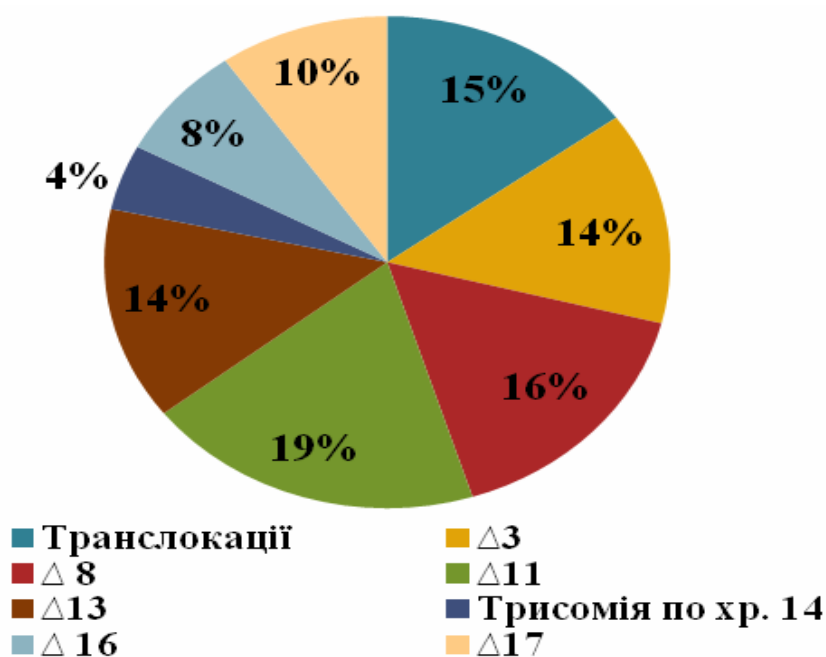
100 тис. населення [2]. Зростання частки цієї хвороби крові в спектрі гематологічних захворювань зумовлено як збільшенням в популяції більшості країн кількості людей похилого віку, так і впливом різноманітних негативних чинників зовнішнього середовища [3]. У більшості хворих ПКМ характеризується інфільтрацією кісткового мозку (КМ) злоякісно трансформованими плазматичними клітинами (>10 %), наявністю моноклонального протеїну (М-протеїн) та літичними ураженнями кісток [4]. В основі складних патогенетичних механізмів виникнення цього захворювання лежить поява хромосомних аберацій та численні геномні порушення, що призводять до дизрегуляції клітинного циклу і здатності плазматичних клітин до вступу в апоптоз [5]. Накопичені останніми роками дані щодо ролі молекулярно-цитогенетичних порушень у хворих на ПКМ свідчать про необхідність подальшого поглибленого дослідження виявлених змін і можливість їх використання в якості прогностичних критеріїв перебігу захворювання [6].

Метою роботи було визначення прогностичної значущості цитогенетичних та молекулярно-генетичних маркерів перебігу захворювання у хворих на ПКМ на різних етапах лікування.

**Матеріали та методи досліджень.** Обстежено 61 пацієнт з ПКМ II – III стадій, з них 6 пацієнтів раніше не отримували лікування, 5 осіб знаходились на різних етапах поліхіміотерапії (ПХТ), чоловіків було 33, жінок – 28 (співвідношення чоловіки:жінки – 1,18). Вік пацієнтів знаходився в межах від 35 до 74 років, в середньому склав  $(59,27 \pm 1,13)$  рр. У переважної більшості хворих (45 осіб) визначався варіант ПКМ з IgG за типом моноклональної секреції важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGHV*), у 8 хворих діагностовано ПКМ з парапротеїном Ig A та у 8 хворих – ПКМ Бенс-Джонса. У 30 пацієнтів захворювання було діагностовано на II стадії, у 31 – на III стадії. Ураження нирок (мієломна нефропатія з розвитком хронічної ниркової недостатності) було встановлено у 7 хворих. Критерії відповіді на терапію визначались відповідно до «Уніфікованого клінічного протоколу первинної, вторинної

(спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Множинна мієлома», затвердженого Наказом МОЗ України від 02.11.2015, № 710. Визначення молекулярно-цитогенетичних змін в геномі субстратних клітин КМ проводилось відповідно до загальновідомих методик [7, 8]. Для статистичної обробки даних було використано програму Statistica 8.0 з розрахунком коефіцієнта рангової кореляції Спірмена.

**Результати та їх обговорення.** Досліджено спектр і частоту хромосомних аберацій в плазматичних клітинах кісткового мозку хворих на ПКМ (рис. 1). Встановлено, що в обстеженій групі, у 35 пацієнтів (57 %) визначались зміни хромосом 4, 8, 11, 13, 14, 16 та 17. Поміж хромосомних аномалій найчастіше зустрічалися анеуплоїдії, які були представлені моносоміями, трисоміями, тетрасоміями та іншими змінами числа хромосом. Транслокації мали місце у 15 % випадків.



**Рис. 1. Типи та відсоток хромосомних аберацій, виявлених в плазматичних клітинах кісткового мозку хворих на ПКМ**

Проведені дослідження дозволили встановити наявність асоціативного зв'язку виявлених хромосомних аномалій з перебігом захворювання. Так, поєднання  $t(11;14)$  з додатковими аномаліями, в тому числі з делецією

хромосоми 13 та t(4;14), спостерігались при первинній рефрактерності до лікування. Ускладнений перебіг ПКМ (поява рецидивів, розвиток ниркової недостатності) та мінімальна відповідь на терапію визначались за наявності двох і більше аномальних клонів, представлених 17p13, делецією/моносомією хромосоми 13, t(4;14), t(14;16) та Δ16 (моносомії, трисомії). Виявлені зміни дозволили віднести їх до прогностичних критеріїв перебігу захворювання.

За умов наявності двох і більше аномальних клонів (23 пацієнти, 37,7 % обстежених) встановлено ускладнений перебіг захворювання та мінімальна відповідь на терапію (Ro Spearman = 0,42;  $p < 0,05$ ). Найчастіше зустрічались анеуплоїдії, які були представлені моносоміями, трисоміями, тетрасоміями та іншими змінами числа хромосом. Наявність значної кількості аберацій можна пояснити В-клітинним походженням пухлинних клітин. Відповідно до даних літератури [9], В-лімфоцити відрізняються від інших клітин організму тим, що в процесі дозрівання їх геном піддається численним перебудовам ДНК, що створює основу для онкогенних порушень.

Делеція гена *TP 53* (17p13) визначалась у 10 хворих на ПКМ. У семи з них ця делеція реєструвалась у більш, ніж 10 % плазматичних клітин, що вказувало на її клональний характер. Ще у трьох хворих кількість аномальних ядер не перевищувала 9 %. Встановлено тісний кореляційний зв'язок між несприятливою відповіддю на терапію та делецією хромосоми 17 (Ro Spearman = 0,41;  $p < 0,05$ ). Згідно даних літератури [10], делеція гену *TP53* може бути незалежним прогностичним фактором перебігу ПКМ. Хворі з делецією 17p13 мають значно коротший період ремісії та, в цілому, коротшу виживаність, навіть після проведення високодозової поліхіміотерапії (ПХТ) з трансплантацією аутологічних стовбурових клітин периферичної крові (ауто-ТСКПК), ніж хворі без делеції даного гену [11, 12].

Результати власних досліджень та низки аналогічних даних інших авторів представлені в таблиці 1. Отримані нами результати узгоджуються з дослідженнями інших авторів, особливо за наявності достатнього об'єму вибірки.

**Результати досліджень делеції гена *TP53* в клітинах кісткового мозку  
хворих на ПКМ**

| Літературні джерела    | Країна    | Нозологія | Всього обстежених пацієнтів | Делеція гена <i>TP 53</i> , n= |
|------------------------|-----------|-----------|-----------------------------|--------------------------------|
| Власні дані            | Україна   | ПКМ       | 61                          | 7                              |
| Chang H. et al. [12]   | Канада    | ПКМ       | 105                         | 10                             |
| Türkmen S. et al. [13] | Німеччина | ПКМ       | 23                          | 1                              |
| Gole L. et al. [14]    | Сінгапур  | ПКМ       | 20                          | 1                              |

У 10 з 15 обстежених нами хворих на ПКМ з делецією хромосоми 13 перебіг захворювання характеризувався рефрактерністю до терапії, частими рецидивами або прогресією клінічної симптоматики (Ro Spearman = 0,33;  $p < 0,05$ ). Відомо, що в результаті порушення структури довгого плеча чи втрати хромосоми 13 клітини набувають унікальних біологічних властивостей щодо неконтрольованої проліферації. Численні випадки спадкових і спорадичних форм онкологічних захворювань супроводжуються делецією в ділянці 13q14. Ген *FKHR*, який знаходиться на хромосомі 13 (13q14), є онкогенним транскрипційним фактором і корелює з морфологічним типом пухлини та ефективністю лікування.

У 15 пацієнтів (24,6 %) нашої групи виявлена моносомія хромосоми 13 або делеції ділянки 13q34. Делеція/моносомія хромосоми 13, особливо у поєднанні з іншими хромосомними порушеннями (в т. ч.  $t(4;14)$ ), відноситься до несприятливих цитогенетичних аномалій, які асоціюються з первинною резистентністю до терапії, прогресуючим перебігом захворювання та зменшенням виживаності, навіть після проведення високодозової ПХТ з подальшою ауто-ТСКПК [15].

Кількісні зміни хромосоми 11 були визначені у 10 (16,4 %) хворих. При цьому виявлялись гіпер- та гіпоанеуплоїдії. Так, трисомія хромосоми 11 була зареєстрована у 5 (8,2 %) хворих з 61. Кількість плазматичних клітин з трьома сигналами знаходилась в межах від 7 до 40 % із середнім значенням –  $23,6 \pm$

15,8 %. У трьох пацієнтів (4,9 %) визначався додатковий пул плазматичних клітин з множинним гібридизаційним сигналом ( $>3$ ), що свідчить про наявність полісомії хромосоми 11. У одного обстеженого кількість плазматичних клітин з полісомією складала майже 30 %. Ще у 5 хворих (8,2 %) була визначена моносомія хромосоми 11.

Важливими молекулярно-цитогенетичними маркерами діагностики і прогнозу ПКМ є транслокації хромосом 4, 8, 11, 16 та 18 із залученням генів *IGHV*, локалізованих на хромосомі 14 [16]. Ці хромосомні транслокації призводять до зміни експресії генів та/або утворення злитих (хімерних) генів, що експресують продукти (РНК і білки), які можуть слугувати як діагностичними маркерами, так і терапевтичними мішенями. Найбільш значущими для хворих на ПКМ є хромосомні транслокації генів *IGHV* із залученням гена *FGFR3* - t(4;14)(p16.3;q32.3), гена *CCND1* - t(11;14)(q13;q32) та гена *MAF* - t(14;16)(q32;q23).

Транслокація t(11;14) була зареєстрована у двох хворих на ПКМ (3,3 %). Відомо, що в результаті даної транслокації може підсилюватись експресія гена цикліна *D1*, що сприяє агресивному клональному росту пухлинних клітин [17]. Необхідно зазначити, що обстежені нами пацієнти з наявною транслокацією t(11;14), мали додаткові клони аномальних клітин, в тому числі делецію хромосоми 13 і t(4;14), на тлі чого відзначалася первинна рефрактерність до терапії з ускладненим прогресуючим перебігом захворювання (розвиток рецидивів, ниркової недостатності). Тому, на нашу думку, до групи стандартного ризику пацієнтів слід відносити тільки у випадку наявності ізольованої транслокації t(11;14).

Транслокація t(14; 16) з перебудовами гена *MAF* реєструвалася у трьох хворих на ПКМ. Ген *MAF* є основним фактором транскрипції (bZIP), задіяним у численних клітинних процесах і може виступати як активатором, так і супресором транскрипції. Пацієнти з даною транслокацією відносяться до групи високого ризику, мають несприятливий перебіг захворювання та відповідь на терапію, що було підтверджено нашими дослідженнями [18].

Транслокація t(4;14), яка призводить до підвищеної експресії гена *FGFR3*, була виявлена у чотирьох пацієнтів з ПКМ. Відомо, що ця транслокація корелює з мінімальною відповіддю на стандартні схеми ПХТ та більш короткою загальною тривалістю життя у хворих, особливо, якщо вона супроводжується делецією хромосоми 13 [19]. Так, у всіх чотирьох обстежених нами пацієнтів з наявною транслокацією t(4;14), що асоціювалась з делецією/моносомією хромосоми 13, зареєстровано первинно-рефрактерну форму захворювання або мінімальну відповідь на терапію з ускладненим перебігом захворювання (Ro Spearman = 0,33; p<0,05). Нами встановлено також достовірний кореляційний зв'язок між прогностично несприятливою t(14;16) та Δ16 (моносомії, трисомії) (Ro Spearman = 0,50; p<0,02).

### ВИСНОВКИ

Отримані результати свідчать про суттєвий асоціативний зв'язок виявлених хромосомних аномалій з ризиком формування первинної рефрактерності до ПХТ та виникнення ускладнень (значення діапазону коефіцієнта Спірмена від Ro Spearman = 0,33 до Ro Spearman = 0,5; p<0,05), що дозволяє віднести зазначені зміни до прогностичних критеріїв перебігу ПКМ.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms / H. S. Swerdlow, E. Campo, S. A. Pileri [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 127, No 20. – P. 2375–2390.
2. Рак в Україні, 2011–2012. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // *Бюлетень Національного канцер-реєстру України*. – No 14. – Київ, 2013. – 120 с.
3. Ионизирующая радиация и онкогематологические заболевания / Под ред. В. Ф. Чехуна, Д. Ф. Глузмана. – Киев: ДИА, 2016. – 284 с.
4. Rajkumar V. S. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management / V. S. Rajkumar // *Am. J. Hematol.* – 2014. – Vol. 89, No 10 – P. 999–1009.

5. Becze E. Cytogenetics helps determine diagnosis and prognosis for multiple myeloma / E. Becze // *ONS Connect*. – 2012. – Vol. 27, No 12 – P.18–9.
6. Mechanisms and clinical applications of genome instability in multiple myeloma / A. Cagnetta, D. Lovera, R. Grasso, [et al.] // *Hindawi Publishing Corporation Bio. Med. Research. International*. – Vol. 2015, Article ID 943096, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/943096>
7. Pinkel D. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization / D. Pinkel, T. Straume, J. Gray // *PNAS*. – 1995. – Vol. 83. – P. 2934–2938.
8. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders / D. Wolff, A. Bagg, L. Cooley [et al.] // *J. Mol. Diagn.* – 2007. – Vol. 9. – No 2. – P. 134–143.
9. Mechanisms and clinical applications of chromosomal instability in lymphoid malignancy / M. K. Maxwell, O. W. Press, M. S. Horwitz, T. Tidwell // *Br. J. Haematol.* – 2015. – Vol. 171. – P. 13–28.
10. Chen L. J. Molecular cytogenetic aberrations in patients with Multiple Myeloma studied by interphase fluorescence in situ hybridization / L. J. Chen, J. Y. Li // *Exp. Oncol.* – 2007. – Vol. 29, No 2. – P. 116–120.
11. Defining the role of gene deletion TP53 in the diagnosis and prognosis of chronic lymphoproliferative neoplasm using the method of fluorescence in situ hybridization / J. A. Misharina, V. V. Sitko, A. I. Kurchenko [et al.] // *Гематологія і переливання крові: міжвідомчий збірник*. – 2014. – Вип. 37. – С. 179–189.
12. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation / H. Chang, C. Qi, Qi-Long Yi [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, No 1. – P. 358–360.
13. Türkmen S. High Prevalence of Immunoglobulin Light Chain Gene Aberrations as Revealed by FISH in Multiple Myeloma and MGUS / S. Türkmen, A. Binder // *Genes, Chromosomes and Cancer*. – 2014. – Vol. 53, No 8. – P. 650–656.



14. Gole L. Modified cIg-FISH protocol for multiple myeloma in routine cytogenetic laboratory practice / L. Gole, A. Lin // *Cancer Genetics*. – 2014. – Vol. 207. – P. 31–34.

15. 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization for diagnosis and prognosis of chronic lymphoproliferative neoplasms / V. V. Sitko, J. A. Misharina, J. M. Minchenko [et al.] // *Biopolymers and Cell*. – 2015. – Vol. 31, No 3. – P. 218–225.

16. Bea S. Cyclin D1 transcriptional activation in MCL / S. Bea // *Blood*. – 2014. – Vol. 123, No 13. – P. 1979–1980.

17. Gozzetti A. Molecular cytogenetics of multiple myeloma / A. Gozzetti, A. Frasconi, R. Crupi // *Austin. J. Cancer. Clin. Res* – 2014. – Vol. 1, Issue 4. – 1020. ISSN: 2381–909X [www.austinpublishinggroup.com](http://www.austinpublishinggroup.com)

18. Діагностична та прогностична значущість хромосомних транслокацій із залученням генів важких ланцюгів ІґН у хворих на хронічні лімфопроліферативні новоутворення / Ж. А. Мішаріна, В. В. Сітько, Ж. М. Мінченко [та ін.] // *Вісник проблем біології та медицини*. – 2015. – Том 1 (124), Вип. 4. – С. 187–191.

19. Роль транслокації t(4;14) та делецій 13q в діагностиці та прогнозі перебігу злоякісних В-клітинних новоутворень / Ж. А. Мішаріна, В. В. Сітько, Ж. М. Мінченко [та ін.] // *Вісник проблем біології та медицини*. – 2015. – Том 1 (122), Вип. 3. – С. 157–160.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ  
ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ ПЛАЗМОКЛЕТОЧНОЙ МИЕЛОМИ**

*Ж. А. МИШАРИНА<sup>1</sup>, Ж. Н. МИНЧЕНКО<sup>2</sup>, А. И. КУРЧЕНКО<sup>1</sup>,  
Т. Ф. ЛЮБАРЕЦ<sup>2</sup>, Е. А. ДМИТРЕНКО<sup>2</sup>, В. Г. БЕБЕШКО<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев*

<sup>2</sup>*Государственное учреждение «Национальный научный центр радиационной  
медицины», г. Киев*

*По результатам проведенного молекулярно-цитогенетического обследования больных плазмоклеточной миеломой (ПКМ) на разных этапах терапии, хромосомные аномалии обнаружены почти у 80 % больных. Преобладали количественные изменения хромосом 3, 8, 11 и 13, у большинства пациентов – ассоциированные с гипердиплоидным типом хромосомных aberrаций. У 15 % пациентов определены транслокации IgH с привлечением хромосом 4, 11 и 16. Полученные данные свидетельствуют о значительной связи выявленных хромосомных аномалий с риском формирования первичной рефрактерности к терапии и возникновения осложнений (значение диапазона коэффициента Спирмена от  $Ro Spearman = 0,33$  до  $Ro Spearman = 0,5$ ;  $p < 0,05$ ), что позволяет считать их прогностическими критериями течения ПКМ.*

**Ключевые слова:** *плазмоклеточная миелома, M-градиент, парапротеин Бен-Джонса, флуоресцентная in situ гибридизация (FISH), цитогенетические аномалии*

**MOLECULAR-CYTOGENETIC CRITERIA OF PROGNOSIS OF PLASMA  
CELL MYELOMA COURSE**

ZH. A. MISHARINA, ZH. M. MINCHENKO, T. F. LIUBARETS,  
O. O. DMYTRENKO, V. G. BEBESHKO

<sup>1</sup>*Bogomolets National Medical University, Kyiv*

<sup>2</sup>*State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of NAMS of  
Ukraine”, Kyiv*

*According to the results of the molecular-cytogenetic examination of patients with plasma cell myeloma (PCM) at different stages of therapy, chromosomal abnormalities were detected in almost 80 % of patients. Changes of chromosomes 3, 8, 11 and 13 were predominant, associated with the hyperdiploid type of chromosomal aberrations in the most of patients. IgH translocation with the involvement of chromosomes 4, 11 and 16 was detected in 15 % of patients. The obtained data indicate a significant association of the revealed chromosomal abnormalities with the risk of primary refractory to therapy and the occurrence of complications (range of Spearman coefficient from  $R_{\text{Spearman}} = 0,33$  to  $R_{\text{Spearman}} = 0,5$ ;  $p < 0,05$ ), which makes it possible to consider them as prognostic criteria for the PCM course.*

**Key words:** *plasma cell myeloma, M-gradient, Bence-Jones paraprotein, fluorescent in situ hybridization (FISH), cytogenetic abnormalities*