© *Мішаріна Ж. А., Сітько В. В., Мінченко Ж. М., Полубень Л. О.,

УДК 616-006.441: 616-006.448

Мішаріна Ж. А., Сітько В. В., Мінченко Ж. М., Полубень Л. О., Бебешко В. Г.

РОЛЬ ТРАНСЛОКАЦІЇ t(4;14) ТА ДЕЛЕЦІЙ 13q В ДІАГНОСТИЦІ ТА ПРОГНОЗІ ПЕРЕБІГУ ЗЛОЯКІСНИХ В-КЛІТИННИХ НОВОУТВОРЕНЬ

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини

НАМН України» (м. Київ)

***Національний медичний університет імені О. О. Богомольця**

(м. Київ)

larysa.poluben@gmail.com

Дана робота є фрагментом НДР «Визначення ролі генетичних та епігенетичних змін в геномі соматичних клітин у патогенезі хронічних лімфопроліферативних захворювань, їх діагностичної та прогностичної значущості», № державної реєстрації 0113U002317.

Вступ. Молекулярно-цитогенетичні порушення при злоякісних В-клітинних новоутвореннях є досить поширеними та включають як структурні, так і кількісні аномалії хромосом. Більшість хромосомних аномалій представлені транслокаціями та делеціями, які можуть змінювати агресивність захворювання і впливати в цілому на його перебіг [1, 8]. Так, хромосомна транслокація t(4;14) призводить до одночасної надекспресії двох генів: *FGFR3* (фактор росту фібробластів рецептора 3) і *MMSET* (декілька доменів мієломи SET), обидва з яких мають потенційну онкогенну активність. Дана транслокація реєструється приблизно в 15 % випадків множинної мієломи (ММ) і корелює зі скороченням загальної виживаності таких хворих [5, 6]. Значно рідше *FGFR3* транслокація зустрічається за дифузної крупноклітинної В-лімфоми (ДКВЛ). Делеції хромосоми 13 пов'язують з агресивним клінічним перебігом захворювання, особливо в поєднанні з іншими генетичними аномаліями [7, 12]. Так, наявність делеції довгого плеча хромосоми 13 (13q) у хворих з транслокацією t(4;14) є несприятливим фактором, який ускладнює прогноз та може свідчити про первинну резистентність до терапії [5]. Делеції 13q виявляють майже в 50 % випадків ММ, і також є присутніми при інших злоякісних В-клітинних новоутвореннях, в тому числі і ДКВЛ [4, 9].

Метою дослідження було визначення ролі змін хромосом 4, 13 та 14, в тому числі транслокації t(4;14), делецій 13q13 та 13q34 в субстратних клітинах кісткового мозку у хворих на ДКВЛ та ММ за допомогою методу флуоресцентної in situ гібридизації (FISH) для надання прогностичних оцінок щодо перебігу захворювання.

Об'єкт і методи дослідження. Молекулярно-цитогенетичне дослідження було проведено на зразках субстратних клітин кісткового мозку 30 хворих на ДКВЛ і 70 хворих на ММ. Вік хворих на момент встановлення діагнозу коливався від 5 до 79 років та в середньому складав у хворих на ДКВЛ – 47,30 ± 3,61 та 55,61 ± 1,08 – у пацієнтів з ММ. Середній вік хворих на В-клітинні неоплазії становив 53,12 ± 1,36 років, з них 15 (15 %) осіб були віком до 40 років. 54 (54 %) проаналізованих зразків клітин кісткового мозку були отримані від пацієнтів чоловічої статі та 46 (46 %) – жіночої статі.

Група контролю була сформована з десяти практично здорових осіб віком від 16 до 67 років (в середньому 48,20 ± 4,88). Основна мета створення та дослідження групи контролю була спрямована на перевірку якості проби та встановлення граничного відсотку клітин з хибно-позитивним сигналом.

Пацієнтів та осіб групи контролю було проінформовано про мету та завдання досліджень і отримано у них згоду.

FISH аналіз проводили на 24-годинних нестимульованих культурах клітин кісткового мозку та біопсійному матеріалі лімфатичних вузлів зафіксованих в парафіні за допомогою локус специфічних ДНК зондів: Vysis IGH/FGFR3 DF FISH Probe Kit та Vysis LSI D13S319 (13q14.3) Spectrum Orange/Vysis LSI 13q34 Spectrum Green FISH Probe Kit у відповідності до інструкції виробника Abbott Molecular, США.

Аналіз результатів проводили на програмно-апаратному комплексі CytoVision (Applied Imaging, UK) на базі мікроскопа Olympus BX51, Японія. Для візуалізації сигналів проб Vysis використовували фільтри: DAPI /ORANGE/ GREEN/AQUA. У кожному випадку аналізували не менше 200 інтерфазних ядер з чіткими сигналами.

Для визначення меж норми для проб Vysis IGH/FGFR3 DF FISH Probe Kit і Vysis LSI D13S319 (13q14.3) Spectrum Orange/Vysis LSI 13q34 Spectrum Green FISH Probe Kit було проаналізовано не менше 1000 ядер лімфоцитів периферичної крові та кісткового мозку кожного із десяти практично здорових донорів.

Для проби Vysis IGH/FGFR3 DF за нормальний вважався патерн сигналів з двома червоними (*FGFR3*, Orange) та двома зеленими (*IGH*, Green) сигналами – **2O:2G**. За наявності транслокації t(4;14)(p16;q32) в ядрах визначали один червоний, один зелений і два змішаних (fusion – **F**) зелено-червоних сигнали хромосом 4 і 14 – 1**O:1G:2F**. В проаналізованих ядрах практично здорових донорів транслокації t(4;14)(p16;q32) не визначено.

Для проби Vysis LSI D13S319/Vysis LSI 13q34 за нормальний вважався патерн сигналів з подвійними жовтими сигналами та подвійними зеленими

Таблиця

Характеристика хворих на В-клітинні новоутворення із урахуванням перебудов хромосом 4, 13 та 14

Випадки	FGFR3		13q	
	Транслокація t(4;14) (p16;q32)	Не виявлено	Делеція	Не виявлено
Середній вік хворих (діапазон)	58,5 (35-68)	52,8 (5-79)	52,4 (11-74)	53,4 (5-79)
Стать (n)				
чоловіча	3 (6)	51 (94)	15 (31)	(69)
жіноча	3 (6)	43 (94)	16 (31)	(69)
Діагноз (n)				
ДКВЛ	1 (6)	29 (94)	10 (31)	20 (69)
ММ	5 (6)	65 (94)	21 (31)	49 (69)

сигналами – **2O**(13q14.3, Orange)x**2G**(13q34, Green), а за позитивний – патерн сигналів **1O**(13q14.3, Orange) x**2G**(13q34, Green), **2O**(13q14.3, Orange)x**1G**(13q34, Green) та **1O**(13q14.3, Orange)x**1G**(13q34, Green). Граничний рівень (cutoff level) сигналів, що відповідав розподілу **1O:2G** та **2O:1G** для проби Vysis LSI D13S319/Vysis LSI 13q34 складав 5 %.

Статистична обробка даних проводилася за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0.

Результати досліджень та їх обговорення. При молекулярно-цитогенетичному дослідженні субстратних клітин кісткового мозку в 33 % (33/100) випадків у хворих на злоякісні В-клітинні новоутворення було зареєстровано зміни хромосом 4, 13 та 14 (**табл.**).

За даними літератури транслокація хромосом 4 та 14 зустрічається переважно в плазматичних клітинах хворих на ММ [5, 6]. Проте реєструються поодинокі випадки даної транслокації при інших типах В-клітинних новоутворень. Bacher U. et al. в своїх дослідженнях виявили транслокацію t(4;14)(p16;q32) у двох хворих на лімфому [2]. Вони повідомляють, що ці два випадки демонструють генетичну гетерогенність В-клітинних лімфом. Тому, пояснити імунофенотипічні зміни при різних злоякісних лімфомах буде ймовірніше після молекулярно-цитогенетичної діагностики субстратних клітин лімфом [2]. За результатами наших досліджень хромосомна транслокація t(4;14), що призводить до надекспресії гену *FGFR3,* детектувалась в 6 % хворих на злоякісні В-клітинні новоутворення, з них тільки в одного хворого на ДКВЛ. У хворих на ММ транслокація t(4;14) було виявлено у 5 із 70 випадків. Згідно даних літератури за надекспресії гену *FGFR3* клітинні лінії мієломи в культурі характеризуються хіміорезистентністю, що узгоджується з поганою клінічною відповіддю на терапію пацієнтів з виявленою транслокацією t(4;14)(p16.3;q32.3) [5, 6]. В нашому дослідженні жоден із п'яти хворих на ММ з транслокацію t(4;14) не мав повної відповіді на проведену терапію. У двох пацієнтів з *FGFR3* транслокацією отримано часткову відповідь та ще у двох хворих спостерігалась мінімальна відповідь на терапію при застосуванні стандартних протоколів лікування. У одного пацієнта на фоні терапії було зареєстровано прогресію захворювання і тільки після застосування високодозової терапії з наступною трансплантацією аутологічних стовбурових клітин спостерігалась часткова відповідь.

Також були проведені дослідження щодо наявності делецій довгого плеча хромосоми 13. За даними літератури, аномалії даної хромосоми в регіонах 13q14 та 13q34 присутні при різних злоякісних В-клітинних новоутвореннях [4, 9]. За результатами наших досліджень делеції 13q спостерігалась в 31 % випадків хворих на В-клітинні новоутворення. У хворих на ДКВЛ було виявлено 10 випадків з делеціями хромосоми 13. З них делеція 13q14 реєструвалась у шести пацієнтів, а делеція 13q34 у восьми хворих на ДКВЛ. У шести хворих делеції 13q визначались в якості єдиної аномалії і у чотирьох – було визначено делеції обох регіонів 13q14 та 13q34. Згідно даних літератури, втрата генетичного матеріалу на довгому плечі хромосом 13 може відігравати важливу роль у формуванні зрілих лімфоїдних злоякісних новоутворень та свідчити про первинну резистентність до стандартної поліхіміотерапії [11].

FISH-аналіз субстратних клітин кісткового мозку хворих на ММ показав, що делеції 13q визначались у 21 із 70 пацієнтів. Делецію 13q14 було зареєстровано у 12 хворих, а делецію 13q34 у 19 хворих на ММ. В дев'яти випадках було відмічено делеції обох регіонів хромосоми 13 – 13q14 і 13q34. Варто зазначити, що делеції 13q спостерігались у хворих на ММ з t(4;14) в чотирьох з п'яти випадків, що узгоджується з даними літератури, згідно яких делеції хромосоми 13 асоціюються з транслокаціями із залученням хромосоми 14. Крім того, у пацієнтів з делеціями 13q і *FGFR3* транслокаціями частіше спостерігається прогресія захворювання, вони мають погану відповідь на терапію та низьку виживаність [3, 10].

Висновки. Таким чином, при молекулярно-цитогенетичному дослідженні субстратних клітин кісткового мозку хворих на злоякісні В-клітинні новоутворення хромосомні аномалії були виявлені в 33 % випадків. Хромосомна транслокація t(4;14), за участю гену *FGFR3,* спостерігалась в 6 % випадків: у одного із 30 хворих на ДКВЛ та п'яти із 70 хворих на ММ. Делеції 13q реєструвались у 10 із 30 хворих на ДКВЛ та у 21 із 70 пацієнтів на ММ. Визначення транслокації t(4;14) та делецій 13q у хворих на злоякісні В-клітинні новоутворення дозволить оптимізувати лікування хворим для подолання резистентності в умовах застосування сучасних програм поліхіміотерапії.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується продовження молекулярно-цитогенетичних досліджень з використанням додаткових зондів на більшій вибірці хворих на злоякісні В-клітинні новоутворення, що дозволить своєчасно виявити аберації хромосом та оптимізувати лікування хворих.

Література

1. Смолякова Р. М. Молекулярно-генетические методы исследования в онкологи / Р. М. Смолякова // Онкология. – 2011. – Т. 5, № 4. – С. 37–41.
2. Bachera U. Detection of a t(4;14)(p16;q32) in two cases of lymphoma showing both the immunophenotype of chronic lymphocytic leukemia / U. Bachera, T. Haferlachb, S. Schnittgerb [et al.] // Cancer Genetics and Cytogenetics. – 2010. – Vol. 200. – P. 170-174.
3. Chang H. Detection of chromosome13q deletions and IgH translocations in patients with multiple myeloma by FISH: comparison with karyotype analysis / L. Zhuang, E. Nie, D. Bouman [et al.] // Leuk. Lymphoma. – 2004. – Vol. 45 (5). – P. 965-969.
4. Dal Bo M. 13q14. Deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia / Bo M. Dal, F.M. Rossi, D. Rossi [et al.] // Genes Chromosomes Cancer. – 2011. – Vol. 50 (8). – P. 633–643.
5. Kalff A. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies / A. Kalff, A. Spencer // Blood Cancer Journal. – 2012. – Vol. 37(8). – P. 235-243.
6. Karlin L. Clinical and biological features of t(4;14) multiple myeloma: a prospective study / L. Karlin, J. Soulier, O. Chandesris // Leuk. Lymphoma. – 2011. – Vol. 52 (2). - P. 238-246.
7. Lenz G. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways / G. Lenz, G.W. Wright, N.C. Emre [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2008. – Vol. 105 (36). – P. 13520–13525.
8. Liehr T. The current state of molecular cytogenetics in cancer diagnosis / T. Liehr, M. A. Othman, K. Rittscher, E. Alhourani // Expert. Rev. Mol. Diagn. – 2015. – Vol. 15, № 4. – P. 517–526.
9. Nelson M. An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization and its impact on survival in children and adolescents with Burkitt lymphoma: results from the Children's Oncology Group study CCG-5961 / M. Nelson, S. L. Perkins, B. J. Dave [et al.] // Br. J. Haematol. – 2009. – Vol. 148. - P. 600–610.
10. Takimoto M. Close relation between 14q32/IGH translocations and chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma: a high incidence of 11q13/CCND1 and 16q23/MAF / M. Takimoto, K. Ogawa, Y. Kato // Int. J. Hematol. – 2008. – Vol. 87. – P. 260–265.
11. Wada M. Delineation of the frequently deleted region on chromosome arm 13q in B-cell non-Hodgkin's lymphoma / M. Wada, T. Okamura, M. Okada [et al.] // Int. J. Hematol. – 2000. – Vol. 71(2). – P. 159–166.
12. Zhou Y. The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era / Y. Zhou, B. Barlogie,JD. Jr. Shaughnessy // Leukemia. – 2009. – Vol. 23 (11). – P. 1941–1956.

УДК 616-006.441: 616-006.448

РОЛЬ ТРАНСЛОКАЦІЇ t(4;14) ТА ДЕЛЕЦІЙ 13q В ДІАГНОСТИЦІ ТА ПРОГНОЗІ ПЕРЕБІГУ ЗЛОЯКІСНИХ В-КЛІТИННИХ НОВОУТВОРЕНЬ

Мішаріна Ж. А., Сітько В. В., Мінченко Ж. М., Полубень Л. О., Бебешко В. Г.

Резюме. Метою дослідження було визначення ролі змін хромосом 4, 13 та 14, в тому числі транслокації t(4;14), делецій 13q13 та 13q34 у субстратних клітинах кісткового мозку у хворих на ДКВЛ та ММ за допомогою методу флуоресцентної in situ гібридизації (FISH). Визначення транслокації t(4;14) та делецій 13q у хворих на злоякісні В-клітинні новоутворення дозволить оптимізувати лікування для подолання резистентності в умовах застосування сучасних програм поліхіміотерапії.

Ключові слова: злоякісні В-клітинні новоутворення, делеція 13q, транслокація *FGFR3,* флуоресцентна in situ гібридизація.

УДК 616-006.441: 616-006.448

РОЛЬ ТРАНСЛОКАЦИИ t(4;14) И ДЕЛЕЦИИ 13q В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ ТЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ В-КЛЕТОЧНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Мишарина Ж. А., Ситько В. В., Минченко Ж. М., Полубень Л. А., Бебешко В. Г.

Резюме. Целью исследования было определение роли изменений хромосом 4, 13 и 14 в том числе транслокации t(4;14), делеций 13q13 и 13q34 в субстратных клетках костного мозга у больных ДКВЛ и ММ с помощью метода флуоресцентной in situ гибридизации (FISH). Определение транслокации t(4;14) и делеций 13q у больных злокачественными В-клеточными новообразованиями позволит оптимизировать лечение для преодоления резистентности в условиях применения современных программ полихимиотерапии.

Ключевые слова: злокачественные В-клеточные новообразования, делеция 13q, транс локация FGFR3, флуоресцентная in situ гибридизация.

UDC 616-006.441: 616-006.448

Role of Translocation t(4;14) and 13q Deletions in the Diagnosis and Prognosis of B-Cell Neoplasms

Misharina J. A., Sitko V. V., Minchenko J. M., Poluben L. O., Bebeshko V. G.

Abstract. *Introduction.* Molecular cytogenetic disorders in B-cell neoplasms are fairly common and include both structural and quantitative chromosome abnormalities . Most chromosome abnormalities are presented with deletions and translocations, which can change the aggressiveness of the disease and influence its course in general.

The aim of the study was to determine the role of changes of chromosomes 4, 13 and 14, including translocations t(4;14), 13q13 and 13q34 deletions in the substrate bone marrow cells from patients with MM and DBCL by fluorescent in situ hybridization (FISH) to provide prognostic assessments of disease.

Object and methods. Molecular cytogenetic research was performed on the samples of bone marrow substrate cells from 30 patients with DBCL and 70 patients with MM. The age of patients at diagnosis ranged from 5 to 79 years. The average age for patients with DBCL was 47,30 ± 3,61 and 55,61 ± 1,08 for patients with MM. The average age of

patients with B-cell neoplasms was 53,12 ± 1,36 years, 15 of them (15 %) were under the age of 40 years. 54 (54%) analyzed samples of bone marrow cells were obtained from male patients and 46 (46 %) - from female.

FISH analysis was performed on 24 -hour unstimulated cell cultures of bone marrow and material of lymph node biopsy fixed in paraffin using locus specific DNA probes: Vysis IGH/FGFR3 DF FISH Probe Kit and Vysis LSI D13S319 (13q14.3) Spectrum Orange/Vysis LSI 13q34 Spectrum Green FISH Probe Kit according to the manufacturer's instructions (Abbott Molecular, USA).

*Results and discussion***.** Our molecular cytogenetic study of bone marrow substrate cells showed that changes of chromosomes 4, 13 and 14 were registered in 33% (33/100) of patients with B-cell neoplasms.

In this research chromosomal translocation t(4;14) which leads to overexpression of FGFR3 gene was detected in 6% of patients with B-cell neoplasms, and only in one patient with DBCL. Translocation t(4; 14) was detected in 5 of 70 cases in patients with MM.

13q deletions was found in 31 % of patients with B-cell neoplasms. 10 cases with deletions of chromosome 13 were found in patients with DBCL, and 13q deletions were determined in 21 of 70 patients with MM.

Conclusions. Thus, the molecular cytogenetic study of the bone marrow substrate cells from patients with B-cell neoplasms showed that chromosome abnormalities were detected in 33% of cases. Chromosome translocation t(4;14), involving the FGFR3 gene, was found in 6% of cases: in one of 30 patients with DBCL and in five of 70 patients with MM. 13q deletions were detected in 10 of 30 patients with DBCL and in 21 of 70 patients with MM. Identification of t(4;14) translocation and 13q deletions in patients with B cell neoplasms will optimize the treatment of patients to overcome resistance when modern chemotherapy programs are used.

Keywords: B-cell neoplasms, 13q deletions, FGFR3 translocation, fluorescent in situ hybridization.

Рецензент – проф. Баштан В.П.

Стаття надійшла 05.06.2015 р.