

Генетические аномалии: влияние на эффективность терапии, выживаемость больных множественной миеломой, роль в оценке минимальной остаточной болезни*

Гарифуллин А.Д.¹, Волошин С.В.¹, Мартынкевич И.С.¹, Kleina E.B.¹, Салогуб Г.Н.^{2,3}, Карягина Е.В.⁴, Абдулкадыров К.М.¹, Чечеткин А.В.¹

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», e-mail: bloodscience@mail.ru

² — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: info@1spbgtmu.ru

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

e-mail: fmrc@almazovcentre.ru

⁴ — Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения Городская больница №15,

e-mail: b15@zdrav.spb.ru

При ряде онкологических заболеваний генетические аномалии (ГА) демонстрируют самостоятельное влияние на продолжительность жизни больных. В нашем исследовании определена частота встречаемости аномалий генетического аппарата и их прогностический потенциал при множественной миеломе (ММ). Выявление аномалий проводилось стандартным цитогенетическим методом и флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH). У пациентов определялись перестройка гена *IgH* (t(11;14), t(4;14) и др.), del(13)(q14), del(17)(p13.1), аномалии хромосомы 1, гиподиплоидия, гипердиплоидия, сочетанный и комплексный кариотипы. У 57,1% пациентов ГА отсутствовали, а частота встречаемости аномалий хромосомы 1, t(11;14), del(13)(q14), t(4;14), del(17)(p13.1), гипердиплоидии, гиподиплоидии равнялась 28,6%, 20,3%, 18,1%, 6,8%, 5,6%, 3,6 и 2,9% соответственно. Длительность наблюдения составила в среднем 5 лет и показала, что del(17)(p13.1) уменьшала общую выживаемость (ОВ), в то время как t(11;14) не влияла на прогноз. Комплексный кариотип продемонстрировал негативное влияние на показатели выживаемости, в основном, за счет наличия прогностически неблагоприятных ГА (del17p13.1, del13q14, t(4;14), (dup(1q)). Минимальная остаточная болезнь (МОБ) может быть выявлена не только путем многоцветной проточной цитометрии (ПЦ), но и генетическими методами исследований, направленными на выявление ранее обнаруженных ГА.

Ключевые слова: множественная миелома, генетические аномалии, минимальная остаточная болезнь, флуоресцентная *in situ* гибридизация, общая выживаемость, беспрогрессивная выживаемость

Введение

Множественная миелома — злокачественная опухоль, морфологическим субстратом которой являются плазматические клетки (ПлК), продуцирующие моноклональный иммуноглобулин и/или легкие цепи иммуноглобулинов, которая занимает второе место среди опухолей системы крови, уступая лимфопролиферативным заболеваниям, и составляет около 1% от всех опухолей и около 10% от гемобластозов [1]. Несмотря на достижения последних десятилетий, ММ остается хронической неизлечимой болезнью, характеризующейся сменой ремиссий и прогрессирований или рецидивов [2]. Длительность патологического процесса может иметь значительную гетерогенность и занимать от нескольких недель до десятков лет и более, что вероятнее всего обусловлено биологическими особенностями опухолевых клеток, определяющими прогноз заболевания.

Большинство существующих в настоящее время стадирующих систем и прогностических факторов, таких, как система Salmon-Durie и International Staging System (ISS, международная стадирующая система) [3], основываются на изменениях параметров, возникших вследствие заболевания и характеризующих его активность. В свою очередь цитогенетические и молекулярно-генетические аномалии являются, как первичными, играющими важную роль в патогенезе и развитии злокачественных новообразований, самостоятельными факторами, так и вторичными, возникающими вследствие естественной клональной эволюции заболевания или терапевтического воздействия. Определение генетического статуса пациентов, как на этапе диагностики, так и при развитии рецидива/прогрессирования заболевания, позволяет усовершенствовать стратификацию рисков и определить терапевтический подход при ММ.

* **Конфликт интересов:** у авторов нет никаких конфликтов интересов.

Использование стандартной метафазной цитогенетики для поиска хромосомных aberrаций при ММ не увенчалось значительным успехом из-за низкой пролиферативной активности ПлК и, зачастую, их незначительного содержания в аспирате костного мозга вследствие очагового поражения. Согласно литературным данным, с использованием стандартного цитогенетического исследования наибольшее количество хромосомных aberrаций в описанных случаях было выявлено у 30% больных [4–6]. Переворот в данной области связан с внедрением методов, не зависящих от получения метафаз [7–8]. Одним из таких методов является FISH, основанная на выявлении определенных специфических молекулярно-генетических изменений с помощью ДНК-зондов. При сравнении различных методов FISH-анализ продемонстрировал более высокий уровень детекции генетических нарушений при ММ по сравнению со стандартным цитогенетическим исследованием. По данным литературы, частота встречаемости ГА при использовании FISH-метода колеблется от 50% при интрамедуллярной миеломе до 90% и более при исследовании на клеточных линиях миеломы, что позволило рассматривать ГА в качестве самостоятельных прогностических факторов на момент начала любой из линий терапии [9–13].

Стратификация пациентов в группы риска, в зависимости от ГА позволяет определить оптимальный вариант терапии, направленный на максимальные редукцию опухолевых клеток и эффективность лечения, увеличение продолжительности (ОВ) и беспрогрессивной выживаемости (БПВ). Динамический мониторинг за остаточными опухолевыми клетками, характеризующими состояние МОБ, во время и после индукционной терапии позволяет оптимизировать консолидирующую и поддерживающую терапии с целью увеличения БПВ.

Учитывая внутрикостномозговое расположение патологических ПлК, основным методом диагностики МОБ является ПЦ костного мозга. Однако иммунофенотипирование не способно распознать клетки опухолевого клона с ГА. Для определения МОБ у пациентов с выявленными ранее ГА целесообразно проведение генетических (цито- и молекулярно-генетических) методов исследования наряду с иммунофенотипированием.

В работе представлены собственные данные по оценке частоты встречаемости ГА (при метафазной цитогенетике и FISH), их влиянии на прогноз, длительность БРВ и ОВ, а также стратификацию пациентов в группы риска. Проведена оценка генетических и иммунофенотипических методов для определения МОБ.

Цель и задачи: определить частоту встречаемости генетических аномалий, их влияние на эффективность лечения, выживаемость и значение в определении минимальной остаточной болезни.

Пациенты, материалы и методы

В исследование было включено 177 больных ММ, проходивших лечение в гематологической клинике ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА» и других гематологических отделениях лечебных учреждений г. Санкт-Петербурга с 2001 по 2016 гг. Возраст больных на момент постановки диагноза составил от 26 до 86 лет (медиана 60 лет). Среди них было 72 (40,7%) мужчины и 105 (59,3%) женщины. У всех больных верифицирована активная, требующая лечения ММ. Стадирование заболевания проводилось согласно классификации Salmon-Durie [14] и ISS. В качестве первичной противомеломной терапии больным проводилась «стандартная» химиотерапия [15; 16], бортезомиб-содержащие [17; 18], иммуномодулятор-содержащие [19; 20] и комбинированные (бортезомиб и иммуномодулятор) программы лечения [21; 22]. У больных моложе 65 лет в качестве консолидации/интенсификации использовалась высокодозная химиотерапия (Мелфалан 200 мг/м²) с последующей одиночной или тандемной аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (АТГСК) [23]. Поддерживающая терапия проводилась по велкейд-содержащей программе аналогичной индукционному режиму на протяжении 2 лет с интервалом между циклами 3 месяца; 10 пациентов после трансплантации получали леналидомид в поддерживающей дозе 15 мг в течение не менее 1 года или до развития прогрессирования/рецидива ММ. На момент проведения анализа 37,3% (66 пациентов) умерли от прогрессирования заболевания, старости и/или осложнений проводимой терапии.

Стадия I по классификации Salmon-Durie была установлена — у 9 (5,1%) больных, II — у 36 (20,3%), с III — у 132 (74,6%). Миелома Бенс-Джонса верифицирована у 5,1% больных, IgG ММ — у 63,3%, IgA ММ — у 20,3%, IgM — у 0,5%, IgD ММ — у 0%, секрета только легких цепей иммуноглобулинов — у 4,5%, несекретирующий вариант ММ — у 1,2% пациентов. Секрета свободных легких цепей была определена у 166 пациентов: каппа тип — у 121 (72,9%), лямбда тип — у 45 (27,1%) пациентов. Определение бета-2-микроглобулина и альбумина выполнено у 128 больных, что согласно стадирующей системе ISS позволило распределить пациентов следующим образом: ISS-I — 21,1%, ISS-II — 35,9%, ISS-III — 43,0%. Подробная характеристика больных ММ представлена в табл. 1.

Поиск ГА осуществлялся стандартными цитогенетическим и FISH методами. Цитогенетическое исследование клеток костного мозга проводилось по стандартной GTG-методике. В каждом отдельном случае анализировались 20–30 метафазных пластин; при обнаружении одной патологической клетки имеющей генетические нарушения — все имеющиеся митозы с целью подтверждения клональности хромосомных aberrаций и уста-

новления процентного соотношения между нормальным и патологическим клоном клеток.

Если одни и те же структурные нарушения кариоти- па или дополнительные хромосомы обнаруживались в двух или более клетках, а при потере хромосом — в трех и более, констатировалось наличие патологиче- ского клона. Интерпретация патологии кариотипа про- изводилось в соответствии с Международной номенкла- турой дифференциально сегментированных хромосом (ISCN, 2013) [24].

Для FISH-исследования использовалась суспензия клеток, приготовленных для стандартного цитогенети- ческого анализа. При исследовании каждого зонда бы- ло проанализировано не менее 200 интерфазных ядер. Выявление транслокаций документировалось при со- вмещенном (сливном) сигнале, делеций — при отсутст- вии сигнала от одного из меченного зондов, трисо- мий/дупликаций генов — при наличии дополнительного сигнала. Метафазный FISH-метод использовался с ДНК-зондами LSI 13(*RBI*)13q14, *IGH/CCND1*, *IGH/FGFR3*, LSI *TP53*(17p13.1), LSI *IGH*, *CKS1B*, *CDKN2C* (Abbott, USA).

В качестве методов выявления остаточных клональ- ных ПЛК, определяющих состояние МОБ, применялись генетические и иммунофенотипические методы. Имму- нофенотипирование клеток костного мозга выполня-

лось на 5-цветном цитофлуориметре проточного типа (Cytomics FC 500, Beckman Coulter) с использованием моноклональных антител к антигенам CD45, CD38, CD138, CD56, CD19, CD20, CD27, CD117. Отсутствие МОБ констатировалось при отсутствии трансформиро- ванных ПЛК или их уровне менее 10^{-4} .

Результаты

Анализ хромосомного аппарата и поиск молекуляр- но-генетических нарушений выполнен у 177 больных ММ. Кариотип пациентов при стандартном цитогенети- ческом исследовании был определен у 137 (77,4%) из 177 пациентов. Попытка получения кариотипа у 27 (15,3%) больных ММ оказалась неудачной вследствие отсутствия митозов. Низкий уровень митотической ак- тивности ПЛК определил и частоту встречаемости ГА при метафазном цитогенетическом анализе, которая со- ставила 8,7% (12/137). Количественные нарушения ге- нетического аппарата выявлены у 6,5% (9/137) пациен- тов (гипо- — 3,6% (5/137) и гипердиплоидия — 2,9% (4/137)). Структурные изменения определены у 2,2% (3/137) обследуемых и были представлены делециями хромосом 8, 13 и 20: del(8)(q24), del(13)(q14), del(20)(q12).

Таблица 1

Характеристика исследуемой группы больных

	Количество больных, n (%)
Salmon-Durie	n = 177
стадия I	19 (5,1%)
стадия II	36 (20,3%)
стадия III	132 (74,6%)
подстадия A	155 (87,6%)
подстадия B	22 (12,4%)
ISS	n = 128
стадия I	27 (21,1%)
стадия II	46 (35,9%)
стадия III	55 (43,0%)
Секретирующая миелома	n = 177
Бенс-Джонса	16 (9,0%)
IgG	114 (64,4%)
IgA	36 (20,3%)
IgM	1 (0,6%)
"цепная" миелома	8 (4,5%)
Тип секретируемой цепи	n = 166
каппа	121 (72,9%)
лямбда	45 (27,1%)
Несекретирующая миелома	2 (1,2%)
Вариант первичной противомиеломной терапии	n = 177
стандартная	22 (12,4%)
бортезомиб-содержащие программы	152 (85,8%)
иммуномодулятор-содержащие программы	1 (0,6%)
комбинированные программы	2 (1,2%)
Вариант АТГСК в 1-й линии терапии	n = 46
одиночная	27/177 (15,2%)
тандемная	19/177 (10,7%)

Интерфазный анализ FISH-методом проведен у 176 обследуемых больных. Хромосомные aberrации выявлялись у 71/176 (40,3%) (достоверно чаще при сравнении с метафазной цитогенетикой, $p = 0,0005$). У 3,6% (5/137) пациентов ГА были обнаружены обоими методами генетического анализа (метафазный и интерфазный).

Перестройка локуса тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IgH*) выявлена у 27,3% (48/176) больных. Среди них обнаружены $t(11;14)$ — у 20,4% (36/176), $t(4;14)$ — у 6,8% (12/176) пациентов. У 3,4% (6/176) больных не удалось выявить локус партнер *IgH* гена, а у 3/176 (1,7%) пациентов отмечалось сочетанное наличие $t(11;14)$ и $t(4;14)$. Транслокации $t(14;16)$ и $t(14;20)$ не были обнаружены

ни у одного больного ММ, представленного в исследовании. Делеция $del(13)(q14)$ была третьей по частоте встречаемости ГА среди всех обследованных больных и выявлялась у 18,2% (32/176); $del(17)(p13.1)$ — у 5,7% (8/141) пациентов.

Поиск наиболее часто встречающихся ГА (перестройка *IgH*, $del(13)(q14)$ и $del(17)(p13.1)$) выполнен всем 176 пациентам. При отсутствии основных ГА и/или агрессивном течении заболевания дополнительно у 35 из 176 больных (19,9%) был проведен поиск aberrаций хромосомы 1 ($1(q21.3)$ и $1(p32.3)$). Перестройка хромосомы 1 обнаружена у 28,6% (10/35) больных.

Одновременно две ГА (абберантный, он же «сочетанный» кариотип) определялись у 10,2% (18/177) боль-

Таблица 2

Частота встречаемости генетических аномалий у больных множественной миеломой

Количество пациентов	N = 177
Аномалия	Частота, n (%)
С генетическими аномалиями	78/177 (42,9%)
Стандартная цитогенетика	12/137 (8,7%)
Гипердиплоидия	4 (2,9%)
Гиподиплоидия	5 (3,6%)
$del(13)(q14)$	1 (0,73%)
$del(20)(q12)$	1 (0,73%)
$del(8)(q24)$	1 (0,73%)
FISH метод	71/176 (40,3%)
$t(11;14)$	36 (20,4%)
$t(4;14)$	12 (6,8%)
$t(14;16)$	0/6 (0%)
$t(14;20)$	0/6 (0%)
Перестройка <i>IgH</i> без гена-партнера	6 (3,4%)
$del(13)(q14)$	32 (18,3%)
$del(17)(p13.1)$	8/141 (5,7%)
Аномалии 1 хромосомы	10/35 (28,6%)
Сочетание генетических аномалий	18/177 (10,2%)
$del(13)(q14)+t(4;14)$	3 (1,7%)
$del(13)(q14)$ + гипердиплоидия	1 (0,56%)
$del(13)(q14)+t(11;14)$	5 (2,8%)
$del(13)(q14)+(+1q)$	2 (1,1%)
$del(13)(q14)+del(17)(p13.1)$	1 (0,56%)
$t(4;14)+t(11;14)$	1 (0,56%)
$t(11;14)+(+1q)$	1 (0,56%)
$t(4;14)+(+1q)$	1 (0,56%)
$t(11;14)+del(17)(p13.1)$	2 (1,1%)
перестройка <i>IgH</i> + (+1q)	1 (0,56%)
Комплексный кариотип	8/177 (4,5%)
Гиподиплоидия + $t(4;14)$ + $del(13)(q14)$ + (+1q)	1 (0,56%)
$t(11;14)$ + $del(13)(q14)$ + (+1q)	1 (0,56%)
Гипердиплоидия + $t(11;14)$ + $del(13)(q14)$ + $del17p13.1$	1 (0,56%)
$t(11;14)$ + $del(17)(p13.1)$ + (+1q)	1 (0,56%)
$del(13)(q14)$ + $del(17)(p13.1)$ + (+1q)	1 (0,56%)
Гиподиплоидия + $del(13)(q14)$ + (+1q)	1 (0,56%)
Гипердиплоидия + $t(11;14)$ + $del(1)(q22)$	1 (0,56%)
Гипердиплоидия + $t(11;14)$ + $t(4;14)$ + $del(17)(p13.1)$	1 (0,56%)
Норма	101/177 (57,1%)

ных: $\text{del}(13)(q14)$ и $t(4;14)$ — у 1,7% (3/176); $\text{del}(13)(q14)$ и гипердиплоидия — у 0,56% (1/176); $\text{del}(13)(q14)$ и $t(11;14)$ — у 2,8% (5/176); $\text{del}(17)(p13.1)$ и $t(11;14)$, а также $t(11;14)+\text{del}(17)(p13.1)$ — у 1,1% (2/176) в обоих случаях; $t(4;14)$ и $t(11;14)$, перестройка *IgH* и $\text{del}(1)(q21.3)$, $\text{del}(13)(q14)+\text{del}(17)(p13.1)$, $t(11;14)+(\text{dup}(1q))$, $t(4;14)+(\text{dup}(1q))$ — у 1 пациента из 176 (0,56% во всех случаях). Наличие 3 и более ГА (комплексный кариотип) выявлено у 4,5% (8/177) больных ММ (табл. 2).

Прогрессирование или рецидив ММ может возникать при пролиферации первичного и/или нового опухолевого клона ПлК в костном мозге, вследствие клональной эволюции, что может характеризоваться появлением дополнительных вторичных генетических aberrаций. При сравнении частоты встречаемости специфических генетических нарушений отмечалось увеличение вторичных неблагоприятных ГА. Так, делеция $\text{del}(17)(p13.1)$ выявлена у 1,8% (2/111) при первичной диагностике и у 12,1% (6/48) при рецидиве/прогрессировании ($p = 0,015$). Перестройка *IgH* встречалась

у 25,0% (11/44) при первичной диагностике и у 32,3% (41/127) пациентов при прогрессировании/рецидиве заболевания ($p = 0,018$). Для других ГА статистическая разница не была выявлена.

При поиске взаимосвязи между ГА и клиническими проявлениями было выявлено, что при транслокации $t(11;14)$ чаще встречалась хроническая почечная недостаточность, чем при отсутствии генетических aberrаций (40% (8/20) и 7,4% (7/95) соответственно, $p = 0,001$).

Эффективность первичной противомиеломной терапии не продемонстрировала значимых различий в зависимости от генетического статуса пациентов. Частота общего ответа (строгий полный ответ (строгий ПО), полный ответ (ПО), очень хороший частичный ответ (ОХЧО), частичный ответ (ЧО)) у пациентов без ГА составила 73,5% (75/102), с $t(11;14)$ — 67,9% (9/17), с $t(4;14)$ — 66,0% (3/5), с $\text{del}(13)(q14)$ — 66,6% (10/15), с $\text{del}(17)(p13.1)$ — 62,5% (5/8), с сочетанным кариотипом — 82,3% (14/17), с комплексным кариотипом — 63,6% (7/11) ($p > 0,05$ для всех групп сравнения).

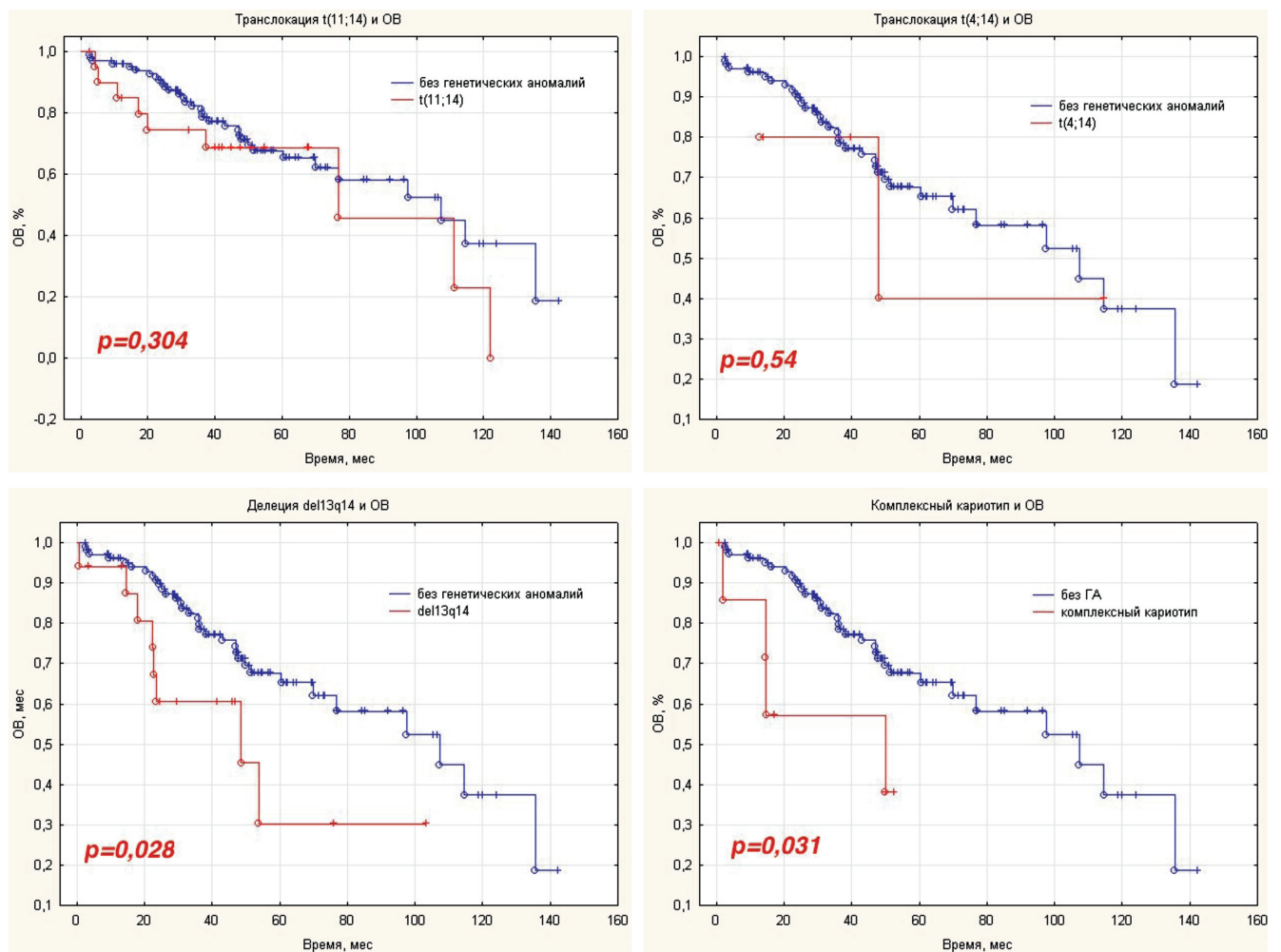


Рис. 1. Общая выживаемость больных ММ с различными генетическими аномалиями.

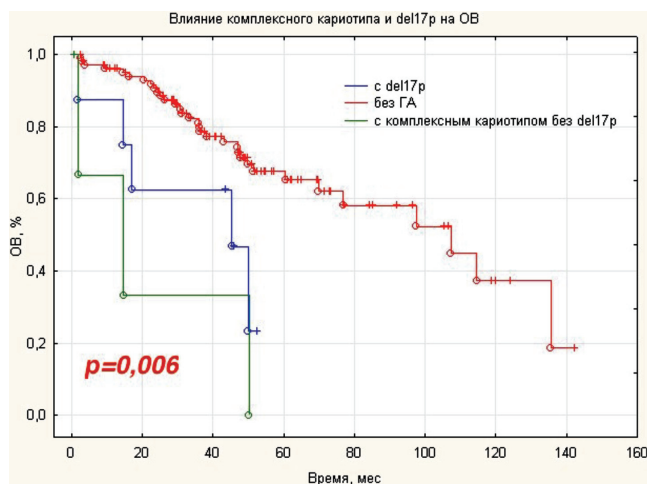


Рис. 2. Общая выживаемость больных ММ с del(17)(p13.1) и комплексным кариотипом.

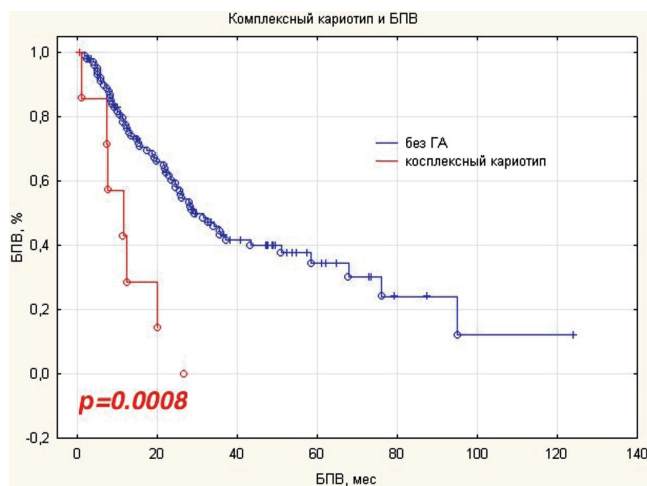


Рис. 3. Беспрогрессивная выживаемость больных ММ без генетических аномалий и с комплексным кариотипом.

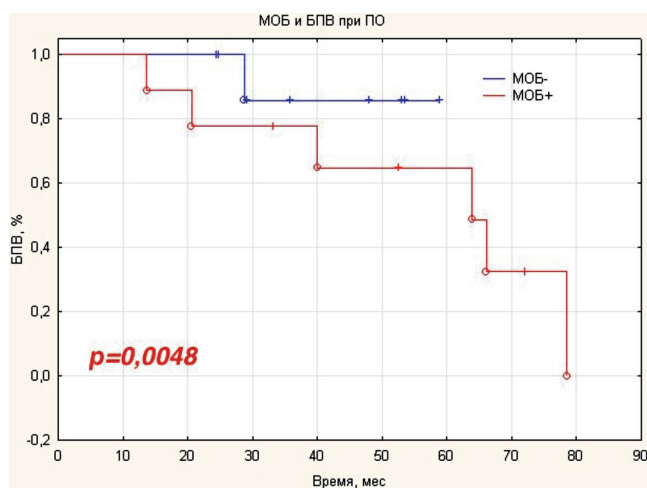


Рис. 4. Беспрогрессивная выживаемость больных ММ с полным ответом в зависимости от статуса минимальной остаточной болезни.

С целью определения прогностической значимости хромосомных аномалий была исследована ОБ пациентов с различными вариантами генетических нарушений. Так, медиана ОБ в группе без ГА составила 107,2 мес.; с изолированными t(11;14) — 76,8 мес. ($p = 0,304$ при сравнении с группой без ГА); с t(4;14) — 47,9 мес. ($p = 0,54$); с del(13)(q14) — 48,6 мес. ($p = 0,028$), с комплексным кариотипом — 49,7 мес. ($p = 0,031$) (рис. 1). Медиана ОБ пациентов с «сочетанным» кариотипом составила 51,6 мес. и статистически значимо не отличалась от медианы ОБ больных без ГА ($p = 0,16$).

Для выявления прогностической значимости комплексного кариотипа без del(17)(p13.1) проведен сравнительный анализ ОБ пациентов с комплексным кариотипом без del(17)(p13.1) ($n = 3$) с группой пациентов, имеющих del(17)(p13.1) ($n = 8$) и группой без ГА ($n = 101$). Медиана ОБ составила 14,8 мес., 45,1 мес. и 107,2 мес. соответственно ($p = 0,006$) (рис. 2).

Самостоятельное влияние гиподиплоидии и гипердиплоидии на показатели выживаемости и прогноз в данной работе не оценивалось в связи с редким выявлением данных ГА в группе обследованных больных ММ.

Проведенный анализ БПВ продемонстрировал, что медиана показателя достоверно не различалась в группах больных и составила: у пациентов без ГА — 30,4 мес., с наличием t(11;14) — 25,2 мес., с t(4;14) — 30,4 мес., с del(13)(q14) — 22,9 мес., с aberrантным («сочетанным») кариотипом — 21,8 мес. ($p > 0,05$ для всех групп сравнения). Однако, выявлена статистически значимые различия между медианой БПВ в группе с комплексным кариотипом по сравнению с таковой в группе без ГА (11,4 мес. и 30,4 мес. соответственно, $p = 0,0008$) (рис. 3).

У 26 из 177 обследованных больных проведена оценка МОБ с помощью ПЦ. Позитивный статус МОБ (МОБ+) имели 19 из 28 (67,8%) пациентов (ПО — 9, ОХЧО — 5, ЧО — 5), 9 из 28 (32,2%) — МОБ негативный статус (МОБ-) (строгий ПО — 2, ПО — 7). У 7/26 (26,9%) пациентов были выявлены ГА перед началом первичной противомиеломной терапии: t(11;14) — у 5/26 (19,2%), del(13q) — у 3/26 (11,5%), t(4;14) — у 1/26 (3,8%), del(1p) — у 1/26 (3,8%). При обследовании после лечения пациенты с полным ответом (МОБ+ и МОБ-) имели нормальный генетический статус по данным стандартной цитогенетики и FISH метода. Только у 1/7 пациента с ЧО и МОБ+ статусом определялся остаточный опухолевый клон с del(13)(q14). При оценке медианы БПВ в группе больных с ПО было выявлено преимущество в группе МОБ- ($n = 9$) по сравнению с МОБ+ ($n = 9$). Медиана БПВ при МОБ- не была достигнута, при МОБ+ составила 63,9 мес. ($p = 0,0048$) (рис. 4).

Обсуждение

Вариабельность ГА обусловлена различными патогенетическими механизмами, происходящими в ПЛК, что определяет биологические особенности клеток опухолевого клона. Генетические аномалии можно подразделить на количественные (гипердиплоидии, гиподиплоидии, моносомии) и структурные (транслокации, делеции, дупликации и др.), каждая из которых обладает собственным прогностическим потенциалом. Нарушения количественного состава хромосом встречаются очень редко, что обусловлено низкой информативностью стандартного цитогенетического метода и зачастую их вторичным характером и сочетанием с другими генетическими нарушениями, в том числе в составе комплексного кариотипа. Гипердиплоидия обычно ассоциируется с благоприятным прогнозом, длительной ОВ [25, 26], в свою очередь, гиподиплоидия связана с более короткой продолжительностью жизни больных ММ [27].

Частота встречаемости $t(11;14)$ на момент постановки диагноза у больных ММ варьирует от 15 до 20% [28, 29]. Первоначально авторами нескольких исследований было сообщено о неблагоприятном влиянии данной транслокации, однако, более крупные клинические исследования не подтвердили ухудшения показателей выживаемости при наличии $t(11;14)$ по сравнению с группой без ГА [30, 31]. В нашем исследовании $t(11;14)$ была выявлена у 20,4% (36/176) обследованных больных и имела наиболее благоприятное прогностическое значение, по сравнению с другими характерными для ММ генетическими нарушениями. Транслокация $t(4;14)$ обнаруживается приблизительно у 15% пациентов при использовании FISH-метода и не выявляется при стандартном цитогенетическом исследовании из-за расположения транслокационных локусов вблизи с теломерой [32, 33]. Интересно отметить, что ранее, при использовании стандартной химиотерапии, $t(4;14)$ рассматривалась как фактор крайне неблагоприятного прогноза [34, 35]. Однако использование бортезомиб-содержащих программ терапии улучшило показатели выживаемости данной группы больных ММ, нивелировав негативное прогностическое влияние данной ГА [36, 37]. По результатам нашего исследования $t(4;14)$ выявлена лишь у 6,8% (12/176) больных ММ и нередко обнаруживалась в составе aberrантного («сочетанного») и комплексного кариотипов [38].

Делеция/моносомия хромосомы 13 обнаружена лишь в 18,2% (32/176) случаев по сравнению с 50% выявляемостью по данным литературы и ассоциировалась как с нормальным кариотипом, так и с гипо- или гипердиплоидией [39, 40]. При частичной потере хромосомы 13q происходит утрата гена-супрессора опухолевого роста *RBI*, что приводит к нарушению клеточного цикла и повышенной пролиферации клональных ПЛК, обуславливая неблагоприятный прогноз течения заболевания. Однако G. Tricot и соавторы предложили рассматривать $-13/del(13q)$, как фактор неблагоприят-

ного прогноза только при обнаружении данной аномалии методом рутинной метафазной цитогенетики [41]. Ряд исследователей демонстрирует в своих работах потерю прогностической значимости $-13/del(13q)$ при ее обнаружении только FISH-методом, в связи с частым обнаружением других маркеров прогноза, затрудняющих оценку прогностической значимости $-13/del(13q)$ [42]. Нами было статистически подтверждено негативное влияние $-del(13/13q)$, выявленной FISH-методом, на БПВ и ОВ больных ММ.

Делеция $del(17p)$ является одной из наиболее прогностически неблагоприятных ГА встречающихся при ММ и других гемобластозах. Это генетическое событие, как правило носит вторичный характер, чаще встречается при прогрессировании или резистентном агрессивном течении заболевания и характеризуется короткой продолжительностью жизни [43, 43]. У больных с $del(17p)$ зачастую обнаруживаются и другие более ранние ГА, что свидетельствует о вторичном характере данной aberrации.

Аномалии хромосомы 1 встречались у 28,6% (10/35) пациентов, что было незначительно ниже, чем в работах других авторов, описывающих аномалии у 30—40% больных с впервые выявленной ММ [45]. Наиболее часто встречающимися aberrациями хромосомы 1 при ММ являются дупликация 1q и делеция 1p плеч. Аномалии хромосомы 1 нередко являются частью «сочетанного» или комплексного кариотипов и рассматриваются, как неблагоприятное событие, приводящее к укорочению продолжительности жизни больных ММ [46—49].

Aberrантный («сочетанный») и комплексный кариотипы могут характеризоваться одновременным наличием разнонаправленных (неблагоприятных и благоприятных) аномалий, что затрудняет оценку их прогностической значимости и требует индивидуального рассмотрения каждого такого случая при ММ.

Обобщение результатов влияния ГА на выживаемость больных ММ многих исследовательских центров привело к появлению классификаций генетических аномалий и разработке молекулярно-генетической стратификации риска mSMART 2.0 (Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy). Данная система стратификации неоднократно пересматривалась и редактировалась с получением новых сведений о выживаемости пациентов. Больные с $del(17p)$, комплексным кариотипом, имеющие наихудшие показатели выживаемости сформировали группу высокого риска. В то время как пациенты с $t(4;14)$, моносомией/делецией хромосомы 13, аномалиями хромосомы 1, а также гиподиплоидией — группу промежуточного риска. Больные с отсутствием ГА и аномалиями, сопровождающимися наилучшими показателями выживаемости (гипердиплоидия, $t(11;14)$ и другими ГА), вошли в группу стандартного риска. По данным авторов стратификации риска mSMART 2.0 медиана ОВ для пациентов высокого риска составля-

ет 3 года, промежуточного риска 4–5 лет, стандартного риска — 8–10 лет [50].

В нашей работе проведена оценка ОБ согласно распределению больных в соответствующие группы риска mSMART 2.0. Медиана ОБ в группе стандартного риска ($n = 131$) составила 107,4 мес. и была обусловлена прежде всего продолжительностью жизни больных без ГА. Медианы ОБ больных в группах промежуточного ($n = 35$) и высокого риска ($n = 11$) были достоверно ниже и составили 76 мес. и 45,2 мес. соответственно ($p = 0,021$ при регрессионном анализе) (рис. 5), что соответствовало показателям ОБ по системе mSMART 2.0, полученной авторами из клиники Mayo [39].

Беспрогрессивная выживаемость в группах стандартного и промежуточного риска статистически не отличалась и составила 30,6 мес. и 29,5 мес. соответственно. Короткая БПВ была характерна для больных высокого риска (11,4 мес.), что оказалось статистически значимо

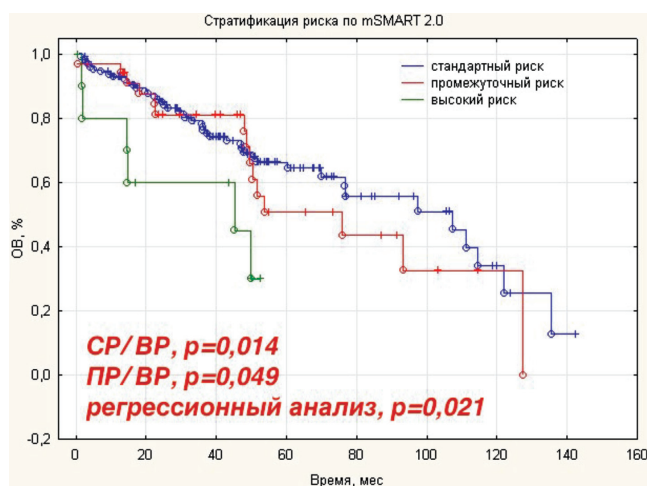


Рис. 5. Общая выживаемость больных ММ в группах согласно стратификации риска.

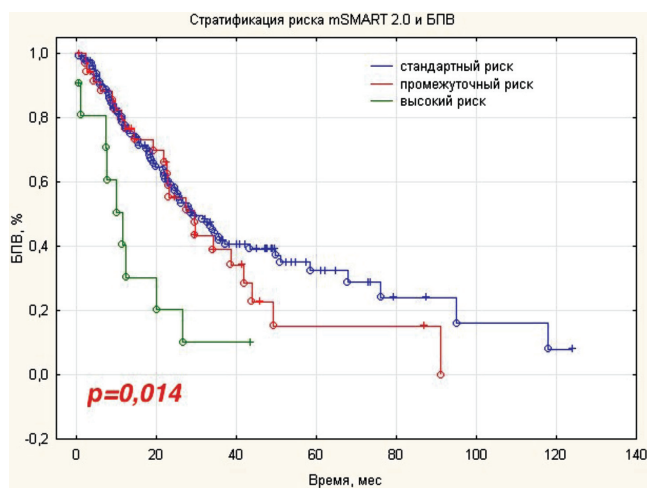


Рис. 6. Беспрогрессивная выживаемость больных ММ при стратификации риска.

при сравнении с группой стандартного и промежуточного рисков ($p = 0,014$) (рис. 6).

Оценка статуса МОБ после проведения противоопухолевой терапии также является самостоятельным прогностическим фактором. По данным ряда авторов, наличие МОБ у пациентов с ММ является неблагоприятным событием [51–53], однако отсутствие МОБ не всегда является благоприятным фактором и не свидетельствует о полной эрадикации клональных ПлК и излечении заболевания. Ложноотрицательный статус МОБ при ММ может быть обусловлен очаговостью поражения костного мозга, развитием постцитостатической гипоплазии, техническими погрешностями при получении костномозгового аспирата, ограничениями, обусловленными разрешающей способностью генетических методов и ПЦ. Применение генетических методов исследований у больных ММ после терапии оказалось малоинформативным вследствие более низкой чувствительности данного метода по сравнению с ПЦ. Лишь у одного пациента с ЧО удалось выявить остаточный клон патологических клеток, в то время как при достижении ОХЧО и ПО у всех пациентов, с выявленными ранее ГА, генетические нарушения не определялись, не смотря на МОБ+ статус пациентов при ПЦ.

Заключение

Анализ генетического аппарата клональных ПлК методом FISH перевернул представление о патогенезе ММ и о роли ГА в развитии заболевания, и стал незаменимым исследованием на этапах диагностики, рецидива и прогрессирования заболевания. Хотя стандартное цитогенетическое исследование обладает низким порогом детекции, его актуальность остается на прежнем уровне, особенно при выявлении комплексных хромосомных нарушений. Основной трудностью верификации генетических и молекулярно-генетических аномалий остается относительно небольшое содержание опухолевых ПлК в аспирате костного мозга и их низкая митотическая активность. Эта проблема может быть решена с помощью использования клеточных сортеров с последующим анализом выделенных клональных ПлК.

Генетические аномалии заслуженно являются независимыми прогностическими факторами, влияющими на длительность жизни больных ММ. Наличие неблагоприятных aberrаций служит поводом для проведения агрессивного многокомпонентного лечения и динамического наблюдения за исходно выявленными и вторично возникающими генетическими нарушениями, в то время как благоприятные аномалии, могут быть нивелированы стандартными терапевтическими подходами. Отдельный интерес вызывает прогностическая значимость комплексных нарушений, требующая дальнейшего изучения. На сегодняшний день молекулярно-генетическая стратификация рисков при ММ является новым перспективным динамическим подходом, который

должен применяться наряду с другими прогностическими факторами, такими, как стадирование или статус МОБ, оцененный иммунофенотипическими, генетическими и другими методами исследований.

Список литературы

1. Гематология: Новейший справочник. Санкт-Петербург: Изд-во Сова; 2004. 928 с.
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Plasma cell disorders. In: Goldman L, Ausiello DA, eds. Cecil Textbook of Medicine. 22nd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 2004:1184-1195.
3. Greipp P.R., San Miguel J., Durie B.G. et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005;23:3412-3420.
4. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood.* 1985;66:380-390.
5. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B. Cytogenetic finding in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995;82:41-49.
6. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2001;98:2229-2238.
7. Barlogie B, Alexanian R, Dixon D et al. Prognostic implications of tumor cell DNA and RNA content in multiple myeloma. *Blood.* 1985;66:338-341.
8. Drach J, Schuster J, Nowotny H, et al. Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 1995;55:3854-3859.
9. Zojer N, Konigsberg R, Ackermann J, et al. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood.* 2000;95:1925-1930.
10. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillem G, et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum 2-microglobulin produce a very powerful myeloma staging system for patients receiving high dose therapy. *Blood.* 2001; 97:1566-1571.
11. Fonseca R, Harrington D, Oken MM, et al. Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (13) in multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer Res.* 2002;62:715-720.
12. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood.* 2003;101:4569-4575.
13. Chang H, Qi C, Yi QL, Reece D, Stewart AK. 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;105:358-360.
14. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer.* 1975;36:842-854.
15. Rifkin R, Gregory SA, Mohrbacher A, Hussein M. Pegylated liposomal doxorubicin, vincristine, and dexamethasone provide significant reduction in toxicity compared with doxorubicin, vincristine, and dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a phase III multicenter randomized trial. *Cancer* 2006;106:848-858.
16. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2013;31:448-455.
17. Richardson P, Sonneveld P, Schuster M, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005;352:2487-2498.
18. Reeder CB, Reece DE, Kukreti V, et al. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial. *Leukemia* 2009;23:1337-1341.
19. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2010;11:29-37.
20. Rajkumar S, Blood EA, Vesole D, et al. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2006;24:431-436.
21. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet* 2010;376:2075-2085.
22. Richardson P, Weller E, Lonial S, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2010;116:679-686.
23. Moreau P, Facon T, Attal M, et al. Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myelome 9502 randomized trial. *Blood* 2002;99:731-735.
24. Simons A, Shaffer LG, Hastings RJ. Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition. *Cytogenet Genome Res* 2013;141:1-6.
25. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001;98(7):2229-2238.
26. Perez-Simon JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD, et al. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998;91:3366-3371.
27. Fassas AB, Spencer T, Sawyer J, et al. Both hypodiploidy and deletion of chromosome 13 independently confer poor prognosis in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2002;118:1041-1047.
28. Fonseca R, Harrington D, Oken M, et al. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32) represents a uniquely defined biological subset of patients. *Blood* 2002;99:3735-3741.
29. Avet-Loiseau H, Li JY, Facon T, et al. High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *RCancer Res.* 1998;58(24):5640-5.
30. 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;86:4250-4256.
31. Lai JL, Michaux L, Dastugue N, et al. Cytogenetics in multiple myeloma: a multicenter study of 24 patients with

t(11;14)(q13;q32) or its variant. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;104:133-138.

32. Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br. J. Haematol.* 1988;100:637-646.

33. Fonseca R, Oken M, Harrington D, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q-arm or monosomy. *Leukemia (Baltimore)* 2001;15:981-986.

34. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003;101(4):1520-1529.

35. Chang H, Sloan S, Li D, et al. The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant. *British Journal of Haematology* 2004;125(1):64-68.

36. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine* 2008; 359(9): 906-917.

37. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *Journal of Clinical Oncology* 2010;28(30): 4630-4634.

38. Гарифуллин АД, Мартынкевич ИС, Волошин СВ и др. Роль молекулярно-генетических аномалий в патогенезе и стратификации риска множественной миеломы. *Вопросы онкологии* 2016;4:14-21.

39. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy *Leukemia* 2001;15(6):981-986.

40. Chiecchio L, Protheroe RKM, Ibrahim AH, et al. Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma. *Leukemia* 2006;20(9):1610-1617.

41. Shaughnessy J. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology* 2005;10(1):117-126.

42. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J. et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23(12):2210-2221.

43. Avet-Loiseau H, Soulier J, Fermand JP, et al. Impact of high-risk cytogenetics and prior therapy on out-comes in patients with advanced relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone. *Leukemia* 2010;24(3):623-628.

44. 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): 802-809.

45. Chang H, Qi X, Jiang A, et al. 1p21 deletions are strongly associated with 1q21 gains and are an independent adverse prognostic factor for the outcome of high-dose chemotherapy in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation* 2010;45(1):117-121.

46. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 2007;109(6):2276-2284.

47. Nemec P, Zemanova Z, Greslicova H, et al. Gain of 1q21 is an unfavorable genetic prognosis factor for multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(4):548-554.

48. Boyd KD, Ross FM, Walker BA, et al. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clinical Cancer Research* 2011;17(24):7776-7784.

49. Множественная миелома: Руководство для врачей. Санкт-Петербург: Специальное издательство медицинских книг; 2016. 504 с.

50. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* 2013;88(7):360-376.

51. Paiva B, Jacques JM, van Dongen, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood* 2015;125:3059-3068.

52. Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Clinical Oncology* 2015;12:286-295.

53. Munshi NC. Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma. *Journal of clinical oncology* 2013;31.

Genetic anomalies show independent influence on life expectancy of patients at oncological diseases

Garifullin A.D.¹, Voloshin S.V.¹, Martynkevich I.S.¹, Kleina E.V.¹, Salogub G.N.^{2,3}, Karyagina E.V.³, Abdulkadyrov K.V.¹, Chechetkin A.V.¹

¹ — Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology,

191024, Saint-Petersburg, 2-aya Sovetskaya, 16, e-mail: bloodscience@mail.ru

² — First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, 197089, 6/8, Lva Tolstogo street, St. Petersburg, e-mail: librini68@gmail.com

³ — Federal State Budgetary Institution V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 197341, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg

⁴ — City Hospital N15, 198295, Saint-Petersburg, Avangardnaya, 4, e-mail: b15@zdrav.spb.ru

Genetic anomalies: the influence on efficiency of therapy, survival of patients with multiple myeloma, a role in assessment of minimal residual disease. In our research the frequency of occurrence of genetic anomalies and their predictive potential at multiple myeloma is determined. Detection of anomalies was carried out by standard cytogenetic method and fluorescent in situ hybridization (FISH). IgH reorganization (t(11;14), t(4;14), etc.), del(13)(q14), del(17)(p13.1), anomalies of 1 chromosome, hypodiploidy, hyperdiploidy, combined and complex karyotypes decided at patients with multiple myeloma. Genetic anomalies were detected in 57.1% of patients, the frequency of occurrence of anomalies of 1 chromosome, t(11;14), del(13)(q14), t(4;14), del(17)(p13.1), hyperdiploidy, hypodiploidy — in 28.6%, 20.3%, 18.1%, 6.8%, 5.6%, 3.6 and 2.9%, respectively. Duration of observation has averaged 5 years and has shown that del17p13.1 reduced overall survival, t(11;14) didn't influence the forecast. The complex karyotype has shown negative impact on survival indicators, generally due to existence predictively of adverse anomalies (del(17)(p13.1), del(13)(q14), t(4;14), (+1q)). The Minimal Residual Disease can be revealed by means of flow cytometry and also genetic methods of researches directed to identification of earlier defined anomalies.

Key words: multiple myeloma, genetic anomalies, minimal residual disease, fluorescence in situ hybridization, overall survival, progression-free survival