

КОМПЛЕКСНОЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

А.А. Солодовник¹, А.С. Мкртчян², В.А. Мисюрин¹, Л.А. Кесаева¹, Н.Н. Касаткина¹,
О.М. Вотякова¹, О.Ю. Якимович¹, Е.Г. Медведовская¹, А.С. Антипова¹, И.З. Заводнова¹,
О.А. Коломейцев¹, А.Д. Ширин¹, Е.А. Османов³, А.В. Мисюрин^{1,2}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117279 Москва, Профсоюзная ул., 104;

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Алена Александровна Солодовник alionka1363@rambler.ru

Актуальность. Множественная миелома (ММ) — злокачественное В-клеточное лимфопролиферативное заболевание с клональной пролиферацией плазматических клеток, продуцирующих моноклональный иммуноглобулин, в костном мозге и за его пределами. В настоящее время в качестве прогностических факторов исследуется широкий спектр цитогенетических аномалий и молекулярно-биологических параметров.

Цель работы — сравнительное исследование частоты, характера и клинической значимости хромосомных нарушений при ММ методами стандартной цитогенетики и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

Материалы и методы. В исследование включены 77 больных с ММ, наблюдавшихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2016–2017 гг. Пациенты были в возрасте от 34 до 77 лет, медиана — 53 года. Женщин было 42 (54,5 %), мужчин — 35 (45,5 %).

Результаты. Метод стандартного кариотипирования (G-бэндинг) позволил выявить хромосомные изменения лишь у 1 из 77 больных. Однако методом FISH были обнаружены хромосомные aberrации уже у 26 % пациентов (20 из 77). Делеции различных участков исследуемых локусов хромосом, свидетельствующих о возможном наличии гиподиплоидного клона или потери отдельных регионов, обнаружены у 1 больного только при повторном обследовании с интервалом 6 мес. Среди пациентов с хромосомными нарушениями ($n = 20$) аномалии типа частичной трисомии 11q, делеции участка q32 хромосомы 14, транслокации t(4;14)(p16;q32) и перестройки генов IGHV обнаружены у 30 % (6 из 20). У 14 из 20 больных выявлены 2 и более хромосомных нарушения. Хромосомные аномалии с большей частотой обнаруживаются на более поздних стадиях ММ (IA и IIA стадии — 0 % наблюдений с aberrациями, IIIA и IIIB — 27 и 47 % соответственно).

Заключение. FISH позволяет обнаружить хромосомные нарушения в опухолевых плазматических клетках независимо от фазы митоза. При ММ это приобретает особо важное значение в связи с низкой пролиферативной активностью плазмочитов. Кроме того, FISH позволяет обнаружить субмикроскопические, т. е. скрытые хромосомные aberrации, которые встречаются у трети больных ММ. Совершенствование панели зондов и широкое применение FISH не означает пренебрежение методами стандартной цитогенетики. G-бэндинг позволяет увидеть нарушения сразу всех хромосом в отличие от локус-специфичного FISH-анализа.

Ключевые слова: множественная миелома, цитогенетические нарушения, флуоресцентная *in situ* гибридизация

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-50-59

COMPLEX CYTOGENETIC RESEARCH OF CRYPTIC CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

A.A. Solodovnik¹, A.S. Mkrtychyan², V.A. Misyurin¹, L.A. Kesaeva¹, N.N. Kasatkina¹, O.M. Votyakova¹, O.Yu. Yakimovich¹,
E.G. Medvedovskaya¹, A.S. Antipova¹, I.Z. Zavodnova¹, O.A. Kolomeytshev¹, A.D. Shirin¹, E.A. Osmanov³, A.V. Misyurin^{1,2}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²LLC GeneTechnology; 104 Profsojuznaya St., Moscow 117279, Russia;

³Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Background. Multiple myeloma (MM) is a malignant lymphoproliferative B-cell disease characterization by clonal proliferation of plasma cells in the bone marrow and beyond its borders. Currently, a wide range of cytogenetic anomalies and molecular-biological parameters are studied as prognostic factors.

Objective: a comparative study of the frequency, features and clinical significance of chromosomal abnormalities in MM by conventional cytogenetic and fluorescent in situ hybridization (FISH) methods.

Materials and methods. 77 patients with MM, which admitted in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, were included in the study from 2016 to 2017.

Results. Chromosomal alterations were detected only in one case (1/77) by conventional cytogenetic method G-banding. However cytogenetic aberrations were revealed in 26 % of cases (20/77) using FISH. Deletions of different regions of chromosomes, indicating the possible presence of a hypodiploid clone or loss of some regions, were found in one patient in the second FISH analysis after 6 months. In the cohort of patients with chromosomal abnormalities ($n = 20$) a partial trisomy 11q, a deletion of the region q32 of the chromosome 14, a translocation $t(4;14)(p16;q32)$ and IGHV gene rearrangement were determined in 30 % (6/20) as sole anomalies. Two or more cytogenetic aberrations were identified in the remaining 14 patients. Our study confirms that chromosomal abnormalities are more likely detected at later stages of MM (IA u IIA – 0 %, IIIA u IIIB – 27 and 47 % respectively).

Conclusion. FISH allows to detect chromosomal changes in tumor plasma cells regardless of the mitosis phase. In MM, it becomes particularly important in connection with low proliferative activity of plasma cells. Additionally, in the fourth of MM patients in the study submicroscopic chromosomal aberrations were discovered using FISH. The improvement of the probe panel and the widespread use of locus specific FISH don't replace G-banding that allows to see damages of all chromosomes at once.

Key words: multiple myeloma, cytogenetic abnormalities, fluorescence in situ hybridization

Введение

Множественная миелома (ММ) — злокачественная В-клеточная лимфоидная опухоль, характеризующаяся пролиферацией опухолевых плазматических клеток в костном мозге, за его пределами и наличием моноклонового белка (парапротеина) в крови и/или моче [1]. Парапротеин циркулирует в крови и может осаждаться в различных органах и тканях. Осажденный парапротеин может трансформироваться в амилоид (белок, устойчивый к разрушению), который нарушает функцию органов и систем. При ММ наблюдаются остеолитические поражения вследствие резорбции кости и нарушения образования остеобластов — молодых osteoобразующих клеток кости. При ММ возможно угнетение нормальных ростков кроветворения с развитием анемии, тромбоцитопении и лейкопении, что приводит, наряду с другими нарушениями, к ослаблению клеточного и гуморального иммунитета. Кроме того, важное значение имеет тот факт, что миелома, как злокачественная опухоль, разворачивается в иммунокомпетентной системе.

В литературе обсуждаются 4 этапа развития (прогрессии) моноклональных плазмоклеточных болезненных состояний [2]:

- моноклональная гаммапатия неясного генеза (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)
- ↓
- тлеющая плазмоклеточная миелома
- ↓
- плазмоклеточная миелома
- ↓
- плазмоклеточный лейкоз.

MGUS характеризуется уровнем парапротеина в крови и/или моче <30 г/л, числом плазматических клеток в костном мозге <10 %, отсутствием повреж-

дения органов [3]. При тлеющей миеломе обнаруживается >10 % опухолевых клеток в костном мозге, содержание парапротеина ≥ 30 г/л, отсутствуют остеолитические повреждения, анемия и другие вторичные симптомы ММ [4]. Развитие плазмоклеточной миеломы с формированием экстрамедуллярных очагов поражения в различных органах и тканях, а также плазмоклеточный лейкоз как крайняя форма прогрессии опухоли характеризуют наиболее агрессивное течение болезни.

Все перечисленные клональные, плазмоклеточные, нозологически очерченные формы отражают 4 этапа опухолевой прогрессии и характеризуются весьма сложными хромосомными и молекулярно-генетическими нарушениями. Степень выраженности последних позволяет говорить о клональной эволюции генетических нарушений при ММ. Таким образом, обнаружение генетических поломок позволяет выделить различные клональные патологические процессы в сложной многоступенчатой модели прогрессии, которая начинается с MGUS и заканчивается плазмоклеточным лейкозом. Однако низкая пролиферативная активность опухолевых клеток на начальных этапах развития ММ — существенное ограничение для стандартного кариотипирования, поскольку анализ ограничивается только вступившими в метафазу клетками. Кроме того, некоторые хромосомные нарушения невозможно обнаружить методами стандартной цитогенетики (G-бэндинга) из-за чрезвычайно малых размеров поврежденных участков в хромосоме — так называемых скрытых хромосомных aberrаций. Все эти ограничения вполне преодолеваются популярным в клинике молекулярно-цитогенетическим методом — флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) во всех ее вариациях [5–13].

В период первичной диагностики ММ обнаруживаются различные хромосомные нарушения.

К ним относятся, например, гипердиплоидность за счет трисомии 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21-й хромосом, гиподиплоидность за счет моносомии хромосом, а также транслокации с вовлечением участков генов, кодирующих вариабельные области тяжелых цепей иммуноглобулинов — IGHV. Статус ploидности хромосом и перестройка IGHV-генов — это 2 основных параметра, определяющих распределение больных в прогностические группы. Гиподиплоидный набор хромосом, а также транслокации t(4;14)(p16;q32) и t(14;16)(q32;q23) определяют неблагоприятный прогноз при ММ [14, 15]. В то же время гипердиплоидный набор хромосом, t(11;14)(q13;q32) характеризуют ММ с меньшим риском прогрессирования [16–18].

По мере прогрессирования болезни обычно возрастает пролиферативная активность опухолевых клеток и увеличивается число вторичных хромосомных нарушений. Они характеризуются del(13)(q14), del(17)(p13), del(1)(p36) и dup(1)(q21). Обозначенные участки хромосом богаты генами, которые также связаны с клеточной пролиферацией и апоптозом. Показано, что вышеупомянутые нарушения имеют неблагоприятное прогностическое значение [15, 19, 20]. Нарушения в участках хромосом 8q24, 11q13–q23, 14q32 наблюдаются в 15–20 % случаев ММ, однако их прогностическое значение не определено. Настоящая работа посвящена комплексной цитогенетической оценке хромосомных aberrаций у больных ММ как первому этапу реализации программы по изучению экспрессии раково-тесткулярных генов.

Цель настоящей работы заключается в сравнительном исследовании частоты, характера и клинической значимости хромосомных нарушений при ММ с использованием методов стандартной цитогенетики и FISH.

Материалы и методы

Характеристика пациентов

Исследованы образцы аспирата костного мозга, полученные у 77 больных с диагнозом ММ, наблюдавшихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2016–2017 гг. Мужчин было 35 (45,5 %), женщин — 42 (54,5 %). Медиана возраста составила 53 года (разброс от 34 до 77 лет). Пациентов с первично установленным диагнозом было 43, в ремиссии — 27, с рецидивом/прогрессией болезни — 7. Больные с ММ были распределены согласно системе стадирования Дюри–Сальмон (IA стадия — 11 %, IIA — 8 %, IIIA — 62 %, IIIB — 19 %).

Культивирование и фиксация образцов костного мозга

Гепаринизированный аспират костного мозга был обработан согласно стандартной методике культивирования для дифференциального G-окрашивания

хромосом. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки. Инкубацию осуществляли 24 и 48 ч при 37 °C. В «дневные» культуры за 40 мин до завершения инкубационного периода добавляли 80 мкл 0,25 % колхицина, в «ночные» культуры колхицин добавлялся одновременно с посадкой материала. Затем с целью гипотонии использовали раствор KCl при 37 °C и осуществляли несколько промывок фиксирующим раствором Карнуа (1/4 часть уксусной кислоты и 3/4 96 % метилового спирта). Суспензию клеток раскапывали на стекла над водяной баней. Окраску проводили 0,25 % раствором трипсина и красителем Гимза.

Цитогенетическое исследование

Анализировали не менее 20 метафаз. Для кариотипирования использовали полуавтоматическую программу IKAROS (MetaSystems). Кариотип описывали согласно требованиям международной системы номенклатуры хромосом ISCN 2013. Стандартный хромосомный анализ был успешно проведен всем исследуемым больным.

Молекулярно-цитогенетический анализ FISH проводили согласно инструкции производителя (Kreatech). Технологически методика включает 5 этапов:

- 1) подготовка клеток;
- 2) предобработка клеток ($2 \times \text{SSC}$, 70, 80 и 100 % этанол);
- 3) денатурация (5 мин при 75 °C);
- 4) гибридизация (1 ночь при 37 °C);
- 5) постгибридизационная отмывка ($0,4 \times \text{SSC}/0,3 \%$ Twin 20, $2 \times \text{SSC}/0,1 \%$ Twin 20, 70, 80 и 100 % этанол).

Использовались зонды фирмы Kreatech IGH (14q32) Break, CCND/IGHt(11;14) Fusion, 11q23/DLEU1 (13q14), TP53(17p13)/ATM(11q22), 6q21/MYC(8q24), 1q21/SRD(1p36), FGFR3/IGHt(4;14) Fusion. Анализировали 100 клеток. Порог чувствительности — до 5 %.

Статистический анализ

В настоящем исследовании больные разделены на 2 группы. В 1-ю включены пациенты с хромосомными нарушениями ($n = 20$), во 2-ю — без хромосомных аномалий ($n = 57$). Согласно критерию Колмогорова–Смирнова количественные данные имели нормальное распределение. В связи с этим для дальнейшего статистического анализа использовались параметрические критерии. Для изучения корреляции хромосомных изменений с качественными параметрами применяли критерий χ^2 . Для анализа связи хромосомных аномалий с количественными параметрами (возраст больных, уровень лейкоцитов, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина и β_2 -микроглобулина) использовали t-критерий. Общую

выживаемость анализировали по методу Каплана–Майера. Для построения кривой общей выживаемости продолжительность жизни рассчитывали от даты проведения цитогенетического исследования до летального исхода или даты последней информации о больном. Для сравнения показателей общей выживаемости у пациентов с хромосомными изменениями и без таковых использовали логранговый тест. Количественные данные представлены медианой значений и пограничными значениями в пределах доверительного интервала 0,95. Различия между группами считались статистически значимыми при значениях $p < 0,05$. Статистический анализ проводили с помощью программного пакета Statistica-10.

Результаты

Клинические варианты ММ 77 больных, включенных в настоящее исследование, отражены в табл. 1. В табл. 2 показано число пациентов с хромосомными aberrациями и без них в зависимости от момента проведения исследования. У 76 из 77 больных описан нормальный кариотип (46, XX/46, XY). Множественные хромосомные нарушения обнаружены лишь у 1 пациентки с кариотипом: 46~49,XX,der(1)t(1;9)(p32;p24)del(1)(q12;q24),der(3)t(3;7)(q29;q22),+4,der(6)t(6;20)(q12;q13),der(6)t(6;22)(q21;q1?)del(6)(p11),+del(6)(p21),del(8)(p21),der(9)t(1;9)(p32;p24),dup(9)(q3?2q34),+del(9)(q3),+11,der(12)ins(7;12)(p15;p13q24)del(7)(q10),del(12)(q12),+der(12)t(12;13)(p12;q14),14,+18,+18,der(1)t(1;19)(q22;q13)dup(1)(q22q25),der(20)t(1;20)(q21;p13),der(20)t(X;20;6;20)(q13;p12;p12;q13),i(21)(q10)[cp15].

Таблица 1. Клинические варианты ММ ($n = 77$)

Клинический вариант ММ	Число больных, n (%)	Хромосомные нарушения (FISH), n (%)
Симптоматическая	75 (97)	20 (26)
Тлеющая (бессимптомная)	1 (1,5)	0
Несекретирующая	1 (1,5)	0
Всего	77 (100)	20 (26)

У 20 (26 %) из 77 больных ММ хромосомные нарушения обнаружены при помощи FISH-исследования. У больных с тлеющей и несекретирующей ММ aberrаций не выявлено. Среди 20 пациентов с хромосомными аномалиями 15 были с первичным диагнозом, 1 — с рецидивом и 4 — с прогрессированием ММ. У больных с хромосомными нарушениями имели место более поздние стадии ММ по Дюри–Сальмон, в ряде случаев отмечался

повышенный уровень креатинина ($p = 0,0004$) и более низкий — гемоглобина ($p = 0,03$) (табл. 3).

Таблица 2. Хромосомные нарушения в разных группах больных ММ ($n = 77$)

Группа больных	Всего, n (%)	С хромосомными изменениями, n (%)
С первично установленным диагнозом	43 (100)	15 (35)
В ремиссии	27 (100)	3 (11)
С рецидивом/прогрессией болезни	7 (100)	2 (28)

Наиболее частыми цитогенетическими нарушениями были dup(11)(q12–23) (35 %), del(13)(q14) (35 %), del(14)(q32) (25 %), dup(1)(q21) (20 %) и t(11;14) (15 %). Из 20 больных ММ у 14 (11 — первичные, 3 — с прогрессированием) хромосомные нарушения были комплексными (табл. 4).

Делеции различных участков большого числа хромосом возможны вследствие частичной или полной их моносомии (гиподиплоидии). Такие нарушения были обнаружены у 1 больного, которому FISH проводили повторно спустя 6 мес после первого исследования с отрицательным результатом (без хромосомных изменений). Продолжительность жизни пациента с t(11;14), делецией гена *IGHV* и делецией участка q14 хромосомы 13 составила всего 3 мес после установления диагноза ММ. У больной со сложным кариотипом при помощи FISH-анализа были выявлены делеции участков q14 хромосомы 13 и q24 хромосомы 8.

Наличие хромосомных аномалий сокращает сроки жизни больных и ухудшает показатели общей выживаемости в сравнении с пациентами без таковых ($p = 0,00171$). Медиана общей выживаемости в группе с хромосомными изменениями составила 11,3 мес, при их отсутствии медиана не достигнута (см. рисунок).

Обсуждение

Предполагается, что первичные нарушения происходят на ранних стадиях становления ММ, а вторичные на более поздних и поэтому ассоциируются с более агрессивным течением опухоли [21]. Многие первичные транслокации являются простыми реципрокными и связаны с онкогеном и с одним из энхансеров иммуноглобулинов. Такие транслокации опосредуются ошибками в 1 из 3 механизмов модификации ДНК В-клеток: синтез иммуноглобулиновых классов, что сопровождается ошибкой в соматической гипермутации, и, реже, VDJ-рекомбинация [22]. Как известно, транслокация с участием *IGHV*

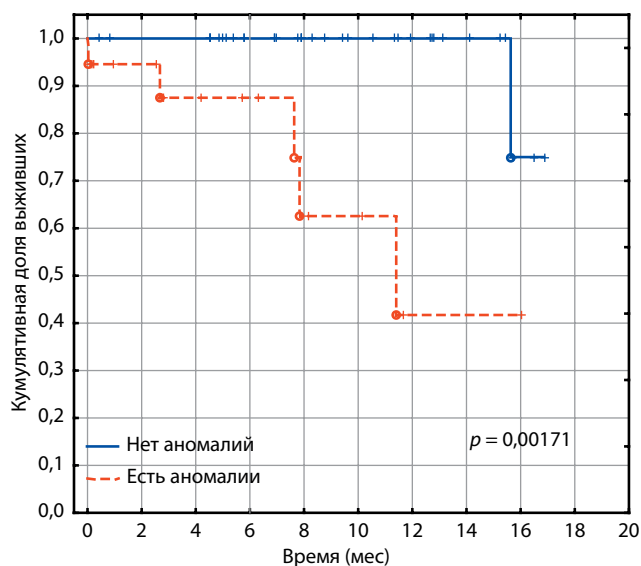
Таблица 3. Результаты FISH-исследования в группах больных с различными демографическими и клинико-гематологическими параметрами

Показатель	Всего	Больные без хромосомных изменений	Больные с хромосомными изменениями	p
Возраст, лет	53 (34–77)	56 (38–75)	56 (34–77)	0,594
Пол				
Женщины	42 (54,5 %)	32 (56,1 %)	10 (50 %)	0,635
Мужчины	35 (45,5 %)	25 (43,9 %)	10 (50 %)	
Стадия по Дюри–Сальмон				
IA	9 (12 %)	9 (100 %)	0	0,062
IIA	6 (8 %)	6 (100 %)	0	0,145
IIIA	46 (61 %)	32 (69,5 %)	14 (30,5 %)	0,722
IIIB	14 (19 %)	7 (50 %)	7 (50 %)	0,078
Тип тяжелой цепи				
IgG	47 (62,6 %)	36 (76,5 %)	11 (23,5 %)	0,407
IgA	10 (13,4 %)	7 (70 %)	3 (30 %)	0,797
Другие	18 (24 %)	12 (67 %)	6 (33 %)	0,463
Тип легкой цепи				
Каппа	46 (61,3 %)	35 (76 %)	11 (24 %)	0,497
Лямбда	29 (38,7 %)	20 (69 %)	9 (31 %)	
Уровень гемоглобина (г/дл)				
<8,5	17 (22 %)	10 (59 %)	7 (41 %)	0,030
8,5–10,0	11 (14 %)	8 (73 %)	3 (27 %)	
>10,0	46 (60 %)	36 (78 %)	10 (22 %)	
Нет данных	3 (4 %)	–	–	
Уровень альбумина (г/л)				
<35	13 (17 %)	6 (46 %)	7 (54 %)	0,169
≥35	45 (58 %)	35 (78 %)	10 (22 %)	
Нет данных	19 (25 %)	–	–	
Уровень креатинина (мкмоль/л)				
≤110	55 (71 %)	45 (82 %)	10 (18 %)	0,0004
>110	16 (21 %)	6 (38 %)	10 (62 %)	
Нет данных	6 (8 %)	–	–	
Уровень кальция (ммоль/л)				
≤2,5	42 (54,5 %)	32 (76 %)	10 (24 %)	0,183
>2,5	17 (22 %)	11 (65 %)	6 (35 %)	
Нет данных	18 (23,5 %)	–	–	
Уровень лактатдегидрогеназы (Е/л)				
≤450	49 (64 %)	34 (69 %)	15 (31 %)	0,818
>450	10 (13 %)	6 (60 %)	4 (40 %)	
Нет данных	18 (23 %)	–	–	
Уровень β ₂ -микроглобулина (мг/л)				
<3,5	19 (25 %)	16 (84 %)	3 (16 %)	0,100
3,5–5,5	12 (16 %)	8 (67 %)	3 (33 %)	
>5,5	9 (12 %)	5 (55,5 %)	4 (44,5 %)	
Нет данных	37 (48 %)	–	–	

Таблица 4. Хромосомные нарушения, обнаруженные методом FISH у больных ММ (n = 20)

Название зонда и выявленные изменения в клетке	Больные, получающие лечение					Первичные больные														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
IGH (14q32) Break																				
(IGHx1)																				
t(?;14)																				
FGFR3/IGH t(4;14) Fusion																				
t(4;14)																				
(FGFR3x1)																				
t(4;?;14)																				
CCND1/IGH t(11;14) Fusion																				
t(11;14)																				
TP53 (17p13)/ATM (11q22)																				
(TP53x3)																				
(TP53x4)																				
(TP53x1)																				
6q21/MYC (8q24)																				
(MYCx3)																				
(MYCx1)																				
(6q21x3)																				
(6q21x1)																				
1q21/SRD (1p36)																				
(1q21x3)																				
(1q21x4)																				
(SRDx1)																				
(1q21x1)																				
MM 11q23/DLEU (13q14)																				
(11q12–q23x3)																				
(11q12–q23x4)																				
(11q23x3)																				
(11q23x4)																				
(11q23x1)																				
(DLEUXx1)																				
(DLEUXx4)																				

Примечание. Выделенные цветом ячейки обозначают наличие того или иного хромосомного нарушения; в скобках указан ген или регион хромосомы с количеством сигналов, обнаруженных в одной интерфазной клетке; t – транслокация.



Общая выживаемость больных ММ с хромосомными нарушениями ($n = 20$) и без таковых ($n = 57$)

увеличивает возможность прогрессирования болезни от 50 % при MGUS и до 90 % в клеточных линиях миеломы человека [22, 23]. В нашем исследовании транслокация $t(11;14)$ выявлена у 3 первичных больных (4 %). Интересно отметить, что у одного из них данное нарушение обнаружено совместно с потерей одной из деривативных хромосом, с делецией участка $q32$ хромосомы 14 (возможно, моносомия 14) и делецией участка $q14$ хромосомы 13. Продолжительность жизни больного составила 3 мес после установления диагноза ММ. У другого больного с $t(11;14)$ наблюдается дополнительная деривативная хромосома от транслокации $t(11;14)$, у третьего — дополнительная деривативная хромосома от транслокации $t(11;14)$ и частичная трисомия участка $q21$ хромосомы 1. Транслокация $t(4;14)(p16;q32)$ имела место у 3 больных (15 %). Данная транслокация включает 2 белок-кодирующих гена, которые располагаются на участке $p16$ хромосомы 4. Первый ген — *MMSET* (SET-домен ММ), его белок гомологичен гистону метилтрансфераз. Второй ген — *FGFR3* (рецептор 3 фактора роста фибробластов), онкогенный рецептор тирозинкиназы [21]. Как было упомянуто ранее, $t(4;14)(p16;q32)$ является криптогенетическим нарушением, которое можно обнаружить, только с помощью FISH или полимеразной цепной реакции. Транслокация $t(4;14)$ тесно связана с моносомией хромосомы 13 или делецией длинного плеча хромосомы 13 и обычно указывает на низкие показатели выживаемости больных [15, 24–26]. Данное сочетание в нашей когорте встретилось только у 1 больного. У других же 2 пациентов $t(4;14)$ обнаружена как единственное нарушение. В настоящей работе одним из наиболее часто встречающихся нарушений оказалась делеция региона $q32$ хромосо-

мы 14 — гена *IGHV*. Она имела место у 4 первичных больных и у 1 пациента на фоне противоопухолевого лечения. У первичных больных помимо делеции гена *IGHV* наблюдались дупликации участков $q24$ и $q12-q23$ хромосом 8 и 11 соответственно, $t(11;14)$ и дополнительная деривативная хромосома от этой же транслокации, перестройки генов *IGHV*; также она встречалась как единственное нарушение. У больного с делецией гена *IGHV*, находящегося на терапии, обнаружены делеции различных участков большого числа хромосом, что возможно вследствие частичной или полной моносомии хромосом (гиподиплоидии). Пациент оказался резистентным к терапии и умер спустя месяц после проведения FISH-исследования.

Как показывают ранние публикации, при $-13/13q$ наблюдается гиперэкспрессия опухолевого супрессора RB1, что может приводить к снижению регуляции клеточного цикла опухолевых клеток [27]. В нашем исследовании $del(13)(q14)$ встречается у 7 (35 %) больных (4 — первичные, 3 — с прогрессированием). У первичных больных одновременно с $del(13)(q14)$ встречаются: дупликация участка $q12-q23$ хромосомы 11, $t(11;14)$, дупликация участка $q21$ хромосомы 6. Больные с такими дополнительными нарушениями хорошо поддаются противоопухолевому лечению и достигают состояния стабилизации. В то же время у пациента с $del(13)(q14)$, потерей участков $p13$ и $q23$ хромосом 17 и 11 соответственно, а также наличием $t(4;14)$ заболевание характеризовалось агрессивным течением [15–18, 26, 28]. У 2 больных с $del(13)(q14)$, получающих терапию, наблюдались делеции участков большого числа хромосом, что резко ухудшает прогноз. Только у одной из этих больных было обнаружено множество хромосомных нарушений при помощи стандартного кариотипирования. Пациентка умерла через 3 мес после цитогенетического исследования. Увеличение числа копий $q21$ хромосомы 1 встречается у 35–40 % больных ММ и часто совпадает с делецией $p36$ хромосомы 1, которое наблюдается в 30 % случаев. Оба нарушения связаны с плохим прогнозом [19, 29–32]. Увеличение числа копий участка $q21$ хромосомы 1 не совпало с $del(1)(p36)$ ни у одного больного. Однако в 1 наблюдении в процессе лечения обнаруживались $del(1)(p36)$ и $del(1)(q21)$, а пациент оказался резистентным к терапии и с агрессивным течением болезни.

Гемизиготная делеция хромосомы 17 и делеция p -плеча встречается у 10 % первичных больных на более поздних стадиях болезни [15, 33, 34]. На коротком плече хромосомы 17 расположен ген опухолевой супрессии *TP53*. Показано, что при ММ делеция лишь гена *TP53* встречается менее чем в 1 %, а делеция $17p13$ наблюдается в 25–37 % случаев. Ген *TP53* принимает участие в регуляции транскрипции, репарации ДНК и апоптозе. При ММ $del(17)(p13)$

связана с агрессивным фенотипом болезни, экстрамедуллярным распространением и худшей выживаемостью [35–39]. В нашей работе делеция участка p13 хромосомы 17 обнаружена в составе сложных кариотипов у 2 больных, что указывает на более позднюю стадию заболевания с агрессивным течением.

У единственной больной с множеством хромосомных aberrаций, выявленных с помощью G-бэндинга при кариотипировании, одновременно проведено исследование методом FISH. При этом обнаружены частичная трисомия участка q12-→q23 хромосомы 11, делеция участка q24 хромосомы 8, делеция участка q14 хромосомы 13, что может указывать на более поздние этапы течения заболевания. Больная умерла через 3 мес после повторного обследования, продолжительность жизни от времени установления диагноза составила 7 лет. Известно, что при обнаружении хромосомных нарушений методом дифференциальной окраски в делящихся клетках ММ отличается агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом.

Заключение

В настоящей работе были проведены стандартное цитогенетическое исследование и FISH-анализ 77 больным с ММ. У 20 из них хромосомные нарушения обнаружены FISH-исследованием и лишь у 1 пациента хромосомные изменения были также зафиксированы при помощи стандартного кариотипирования. Хромосомные изменения, приводящие к потере участков хромосом, имели более неблагоприятный прогноз с общей продолжительностью жизни больных 3–6 мес. Таким образом, FISH-исследование позволило идентифицировать нарушения, которые либо присутствовали только в неделящихся интерфазных клетках, либо существовали как субмикроскопические aberrации. Однако нельзя пренебрегать исследованием кариотипа методом дифференциального окрашивания (G-бэндинг), который позволяет увидеть нарушения всех хромосом в отличие от локус-специфичного FISH-анализа.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2017. P. 243.
2. Morgan G.J., Walker B.A., Davies F.E. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012;12(5):335–48. DOI: 10.1038/nrc3257. PMID: 22495321.
3. Kyle R.A., Durie B.G., Rajkumar S.V. et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24(6):1121–7. DOI: 10.1038/leu.2010.60. PMID: 20410922.
4. Kyle R.A., Remstein E.D., Therneau T.M. et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *New Engl J Med* 2007;356(25):2582–90. DOI: 10.1056/NEJMoa070389. PMID: 17582068.
5. Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78(11):6633–7. PMID: 6273878.
6. Luke S., Shepelsky M. FISH: recent advances and diagnostic aspects. *Cell Vis* 1998;5(1):49–53. PMID: 9660726.
7. Csaki A., Garwe F., Steinbrück A. et al. A parallel approach for subwavelength molecular surgery using gene-specific positioned metal nanoparticles as laser light antennas. *Nano Lett* 2007;7(2):247–53. DOI: 10.1021/nl061966x. PMID: 17249738.
8. Schröck E., du Manoir S., Veldman T. et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494–7. PMID: 8662537.
9. Speicher M.R., Gwyn Ballard S., Ward D.C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12(4):368–75. DOI: 10.1038/ng0496-368. PMID: 8630489.
10. Liehr T., Pellestor F. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), chapter Molecular Cytogenetics: The Standard FISH and PRINS Procedure. 2009. Pp. 23–34.
11. Guan X.Y., Trent J.M., Meltzer P.S. Generation of band-specific painting probes from a single microdissected chromosome. *Hum Mol Genet* 1993;2(8):1117–21. PMID: 8401492.
12. Guan X.Y., Zhang H., Bittner M. et al. Chromosome arm painting probes. *Nat Genet* 1996;12(1):10–1. DOI: 10.1038/ng0196-10. PMID: 8528238.
13. Pinkel D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(9):2934–8. PMID: 3458254.
14. Smadja N.V., Bastard C., Brigaudeau C. et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001;98(7):2229–38. PMID: 11568011.
15. Fonseca R., Blood E., Rue M. et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;101(11):4569–75. DOI: 10.1182/blood-2002-10-3017. PMID: 12576322.
16. Bergsagel P.L., Kuehl W.M. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23(26):6333–8. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.021. PMID: 16155016.
17. Fonseca R., Bergsagel P.L., Drach J. et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23(12):2210–21. DOI: 10.1038/leu.2009.174. PMID: 19798094.
18. Fonseca R., Blood E.A., Oken M.M. et al. Myeloma and the t(11;14) (q13;q32): evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002;99(10):3735–41. PMID: 11986230.
19. Walker B.A., Leone P.E., Chiecchio L. et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 2010;116(15):e56–65. DOI: 10.1182/blood-2010-04-279596. PMID: 20616218.
20. Tricot G., Barlogie B., Jagannath S. et al. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or

- complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* 1995;86(11):4250–6. PMID: 7492784.
21. Kuehl W.M., Bergsagel P.L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):175–87. DOI: 10.1038/nrc746. PMID: 11990854.
 22. Bergsagel P.L., Kuehl W.M. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20(40):5611–22. DOI: 10.1038/sj.onc.1204641. PMID: 11607813.
 23. Bergsagel P.L., Chesi M., Nardini E. et al. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(24):13931–6. PMID: 8943038.
 24. Keats J.J., Reiman T., Maxwell C.A. et al. In multiple myeloma t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003;101(4):1520–9. DOI: 10.1182/blood-2002-06-1675. PMID: 12393535.
 25. Gertz M.A., Lacy M.Q., Dispenzieri A. et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005;106(8):2837–40. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1411. PMID: 15976175.
 26. Avet-Loiseau H., Attal M., Moreau P. et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 2007;109(8):3489–95. DOI: 10.1182/blood-2006-08-040410. PMID: 17209057.
 27. Elnenaei M.O., Hamoudi R.A., Swansbury J. et al. Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36(1):99–106. DOI: 10.1002/gcc.10140. PMID: 12461754.
 28. Drach J., Ackermann J., Fritz E. et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998;92(3):802–9. PMID: 9680348.
 29. Qazilbash M.H., Saliba R.M., Ahmed B. et al. Deletion of the short arm of chromosome 1 (del 1p) is a strong predictor of poor outcome in myeloma patients undergoing an autotransplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(9):1066–72. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.05.014. PMID: 17697969.
 30. Wu K.L., Beverloo B., Lokhorst H.M. et al. Abnormalities of chromosome 1p/q are highly associated with chromosome 13/13q deletions and are an adverse prognostic factor of the outcome of high-dose chemotherapy in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;136(4):615–23. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06481.x. PMID: 17223915.
 31. Chang H., Ning Y., Qi X. et al. Chromosome 1p21 deletion is a novel prognostic marker in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007;139(1):51–4. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06750.x. PMID: 17854306.
 32. Hanamura I., Stewart J.P., Huang Y. et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* 2006;108(5):1724–32. DOI: 10.1182/blood-2006-03-009910. PMID: 16705089.
 33. Avet-Loiseau H., Li J.Y., Godon C. et al. P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999;106(3):717–9. PMID: 10468863.
 34. Liebisch P., Wendl C., Wellmann A. et al. High incidence of trisomies 1q, 9q, and 11q in multiple myeloma: results from a comprehensive molecular cytogenetic analysis. *Leukemia* 2003;17(12):2535–7. DOI: 10.1038/sj.leu.2403153. PMID: 14523465.
 35. Chang H., Qi C., Yi Q.L. et al. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood* 2005;105(1):358–60. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1363. PMID: 15339849.
 36. Mazars G.R., Portier M., Zhang X.G. et al. Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines. *Oncogene* 1992;7(5):1015–8. PMID: 1373872.
 37. Corradini P., Inghirami G., Astolfi M. et al. Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia* 1994;8(5):758–67. PMID: 8182933.
 38. Neri A., Baldini L., Trecca D. et al. p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood* 1993;81(1):128–35. PMID: 8417784.
 39. Preudhomme C., Facon T., Zandeck M. et al. Rare occurrence of p53 gene mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1992;81(3):440–3. PMID: 1390218.

Вклад авторов

А.А. Солодовник: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;
 А.С. Мкртчян: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;
 В.А. Мисюрин: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;
 Л.А. Кесаева: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;
 Н.Н. Касаткина: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;
 О.М. Вотякова: предоставление материалов исследования;
 О.Ю. Якимович: предоставление материалов исследования;
 Е.Г. Медведовская: предоставление материалов исследования;
 А.С. Антипова: предоставление материалов исследования;
 И.З. Заводнова: предоставление материалов исследования;
 О.А. Коломейцев: предоставление материалов исследования;
 А.Д. Ширин: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, подготовка рукописи;
 Е.А. Османов: концепция и дизайн, предоставление материалов исследования, подготовка рукописи;
 А.В. Мисюрин: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи.

Authors' contributions

A.A. Solodovnik: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation;
A.S. Mkrtchyan: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation;
V.A. Misyurin: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;
L.A. Kesaeva: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;
N.N. Kasatkina: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;
O.M. Votyakova: provision of study materials;
O.Yu. Yakimovich: provision of study materials;
E.G. Medvedovskaya: provision of study materials;
A.S. Antipova: provision of study materials;
I.Z. Zavodnova: provision of study materials;
O.A. Kolomeytsev: provision of study materials;
A.D. Shirin: data collection and processing, provision of study materials, article preparation;
E.A. Osmanov: concept and design, provision of study materials, article preparation;
A.V. Misyurin: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation.

ORCID авторов/ORCID of authors

A.A. Солодовник/A.A. Solodovnik: <https://orcid.org/0000-0001-8399-057X>
A.C. Мкртчян/A.S. Mkrtchyan: <https://orcid.org/0000-0002-0638-213X>
B.A. Мисюрин/V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
Л.А. Кесаева/L.A. Kesaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8277-8649>
Н.Н. Касаткина/N.N. Kasatkina: <https://orcid.org/0000-0002-4735-977X>
О.А. Коломейцев/O.A. Kolomeytsev: <https://orcid.org/0000-0003-3430-8540>
А.С. Антипова/A.S. Antipova: <https://orcid.org/0000-0002-1731-8336>
И.З. Заводнова/I.Z. Zavodnova: <https://orcid.org/0000-0001-6674-8634>
Е.Г. Медведовская/E.G. Medvedovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4309-2473>
А.Д. Ширин/A.D. Shirin: <https://orcid.org/0000-0003-3244-7774>
Е.А. Османов/E.A. Osmanov: <https://orcid.org/0000-0002-3067-1601>
А.В. Мисюрин/A.V. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Благодарность. Авторы выражают благодарность ООО «ГеноТехнология», при поддержке которого была выполнена настоящая работа.

Acknowledgments. Authors would like to thank LLC GeneTechnology for supporting this research.