

РЕЗУЛЬТАТИ ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕНЬ У РЕЦИДИВІ/РЕФРАКТЕРНІЙ ФОРМІ МНОЖИННОЇ МІЄЛОМИ

С.В. Андреева^{1,2}, К.В. Корець^{3*}

¹ТОВ "ІММД", Київ, Україна

²ДУ "Інститут гематології та трансфузіології НАМН України", Київ, Україна

³ДУ "НПМЦ дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України", Київ, Україна

*Corresponding author: korets_katya@ukr.net

Received 10 October 2018; Accepted 10 December 2018

Проблематика. Множинна мієлома (ММ) – новоутворення лімфоїдної тканини, для якого характерні низька проліферативна активність аномальних клітин і широкий спектр набутих хромосомних аберацій, що відіграють провідну роль у прогнозі перебігу захворювання. Накопичення нових даних щодо рецидиву/рефрактерної форми ММ дасть змогу зрозуміти природу формування нечутливих до хіміотерапії (ХТ) клонів, спрогнозувати ефективність терапії, що в подальшому удосконалив індивідуалізацію лікування для кожного пацієнта.

Мета. Завданням наших досліджень є визначення особливостей хромосомних аберацій аномальних клонів клітин кісткового мозку (КМ) хворих у рецидиві/рефрактерній формі ММ із застосуванням стандартного цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного досліджень.

Методика реалізації. Проведено аналіз хромосомних аномалій клітин КМ для 62 пацієнтів у рецидиві/рефрактерній формі ММ. Препарати метафазних хромосом готували за загальновідомою методикою після 24- та 96-годинного культивування у живильному середовищі без стимуляції.

Результати. Показано, що клональні аномалії хромосом формують складну картину каріотипів за структурою клонів. Серед структурних перебудов, при стандартному цитогенетичному дослідженні, домінували похідні хромосоми (34,9 %) та збалансовані транслокації (23,2 %). При молекулярно-цитогенетичному дослідженні на інтерфазних ядрах (i-FISH) хромосомні аномалії виявлені у 26,7 % випадків. Del(17)(p13.1) була зареєстрована у 22,0 %. Перебудови із залученням *IGH* зафіксовані у 5,7 %. Виявлений при i-FISH-дослідженні атиповий розподіл сигналів може вказувати на ще один можливий механізм еволюції аномального клону.

Висновки. Виявлені цитогенетичні особливості формування аномальних клонів клітин КМ у рецидиві/рефрактерній формі ММ доповнюють розуміння біологічних особливостей захворювання та сприяють окресленню подальших завдань для вивчення генетичних аберацій при ММ.

Ключові слова: множинна мієлома; рецидив/рефрактерна форма; клітини кісткового мозку; гетерогенність хромосомних аномалій.

Вступ

Множинна мієлома (ММ) – одна із нозологічних форм плазмоклітинних пухлин, яка характеризується мультифокусною інфільтрацією кісткового мозку (КМ) аномальними плазматичними клітинами, що супроводжується деструкцією кісткової тканини та секрецією моноклонального паропротейну. ММ – цитогенетично гетерогенне захворювання, що характеризується наявністю широкого спектра хромосомних аберацій, як кількісних, так і структурних, які обумовлюють значну гетерогенність клінічних особливостей перебігу захворювання [1, 2]. Визначення хромосомних аберацій є одним із важливих прогностичних факторів, адже стратифікація пацієнтів у групи ризику залежно від наявних хромосомних перебудов

дає можливість визначити оптимальну хіміотерапію (ХТ), яка скерована на максимальну редукцію аномальних клітин і ефективність лікування, збільшення тривалості та безпрогресивної виживаності [3, 4].

Варіабельність хромосомних аберацій обумовлена різними патогенетичними механізмами, які відбуваються у плазматичних клітинах і які визначають біологічні особливості клітин аномального клону. Так, у пацієнтів зі стадією I цитогенетичні аномалії визначаються у 20,0 %, зі стадією III – цей показник досягає 60,0 %, а при екстрamedулярній формі захворювання – більше 80,0 %. Використання молекулярно-цитогенетичного (FISH) методу дослідження дає змогу виявити до 80,0 % випадків аберацій [5].

Цитогенетичний аналіз диференційно забарвлених метафазних хромосом забезпечує

дослідників цінною прогностичною інформацією незалежно від виявлення специфічних хромосомних аномалій, оскільки, крім наявності або відсутності хромосомних аберацій, виконується підрахунок плоідності аномальних клітин.

Цитогенетично нормальний каріотип пов'язаний з істотно довшою виживаністю порівняно з аномальним [6]. Гіподиплоїдія, моносомія та/або делеція довгого плеча хромосоми 13 (13q), транслокації t(4;14)(p16.3;q32) і t(14;16)(q32;q23) погіршують прогноз перебігу захворювання [7]. Делеція короткого плеча хромосоми 17 (17p), що включає в себе делецію гена *TP53*, пов'язана з несприятливим перебігом захворювання. Це проявляється у зниженні загальної виживаності, незважаючи на лікування інгібіторами протеасоми та імунomodуючими препаратами, оскільки делеція гена *TP53* викликає іморталізацію (подолання старіння) клітин та сприяє їх виживаності [8]. Ця аномалія була включена в моделі стратифікації ризиків (належить до групи несприятливого цитогенетичного прогнозу перебігу захворювання) та реєструється приблизно у 5,0–8,0 % хворих на час встановлення діагнозу і більш часто виявляється у рецидиві/рефрактерній формі ММ [9, 10]. Біологічною особливістю ММ є низька проліферативна активність плазматичних клітин. Застосування методу FISH дає змогу виявити хромосомні аберації в інтерфазних ядрах незалежно від проліферативної активності клітин [11].

Своєю чергою рецидив/рефрактерна форма ММ розглядається як розвиток захворювання після хіміотерапії та визначається на основі об'єктивних лабораторних і радіологічних критеріїв: ≥ 25 % збільшення моноклонального білка у сироватці крові або мозку (М-протеїн) або розвиток нових плазмцитом чи гіперкальціємії [12]. Прогресування захворювання або рецидив/рефрактерна форма ММ може виникати в результаті проліферації як первинного, так і нового аномального клону плазматичних клітин у КМ унаслідок клональної еволюції, що може характеризуватися появою додаткових вторинних генетичних аберацій.

З огляду на зазначене вище, накопичення даних про генетичні механізми формування та еволюції аномальних клонів сприяють поглибленому розумінню біологічних особливостей ММ, що в подальшому сприятиме індивідуалізації ХТ для кожного пацієнта.

Метою нашого дослідження було визначення особливостей хромосомних аберацій аномальних клонів клітин КМ хворих у реци-

диві/рефрактерній формі ММ із застосуванням стандартного цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного досліджень.

Матеріали і методи

Цитогенетичні дослідження проводили у відділенні цитогенетичної діагностики та лікування онкогематологічних захворювань ДУ “Інститут гематології та трансфузіології НАМН України” протягом 2011–2016 рр. у клітинах КМ 62 пацієнтів у рецидиві/рефрактерній формі ММ. Серед пацієнтів було 28 жінок і 34 чоловіки віком від 30 до 74 років (середній вік – 57,6 року). Аналіз каріотипів проводили в клітинах КМ 58 пацієнтів, FISH-аналіз на інтерфазних ядрах (i-FISH) – у 60 пацієнтів, з яких для 43 було виконано також каріотипування.

Для цитогенетичних досліджень препарати метафазних хромосом готували за загальноприйнятою методикою [13] після 24- та 96-годинного культивування у живильному середовищі RPMI 1640 з 20,0 %-ним вмістом ембріональної телячої сироватки та гентаміцином і забарвлювали GTG-методом. Виявлені хромосомні аномалії описували відповідно до міжнародної номенклатури хромосом людини ISCN 2016 [14]. У дослідженні враховували тільки клональні аномалії хромосом. Нормальним вважали каріотип, коли не менш ніж у 20 проаналізованих і 10 каріотипованих метафазних пластинках не було виявлено хромосомних аномалій.

Каріотипи клітин КМ за структурою клонів були згруповані таким чином: нормальний (N), нормальний та білятеретроїдний (N/4n±), аномальний (A), аномальний і нормальний (A/N), аномальний, білятетраплоїдний і нормальний (A/4n±/N).

Дослідження методом i-FISH проводили на ядрах інтерфазних клітин після довготривалого (96-годинного) культивування. Для цього використовували набори: LS113q34 Spectrum Green FISH Probe Kit (Abbott, США), XL *P53* (17p13), XL t(4;14) (t(4;14)(p16;q32) *FGFR3/IGH*), XL t(6;14) (t(6;14)(p21;q32) *CCND3/IGH*), XL t(11;14) (t(11;14)(q13;q32) *CCND1/IGH*), XL t(14;16) (t(14;16)(q32;q23) *IGH/MAF/WWOX*) (MetaSystems, Німеччина). Візуалізацію сигналів проводили під флюоресцентним мікроскопом Olympus. У кожному випадку аналізували 200 інтерфазних ядер із чіткими сигналами.

Аналіз результатів дослідження проводили за допомогою програми “Excel”.

Результати

Цитогенетичний аналіз клітин КМ у рецидиві/рефрактерній формі ММ проведено для 58 пацієнтів, у 15 зафіксована відсутність метафазних пластинок, тобто результативність дослідження становила 74,1 %.

Отримані результати були згруповані за структурою клонів. Відсотковий розподіл каріотипів подано на рис. 1. За сукупними показниками каріотипи з N та $N/4n \pm$ клонами реестрували у 83,7 %.

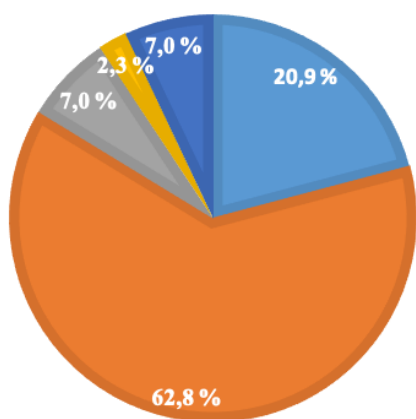


Рисунок 1: Відсотковий розподіл каріотипів за структурою клонів у клітинах кісткового мозку хворих у рецидиві/рефрактерній формі множинної мієломи: ■ – N ; ■ – $N/4n$; ■ – A/H ; ■ – A ; ■ – $A/4n/H$

Аналіз кількісних і структурних аномалій хромосом, що призвели до зміни плоїдності, наведено в табл. 1. Диплоїдний каріотип формувався з каріотипів із N та $N/4n \pm$ клонами і клонів зі збалансованими структурними перебудовами у 81,3 %. Псевдодиплоїдні клони (4,7 %) були сформовані внаслідок делеції та похідних хромосом. Гіподиплоїдні клони (менше 46 хромосом) зареєстровані у 4,7 %. Моносомії були виявлені за хромосомами 4 та 9. Гіпердиплоїдні клони (47 і більше хромосом) були сформовані за рахунок трисомій майже всього спектра хромосом, окрім 1, 2, 3, 6, 7, 9, 11, 19, 20, 21 і маркерних хромосом, їх частота становила 9,3 %. Додатковий біятетраплоїдний клон виявляли більш ніж у половині каріотипів (69,8 %).

Серед структурних перебудов зустрічалися делеції, транслокації, інверсія, ізохромосома (рис. 2). Крім того, реестрували похідні хромосом, які утворились унаслідок невстановлених перебудов. При цьому найчастіше реестрували похідні хромосоми (34,9 %) та збалансовані

транслокації (23,2 %). Делеції були зафіксовані у 7,0 % випадків. До структурних перебудов були залучені тринадцять хромосом, і найбільш часто реестрували аберації хромосом 1, 7 і 19. Окрім того, ми спостерігали домінування комплексних каріотипів.

Таблиця 1: Розподіл хромосомних аберацій відносно рівня плоїдності у рецидиві/рефрактерній формі множинної мієломи

Рівень плоїдності	Показники	
	абсолютні, $N = 43$	відносні, %
Диплоїдний	35	81,3
Псевдодиплоїдний	2	4,7
Гіпердиплоїдний (більше 46 хромосом)	4	9,3
Гіподиплоїдний (менше 46 хромосом)	2	4,7
Додатковий біятетраплоїдний клон	30	69,8

i-FISH дослідження виконано у 60 випадках, із яких у 43 одночасно було проведено також класичне цитогенетичне дослідження. За результатами *i*-FISH-аналізу виявлені делеція гена *TP53*, а також наявність транслокацій $t(4;14)(p16.3;q32)$, $t(11;14)(q13;q32)$, $t(14;16)(q32;q23)$. Хромосомні аберації були виявлені у 26,7 % випадків. Своєю чергою $del(17)(p13)$ зареєстрована у 22,0 % хворих.

Серед 54 зразків, які досліджували на наявність транслокацій із залученням гена *IGH*, було зафіксовано лише транслокації $t(4;14)(p16.3;q32)$ (рис. 3), $t(11;14)(q13;q32)$, $t(14;16)(q32;q23)$ у 1,9 % випадків кожна, серед яких транслокації $t(4;14)(p16.3;q32)$ і $t(11;14)(q13;q32)$ були варіантними, тобто лише з одним зливним сигналом.

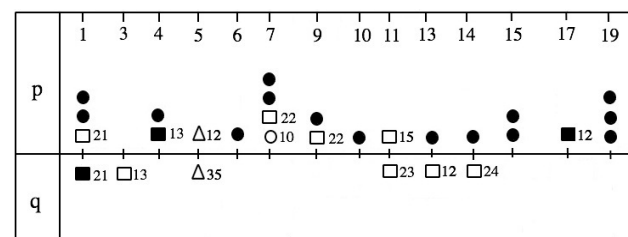


Рисунок 2: Спектр клональних структурних аберацій хромосом клітин кісткового мозку хворих у рецидиві/рефрактерній формі множинної мієломи: □ – транслокація; ■ – делеція; Δ – інверсія; ● – похідна хромосома; ○ – ізохромосома

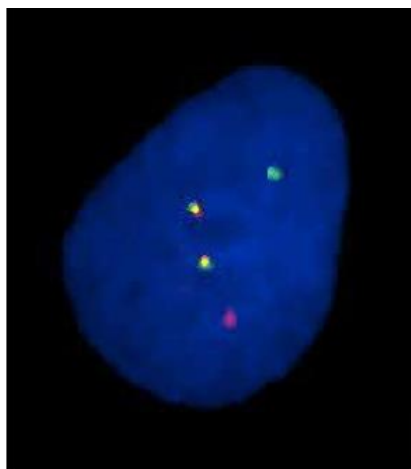


Рисунок 3: Збалансована транслокація $t(4;14)(p16.3;q32)/\text{ nuc ish}(IGH,FGFR3)\times 3(IGH \text{ con } FGFR3\times 2)$: зелений сигнал – локус 14q32, червоний сигнал – локус 4p16.3, жовтий (зливний) сигнал – химерний ген, що утворився в результаті транслокації $t(4;14)(p16.3;q32)$

Результати, отримані при проведенні i-FISH-методу дослідження, були згруповані у дві групи. Перша група включала в себе наявність лише однієї аномалії: делеції *TP53* (11 випадків) і $t(11;14)$ (1 випадок), що становило 20,0 % випадків. Друга група – одночасна наявність двох аномалій – делеції *TP53*, $t(4;14)(p16.3;q32)$; *TP53*, $t(14;16)(q32;q23)$ (по одному випадку), що становило 3,3 %.

Крім того, при аналізі досліджуваних транслокацій було зареєстровано атиповий розподіл сигналів, як генів важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGH*), так і генів-партнерів, у 8,3 % випадків. Для $t(11;14)$ зафіксовано нормальний розподіл сигналів генів *IGH* та появу додаткового сигналу гена-партнера *CCND1* без формування

зливного сигналу, а також втрату одного сигналу генів *IGH* і нормальний розподіл сигналів для гена *CCND1* (по 2 випадки). Також в одному випадку у всіх транслокаціях було зареєстровано зменшення вдвічі інтенсивності свічення сигналів, що локалізовані в регіоні гена *IGH* (dim) при нормальному розподілі та свіченні сигналів генів-партнерів 4p16, 6p21, 11q13, 16q23 (рис. 4).

Порівняння результатів, отриманих при одночасному проведенні каріотипування та i-FISH-дослідження, показало значну гетерогенність за розподілом виявлення хромосомних аномалій. Дані було згруповано у п'ять груп (табл. 2).

Так, до I групи віднесено 32 випадки, які характеризувались наявністю нормального каріотипу як при стандартному цитогенетичному, так і при i-FISH дослідженнях. Групу II формували цитогенетично нормальний каріотип і наявність хромосомних перебудов при i-FISH-аналізі (4 випадки). До III групи включено випадки зі встановленими хромосомними перебудовами, які виявлені під час каріотипування, та нормальним розподілом сигналів (i-FISH-аналіз) (1 випадок). До IV групи віднесено 2 випадки, в яких хромосомні аномалії, виявлені методом каріотипування, були підтверджені i-FISH. П'ята група була сформована з 5-ти випадків, що включала наявність хромосомних перебудов у каріограмі та при i-FISH, які були неспорідненими.

Ми виконали порівняння отриманих результатів при одночасному проведенні стандартного цитогенетичного та i-FISH досліджень (43 випадки) (табл. 3). При всіх методах дослідження домінували клони, що відносяться

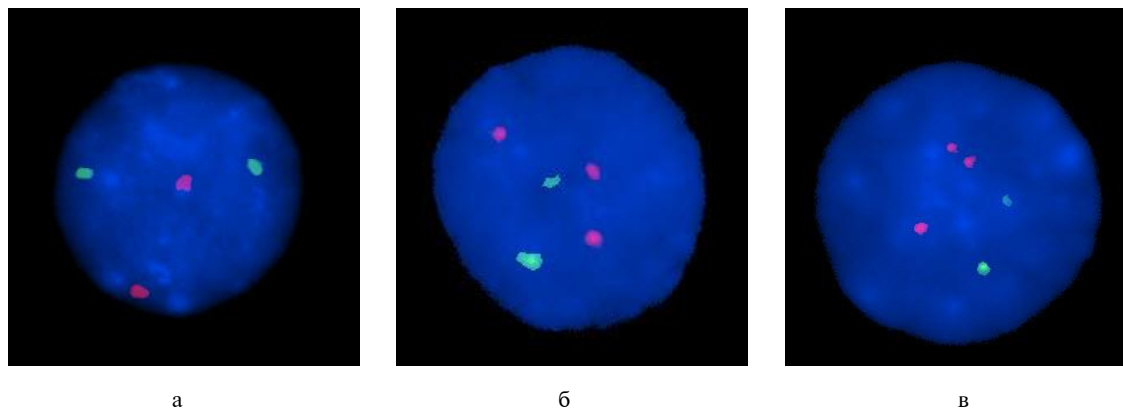


Рисунок 4: Атиповий розподіл кількості та інтенсивності свічення сигналів: (а) $\text{ nuc ish}(IGH,CCND3)\times 2$ (нормальне свічення сигналів): зелений сигнал – локус 14q32, червоний сигнал – локус 6p21; (б) $\text{ nuc ish}(IGHx1,IGH \text{ dim}x1,CCND3x3)$: зелений сигнал – локус 14q32, червоний сигнал – локус 6p21; (в) $\text{ nuc ish}(IGHx1,IGH \text{ dim}x1,MAF/WWOXx3)$: зелений сигнал – локус 14q32, червоний сигнал – локус 16q23

Таблиця 2: Порівняння результатів стандартного цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного досліджень у рецидиві/рефрактерній формі множинної мієломи

Група	Каріотипування	i-FISH
I	H [32]	H [32]
II	H [4]	<i>(TP53x1)[1], (TP53x1),(IGHx2,CCND1x3) [1], (IGH,FGFR3)x2(IGH con FGFR3x1), (IGHx2,MAF/WWOXx3) [1], (TP53x1), (IGH,MAF/WWOXx3)(IGH con MAF/WWOXx2) [1]</i>
III	-9 [1]	H [1]
IV	del(17)(p12) [2]	<i>(TP53x1) [2],</i>
V	t(1;13;14)(p21;q12;q24), t(3;7;11)(q13;p22;q23), -4,+mar[1], +11,+21 [1], del(1)(q21),+der(1)x2,-2, -5,der(6),der(7),i(7)(p10), der(7)',-9,der(9), -10,+11,-12,der(13),-14, der(14),der(15),+der(15)', -16x2,-17,der(19)x2, +der(19)',-20x2,+21,- 22,+mar1,+mar2,+mar3, +mar4,+mar5,+mar6 [1], -X,+1,+2,+3,del(4)(p13), inv(5)(p12q35),+6,+7,+9,+t(9;?) (p22;?), +t(11;?)(p15;?),+19;+20, +mar [1], der(4), der(10) [1]	<i>(TP53x1)[1],</i> <i>(TP53x1)/(IGH,CCND1x3) (IGH con CCND1x1) [1], (IGHx2),(FGFR3x3)/(IGHx2),(FGFR3x4)/(IGH,FGFR3)x4,(IGHx2), (CCND3x4)/(IGH,CCND3)x4,(IGHx2),(CCND1x4)/(IGHx2), (CCND1x6)/(IGH,CCND1)x4 [1]</i> <i>(TP53x1)/(IGHx1, IGH dimx1),(FGFR3)x2, (IGH,CCND3)x2,(IGHx2,IGH dimx2),(CCND3x4),(IGHx1,IGH dimx1),(CCND1x2),(IGHx1,IGH dimx1),(CCND1x3),(IGHx1,IGH dimx1),(MAF/WWOXx2),(IGHx1,IGH dimx1),(MAF/WWOXx1) [1]</i> <i>(TP53x1)/(IGHx1),(CCND1x2)/(IGHx1)(CCND1x3)/(IGHx2), (CCND1x3),(IGH,MAF/WWOF)x1 [1]</i>

Таблиця 3: Розподіл результатів отриманих даних за групами цитогенетичного прогнозу перебігу захворювання у рецидиві/рефрактерній формі множинної мієломи

Група прогнозу перебігу захворювання	Стандартне цитогенетичне дослідження	i-FISH-дослідження	Сумарно
	N, (%)		
Сприятлива	36 (83,7)	33 (76,7)	31 (72,1)
Несприятлива	7 (16,3)	10 (23,3)	12 (27,9)

до групи сприятливого цитогенетичного прогнозу перебігу ММ (за результатами стандартного цитогенетичного дослідження та i-FISH (83,7 та 76,7 % відповідно). Проте найвищий відсоток випадків, що відносяться до групи несприятливого прогнозу перебігу ММ, відзначено при одночасному застосуванні двох методів досліджень (27,9 %).

Обговорення

На основі виконаних цитогенетичних і молекулярно-цитогенетичних досліджень пока-

зано значну неоднорідність структури каріотипів, дано характеристику кількісних і структурних аберацій хромосом, що відображає генетичну гетерогенність захворювання.

Зафіксована нами результативність виконання стандартного цитогенетичного методу дослідження у клітинах КМ, що становила 74,1 %, виявилася нижчою, ніж на час встановлення діагнозу (92,2 %). Відповідно до розподілу каріотипів за структурою клонів сукупний показник каріотипів з Н і Н/4n± клонами реєстрували у 83,7 %, що варіює в однакових ме-

жах із показником, отриманим нами на час встановлення діагнозу ММ (78,3 %) [15].

Псевдодиплоїдні клони були виявлені у 4,7 % випадків, що майже в три рази менше, ніж на час встановлення діагнозу ММ (12,1 %). Своєю чергою гіподиплоїдні клони (менше 46 хромосом) не були виявлені на час встановлення діагнозу ММ та зареєстровані у рецидиві/рефрактерній формі захворювання у 4,7 %. Відсоткове співвідношення наявності додаткового білететраплоїдного клону в клітинах КМ було вищим, ніж на час встановлення діагнозу ММ (69,8 та 57,8 % відповідно) [15]. Серед структурних аберацій делеції були зафіксовані у 7,0 % випадків, що нижче, ніж на момент постановки діагнозу (12,1 %). Особливістю нашої вибірки було домінування комплексних каріотипів (одночасна наявність трьох і більше хромосомних аберацій). У дослідженні на час встановлення діагнозу ММ фіксувалися аномальні каріотиби з наявністю однієї/двох хромосомних перебудов. Комплексний каріотип – одна з типових характеристик ММ і належить до групи несприятливого цитогенетичного прогнозу [3].

При i-FISH-дослідженні хромосомні аберації були виявлені лише у 26,7 % випадків, що майже в два рази менше, ніж на час встановлення діагнозу ММ (44,0 %) [15]. Цей аспект можна пояснити ймовірністю хромосомних аберацій, що включають у себе регіони, які не входять у спектр досліджуваних проб. Це підтверджується нашими даними, які отримані за результатами стандартного цитогенетичного дослідження. Своєю чергою $\text{del}(17)(\text{p}13)$ зареєстрована у 22,0 %, цей показник збігається з нашими результатами при встановленні діагнозу [15] та результатами М. Chin *et al.* (22,3 %) [16]. Водночас відсоток реєстрації транслокацій $\text{t}(4;14)(\text{p}16.3;\text{q}32)$, $\text{t}(11;14)(\text{q}13;\text{q}32)$, $\text{t}(14;16)(\text{q}32;\text{q}23)$ (по 1,9 % випадків кожна) значно нижчий, ніж у роботі В. Herbraud *et al.* [17], де $\text{t}(4;14)(\text{p}16.3;\text{q}32)$ зареєстрована у 11,0 % випадків, а $\text{t}(11;14)(\text{q}13;\text{q}32)$ – у 10,7 % випадків. Дані щодо виявлення транслокації $\text{t}(14;16)(\text{q}32;\text{q}23)$ у рецидиві/рефрактерній формі захворювання відсутні. Загальний відсоток реєстрації транслокацій із залученням гена *IGH* становив лише 5,7 %. Ці результати можуть свідчити про особливості формування аномальних клонів у нашій вибірці.

Цікавою особливістю було виявлення двох варіантних транслокацій $\text{t}(4;14)(\text{p}16.3;\text{q}32)$, $\text{t}(11;14)(\text{q}13;\text{q}32)$ лише з одним зливним сигна-

лом, що може вказувати на залучення до цієї транслокації ще однієї хромосоми-партнера і потребує подальшого вивчення. Крім того, атиповий розподіл сигналів для $\text{t}(11;14)$, де зафіксовано нормальний розподіл сигналів генів *IGH* та появу додаткового сигналу гена-партнера *CCND1* без формування зливного сигналу, може свідчити про дуплікацію досліджуваного регіону або трисомію цієї хромосоми, а також про втрату одного сигналу генів *IGH* і нормальний розподіл сигналів для гена *CCND1*, може вказувати на делецію досліджуваного регіону або моносомію цієї хромосоми. Своєю чергою зареєстроване зменшення вдвічі інтенсивності свічення сигналів, що локалізовані в регіоні гена *IGH* (*dim*) при нормальному розподілі та свіченні сигналів генів-партнерів 4p16, 6p21, 11q13, 16q23, можна пояснити тим, що ця особливість пов'язана з мутацією або мікроделецією певної ділянки досліджуваного регіону гена *IGH*.

Порівняння результатів, отриманих при одночасному проведенні двох методів досліджень (каріотипування та i-FISH) (див. табл. 2), по-перше, підтверджує необхідність одночасного проведення двох методів досліджень для виявлення криптичних перебудов та реєстрації нових, раніше не виявлених хромосомних аберацій; по-друге, свідчить про потребу пошуку нових прогностичних генетичних маркерів для розширення панелі хромосомних перебудов, що можуть впливати на перебіг захворювання. Крім того, V група в цьому розподілі, в якій зареєстровані хромосомні аберації, що не дублювалися при виконанні двох досліджень, а навпаки, виявилися зовсім різноплановими, може вказувати на досить складний (багаторівневий) механізм формування аномального клону. Аналіз результатів, отриманих при одночасному проведенні стандартного цитогенетичного та i-FISH досліджень, та їх розподіл відповідно до груп цитогенетичного прогнозу перебігу захворювання (див. табл. 3) показують, що збільшення відсотка випадків у групі несприятливого цитогенетичного прогнозу ще раз підтверджує необхідність аналізу клітин КМ як мінімум цілком доступними нині методами генетичних досліджень: стандартним цитогенетичним та молекулярно-цитогенетичним.

Висновки

1. Результати каріотипування та i-FISH-методу клітин КМ хворих у рецидиві-

ві/рефрактерній формі ММ показали значну гетерогенність клональних аномалій хромосом.

2. Каріотиби клітин КМ за структурою клонів у рецидиві/рефрактерній формі ММ представлені п'ятьма групами:

- нормальний клон (Н);
- нормальний/білітетраплоїдний (Н/4n±);
- аномальний (А);
- аномальний/нормальний (А/Н);
- аномальний/білітетраплоїдний/нормальний (А/4n±/Н).

3. Диплоїдні клони реєстрували у 81,3 % випадків; псевдодиплоїдні (переважно за рахунок делецій) – у 4,7 %; гіпердиплоїдні – у 9,3 % випадків; гіподиплоїдні клони – у 4,7 %.

4. Показано, що при ММ до кількісних хромосомних аберацій залучалися п'ятнадцять хромосом (статеві хромосоми Х та Y, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22).

5. До структурних перебудов найчастіше залучалися хромосоми 1, 7 та 19 (за результатами стандартного цитогенетичного дослідження), хромосома 17 при і-FISH-дослідженні. Серед структурних перебудов при каріотипуванні переважали похідні хромосом (34,9 %) та збалансовані транслокації (23,2 %); при і-FISH домінували делеції (22,0 %).

Наявність атипичного розподілу сигналів може вказувати на інші можливі механізми формування аномального клону.

References

- [1] Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014 Nov;15(12):e538-48. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
- [2] Kaufman GP, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi FK, Dingli D, et al. Impact of cytogenetic classification on outcomes following early high-dose therapy in multiple myeloma. *Leukemia.* 2016 Mar;30(3):633-9. DOI: 10.1038/leu.2015.287
- [3] Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J.* 2015 Oct;5(10):e365. DOI: 10.1038/bcj.2015.92
- [4] Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2016 Jul;91(7):719-34. DOI: 10.1002/ajh.24402
- [5] Avet-Loiseau H, Hulin C, Campion L, Rodon P, Marit G, Attal M, et al. Chromosomal abnormalities are major prognostic factors in elderly patients with multiple myeloma: the Intergroupe Francophone du Myélome Experience. *J Clin Oncol.* 2013 Aug;31(22):2806-09. DOI: 10.1200/JCO.2012.46.2598
- [6] Gozzetti A, Frascioni A, Crupi R. Molecular cytogenetics of multiple myeloma. *Austin J Cancer Clin Res.* 2014 Dec;1(4):1020.
- [7] Jekarl DW, Min CK, Kwon A, Kim H, Chae H, Kim M, et al. Impact of genetic abnormalities on the prognoses and clinical parameters of patients with multiple myeloma. *Ann Lab Med.* 2013 Jul;33(4):248-54. DOI: 10.3343/alm.2013.33.4.248
- [8] Liu J, Yang H, Liang X, Wang Y, Hou J, Liu Y, et al. Meta-analysis of the efficacy of treatments for newly diagnosed and relapse/refractory multiple myeloma with del(17p). *Oncotarget.* 2017;8:62435-44. DOI: 10.18632/oncotarget.18722
- [9] Weinhold N, Ashby C, Rasche L, Chavan SS, Stein C, Stephens OW, et al. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood.* 2016;128(13):1735-44. DOI: 10.1182/blood-2016-06-723007
- [10] Chavan SS, He J, Tytarenko R, Deshpande S, Patel P, Bailey M, et al. Bi-allelic inactivation is more prevalent at relapse in multiple myeloma, identifying RB1 as an independent prognostic marker. *Blood Cancer J.* 2017;7(2):e535. DOI: 10.1038/bcj.2017.12
- [11] Avet-Loiseau H, Durie BG, Cavo M, Attal M, Gutierrez N, Haessler J, et al. Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia.* 2013 Mar;27(3):711-7. DOI: 10.1038/leu.2012.282
- [12] Sonneveld P, Broijck A. Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Haematologica.* 2016 Apr;101(4):396-406. DOI: 10.3324/haematol.2015.129189
- [13] Rooney DE, Czepulkovsky BH. Human cytogenetics. A practical approach. Malignancy and acquired abnormalities. 2nd ed. Oxford, New York, Tokyo: IRL Press at Oxford University Press; 1995. 293 p.
- [14] McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. An international system for human cytogenetic nomenclature. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Karger; 2016. 140 p.
- [15] Korets KV, Ruzhinska OE, Skorohod IM, Karnabeda OA, Korenkova IM, Andreieva SV. Peculiarities of chromosomal abnormalities in bone marrow cells at diagnosis of multiple myeloma. *Likars'ka Sprava.* 2017;8:70-9.

- [16] Chin M, Sive JI, Allen C, Roddje C, Chavda SJ, Smith D, et al. Prevalence and timing of TP53 mutations in del(17p) myeloma and effect on survival. *Blood Cancer J.* 2017 Sep;7(9):e610. DOI: 10.1038/bcj.2017.76
- [17] Hebraud B, Caillot D, Corre J, Marit G, Hulin C, Leleu X, et al. Lost and gain of t(4;14) and t(11;14) in multiple myeloma patients between relapse and diagnosis: an illustration of clonal dynamic during disease course. *An IFM Study. Blood.* 2012 Oct;120(21):196.

С.В. Андреева, Е.В. Корец

РЕЗУЛЬТАТЫ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЙ В РЕЦИДИВЕ/РЕФРАКТЕРНОЙ ФОРМЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Проблематика. Множественная миелома (ММ) – новообразование лимфоидной ткани, для которого характерны низкая пролиферативная активность аномальных клеток и широкий спектр приобретенных хромосомных aberrаций, которые играют ведущую роль в прогнозе течения заболевания. Накопление новых данных о рецидиве/рефрактерной форме ММ позволит понять природу формирования нечувствительных к химиотерапии (ХТ) клонов, спрогнозировать эффективность терапии, что в дальнейшем усовершенствует индивидуализацию лечения для каждого пациента.

Цель. Задачей наших исследований является определение особенностей хромосомных aberrаций аномальных клонов клеток костного мозга (КМ) больных в рецидиве/рефрактерной форме ММ путем стандартного цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследований.

Методика реализации. Проведен анализ хромосомных аномалий клеток КМ для 62 пациентов в рецидиве/рефрактерной форме ММ. Препараты метафазных хромосом готовили согласно общепринятой методике после 24- и 96-часового культивирования в питательной среде без стимуляции.

Результаты. Показано, что клональные аномалии хромосом формируют сложную картину кариотипов за структурой клонов. Среди структурных перестроек, при стандартном цитогенетическом исследовании, доминировали производные хромосомы (34,9 %) и сбалансированные транслокации (23,2 %). При молекулярно-цитогенетическом исследовании на интерфазных ядрах (i-FISH) хромосомные аномалии обнаружены в 26,7 % случаев. Del(17)(p13.1) была зарегистрирована в 22,0 %. Перестройки с вовлечением *IGH* зафиксированы в 5,7 %. Обнаруженное при i-FISH-исследовании атипичное распределение сигналов может указывать на еще один возможный механизм эволюции аномального клона.

Выводы. Обнаруженные нами цитогенетические особенности формирования аномальных клонов клеток КМ в рецидиве/рефрактерной форме ММ дополняют понимание биологических особенностей заболевания и способствуют формированию дальнейших задач для изучения генетических aberrаций при ММ.

Ключевые слова: множественная миелома; рецидив/рефрактерная форма; клетки костного мозга; гетерогенность хромосомных аномалий.

S.V. Andreieva, K.V. Korets

RESULTS OF CYTOGENETIC AND MOLECULAR CYTOGENETIC STUDIES IN RELAPSE/REFRACTORY OF MULTIPLE MYELOMA

Background. Multiple myeloma (MM) – a tumor of the lymphoid tissue, which is characterized by low proliferative activity of abnormal cells and a wide range of acquired chromosomal aberrations that play a leading role in predicting the course of the disease. Accumulation of new data in the relapsed/refractory of MM will make it possible to understand the nature of the formation of cloning insensitive to chemotherapy (CT), to predict the effectiveness of therapy, which will further improve the individualization of treatment for each patient.

Objective. The aim of the study is to determine the peculiarities of chromosomal aberrations of abnormal clones of bone marrow (BM) cell in relapsed/refractory of MM by standard cytogenetic and molecular cytogenetic investigations.

Methods. Analysis of BM cells chromosomal abnormalities in relapsed/refractory of MM for 62 patients with MM was performed. Slides of metaphase chromosomes were prepared according to standard procedure after cultivating during 24 or 96 h in the medium without stimulation.

Results. Clonal chromosomal abnormalities were formed, complexity structure of karyotypes with clone structures was shown. In structural rearrangements, derivative chromosomes (34,9%) and balanced translocations (23,2%) were dominated at cytogenetic procedure. By molecular cytogenetic (i-FISH) investigation chromosomal abnormalities were detected in 26,7% cases. Del(17)(p13.1) was registered in 22,0%. Aberrations involving *IGH* were fixed in 5,7%. The atypical signal distribution determined by i-FISH may indicate another possible mechanism for the evolution of an abnormal clone.

Conclusions. The cytogenetic peculiarities of the formation of abnormal BM cell clones in relapse/refractory of MM formations, discovered by us, supplement the understanding of the biological features of the disease and contribute to the outline of further tasks for the study of genetic aberrations in MM.

Keywords: multiple myeloma; relapse/refractory; bone marrow cells; chromosomal abnormality heterogeneity.