

Казаков С.П.^{1,2}✉, Решетняк Д.В.¹, Клеина И.В.¹, Рукавицын О.А.¹

¹ Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко, Москва, Россия

² Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Использование цитогенетических исследований в диагностике и терапии множественной миеломы

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Казаков С.П. – формирование идеи, методическое руководство, редакция; Решетняк Д.В. – статистический анализ, написание текста статьи; Клеина И.В. – проведение исследований, первичный анализ данных; Рукавицын О.А. – сбор и анализ клинических данных.

Подана: 02.02.2023

Принята: 23.02.2023

Контакты: dvrlid@yandex.ru

Резюме

В ходе работы по созданию оптимального диагностического алгоритма для выявления множественной миеломы (ММ) и мониторинга ее терапии нами была проведена оценка эффективности использования цитогенетических исследований при диагностике и терапии ММ. Был проведен анализ 115 случаев ММ по результатам цитогенетического и цитологического исследований. Выявлено, что генетические нарушения имели место в 82,6% случаев ММ, а количество плазмочитов в миелограмме могло иметь тенденцию к увеличению в зависимости от повышения сформированной цитогенетическим исследованием группы риска. Использование цитогенетического анализа и прогностическая стратификация на его основе признаны важными для создания алгоритма комплексной диагностики ММ. Показана необходимость цитогенетического анализа и анализа фенотипических особенностей клеток костного мозга в комплексной иммунохимической диагностике ММ и ее роль в скрининговых, мониторинговых и прогностических направлениях диагностики парапротеинемий.

Ключевые слова: множественная миелома, лабораторная диагностика, цитогенетические исследования, цитологические исследования, костный мозг



Kazakov S.^{1,2}✉, Reshetnyak D.¹, Kleina E.¹, Rukavitsyn O.¹

¹ Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow, Russia

² Russian Medical Academy for Continuing Professional Education, Moscow, Russia

Using of Cytogenetic Studies for Diagnosis and Therapy of Multiple Myeloma

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kazakov S. – idea formation, methodological supervising, editing; Reshetnyak D. – statistical analysis, writing the text of the article; Kleina I. – research, primary data analysis; Rukavitsyn O. – collection and analysis of clinical data.

Submitted: 02.02.2023

Accepted: 23.02.2023

Contacts: dvrlid@yandex.ru

Abstract

In the course of work on the creation of an optimal diagnostic algorithm for the detection of multiple myeloma (MM) and monitoring of its therapy, we evaluated the effectiveness of the use of cytogenetic studies in the diagnosis and therapy of MM. MM 115 cases were analyzed based on the results of cytogenetic and cytological studies. It was revealed that genetic disorders occurred in 82.6% of MM cases, and the number of plasmocytes in the myelogram could tend to increase depending on the increase in the risk group formed by cytogenetic research. The use of cytogenetic analysis and prognostic stratification based on it are recognized as important for the creation of an algorithm for the complex diagnosis of MM. The necessity of cytogenetic analysis and phenotypic features of bone marrow cells in the complex immunochemical diagnosis of MM and its role in screening, monitoring and prognostic directions for the diagnosis of paraproteinemia is shown.

Keywords: multiple myeloma, laboratory diagnostics, cytogenetic studies, cytological studies, bone marrow

■ ВВЕДЕНИЕ

Множественная миелома (ММ) – злокачественное новообразование, вызванное многоочаговой пролиферацией неопластических плазматических клеток с патологической секрецией атипичного моноклонального иммуноглобулина (Ig). Случаи ММ составляют до 1% всех злокачественных новообразований и до 15% всех миелолипролиферативных заболеваний. Заболеваемость ММ в РФ составляет 2,8–6,4⁰/₀₀₀₀ в зависимости от региона, а смертность достигает 1,8–2,3⁰/₀₀₀₀ [1, 2], в связи с чем данное заболевание является значимой медико-социальной проблемой. Терапия ММ осложнена в значительной степени тем, что опухолевая трансформация при этом заболевании имеет многоступенчатый характер, этиопатогенез ее до сих пор малоизучен. Основные диагностические направления при ММ, реализуемые нами, были ассоциированы с исследованием миелограммы, фенотипирования костного мозга, исследованием М-градиента и парапротеинов, а также взаимоотношения фенотипа клеток костного мозга с цитогенетическими особенностями [3–7]. Также до конца не уточнены и диагностические алгоритмы (скрининговые и мониторинговые)

при обследовании пациентов с ММ, прогностики и мониторинга терапии, хотя очевидно, что диагностика ММ должна быть комплексной, включающей в том числе и ряд методов клинической лабораторной диагностики [8–10].

Так, например, признано необходимым использование в диагностике ММ цитогенетического анализа. Согласно современным представлениям, наиболее значимыми факторами, определяющими характер течения заболевания, его прогноз и выживаемость пациентов, могут являться цитогенетические и молекулярно-генетические особенности опухолевых клеток [11]. К числу таковых относятся прежде всего отдельные хромосомные аномалии, способные определять ответ на терапию [12]. В 2007 г. был разработан принцип классификации ММ на основании выявленных цитогенетических нарушений и профиля экспрессии множества генов (Gene Expression Profiling, GEP) со стратификацией пациентов на группы стандартного, промежуточного и высокого риска для проведения дифференцированной терапии (Mayo Stratification for Myeloma And Risk-adapted Therapy, mSMART) [13], ставшей общепринятой [14].

По этой стратификации в группу высокого риска входят пациенты с транслокациями хромосом $t(14;16)$, $t(14;20)$, делецией хромосомы (17p) и высокой экспрессией генов. В группу промежуточного риска – с транслокацией $t(4;14)$ и высокой степенью пролиферации плазмочитов. Трисомии и транслокации $t(11;14)$ и $t(6;14)$ свойственны группе «стандартного» риска.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

На данном этапе нашей целью являлся анализ работы лаборатории цитогенетических исследований и результатов его вклада в диагностику ММ в гематологическом центре многопрофильного медицинского учреждения с целью определения места и объема цитогенетических исследований в разрабатываемом алгоритме диагностики ММ, прогностике и мониторинге эффективности терапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период 2016–2021 гг. из числа плановых пациентов центра нами были обследованы 115 пациентов с первично выявленными клиническими проявлениями множественной миеломы (ММ). У всех пациентов получен пунктат костного мозга для цитологического исследования и исследования с применением цитогенетического метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Возраст пациентов с выявленной ММ составил 23–98 лет, средний возраст – 64,7. Группа включала 39 женщин (33,9%) в возрасте 36–98 лет (средний возраст – 69,7) и 76 мужчин (66,1%) в возрасте 23–88 лет (в среднем – 63,1). Преобладание в группе мужчин несколько противоречит большинству данных литературы [1, 2], но может быть объяснено спецификой медучреждения. Минимальный и средний возраст пациентов разных полов отличается, позволяя предполагать, что мужчины могут заболеть в более раннем возрасте, что соответствует в целом данным литературы, однако в нашей выборке это расхождение статистически не подтверждается, прежде всего из-за небольшого количества женщин.

Результаты цитогенетического и цитологического анализа представлены в таблице.



Результаты цитогенетических и цитологических исследований пациентов с клинически выявленной ММ со стратификацией по GEP
Results of cytogenetic and cytological studies of patients with clinically identified MM with GEP stratification

Показатели \ Классификация GEP	Страта I	Страта II	Страта III	Нарушений не выявлено
Количество пациентов	15	6	74	20
% от общего числа	13,0	5,2	64,3	17,4
Среднее количество цитогенетических нарушений	3,20	3,67	1,32	0
Относительное количество плазмочитов в миелограмме, %	7,6–96,2	15,9–88,0	0,2–83,0	0,1–12,5
Среднее количество плазмочитов в миелограмме, %	39,6	50,9	23,6 ^{I, II}	2,7

Примечание: ^{I, II} достоверное (<0,05) отличие от страт I и II.

К первой страте (высокого риска) по результатам FISH было отнесено 15 пациентов (13,0% всех обследованных) в возрасте 39–83 лет (средний возраст 60,1): 3 женщины 62–67 лет (средний возраст – 63,7) и 12 мужчин 39–83 лет (средний возраст 58,9). Во второй страте (промежуточного риска) оказалось 6 пациентов (5,2%) 63–82 лет (средний возраст – 70,5): 3 женщины 67–71 года (средний возраст – 69,0) и 3 мужчин 63–82 лет (средний возраст – 72,0). В третьей (стандартного риска) – 74 пациента (64,3%) в возрасте 23–88 лет (средний возраст – 66,2): 28 женщин 38–88 лет (средний возраст – 67,4) и 46 мужчин 23–85 лет (средний возраст – 64,8). У 20 пациентов (17,4%) методом FISH генетических нарушений выявлено не было.

В первой страте у 5 пациентов (33,3%) выявлена транслокация t(11;14), у 2 (13,3%) – t(4;14), у 2 (13,3%) – t(14;20) и у одного – t(14;16). У 7 пациентов (46,7%) в исследовании 13q14q34 определены делеция или моносомия хромосомы 13. У 13 пациентов (86,7%) обнаружено выпадение или отсутствие локуса гена TP53, у 12 (80,0%) наблюдалась перестройка и делеция генов Н-цепей иммуноглобулинов (IgH). Также у 8 (53,3%) пациентов в кариотипе выявлен триплоидный и гиперплоидный клон со множественными хромосомными перестройками, сочетавшийся с делецией антионкогена TP53. У одного пациента (6,7%) наблюдалась делеция SRD и дупликация 1q21. Все пациенты первой страты имели не менее двух отклонений в геноме, в среднем количество генетических отклонений составило 3,2 на одного пациента.

Во второй страте у 5 пациентов (83,3%) выявлена транслокация t(4;14). У 5 пациентов (83,3%) в исследовании 13q14q34 определены делеция или полисомия 13-й хромосомы. У троих (50,0%) наблюдалась делеция SRD и дупликация 1q21. У всех 6 пациентов страты наблюдалась перестройка и делеция IgH. У 1 пациента (16,7%) обнаружена полисомия гена TP53. Также у 2 (33,3%) пациентов в кариотипе выявлен гипо- или гиперплоидный клон с хромосомными перестройками, не сочетавшийся с изменениями TP53. Все пациенты второй страты имели не менее двух отклонений в геноме, в среднем количество генетических отклонений составило 3,67 на одного пациента.

В третьей страте у 6 пациентов (8,1%) выявлена транслокация t(11;14), еще у 5 – (6,8%) дополнительный сигнал от 11-й хромосомы, и у одного (1,3%) – от 16-й. У 12 пациентов (16,2%) определены делеция или моносомия 13-й хромосомы. Два пациента (2,7%) имели трисомию или дупликацию 17-й хромосомы, два других (2,7%) – делецию гена TP53 без моносомии. У одного пациента (1,3%) наблюдалась делеция SRD и дупликация 1q21. У 21 пациента (28,4%) наблюдалась перестройка и делеция IgH. Также у 5 (6,8%) наблюдался гиперплоидный клон с хромосомными перестройками и в одном случае – транслокацией t(14;22). Из пациентов третьей страты 16 (21,6%) имели по два отклонения в геноме и более, в среднем количество генетических отклонений составило 1,32 на одного пациента.

При исследовании пункта костного мозга у всех пациентов количество плазматических клеток в костном мозге составило 0,1–96,2% (в среднем – 22,9%, при референсных значениях у здоровых 1,8%), у 4 пациентов, принадлежавших разным стратам, в миелограмме резко (80–98%) преобладали бласты.

В первой страте средние показатели удельного количества плазмочитов составили 39,6% с разбросом 7,6–96,2%, у двоих в миелограмме преобладали бласты. Во второй страте показатели составили 50,9% (15,9–88,0%), 1 – с преобладанием бластов, в третьей – 23,6% (0,2–83,0%), 1 – с преобладанием бластов. У пациентов с невыявленными цитогенетическими отклонениями количество плазмочитов лишь в трех (15,0%) случаях превысило норму и в целом составляло 0,1–12,5%, в среднем – 2,7%. Таким образом, количество плазматических клеток в этой группе достоверно отличалось от всех трех страт. Также достоверное отличие $p=0,047$ имелось между стратами I и III, $p=0,048$ между стратами II и III, хотя страта II не может быть корректно проанализирована вследствие своей малочисленности.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование показывает необходимость проведения цитогенетических исследований как для стратификации пациентов, так и для включения этих исследований в разработку базовых (скрининговых), мониторинговых и прогностических алгоритмов лабораторной диагностики множественной миеломы. Проведение анализа и получение результатов цитогенетических исследований важно не только для ведения и терапии пациентов с множественной миеломой, но и для оценки этих цитогенетических и иммунохимических нарушений при выявлении моноклональной гаммапатии неясного генеза, ее дальнейшего динамического наблюдения и реализации в конкретное лимфопролиферативное заболевание. Результаты исследования показывают группу пациентов, в которой основные цитогенетические нарушения, характерные для ММ, не выявлены, при этом ассоциативно в этой группе пациентов отмечается низкий уровень плазматических клеток в миелограмме, что требует изучения этой группы и определения формы заболевания или использования возможно большего спектра цитогенетических нарушений, не определенных в рамках стандартной классификации.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных результатов свидетельствует о высокой степени выявляемости (82,6%) цитогенетических нарушений при ММ, позволяющей уточнить диагноз и предлагаемую терапию. В связи с этим использование цитогенетического анализа



и прогностическая стратификация на его основе представляются крайне полезными и, помимо прочего, могут служить отправной точкой для создания алгоритма комплексной диагностики ММ в практике гематологического центра.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kaprin A., Starinskij V., Petrova G. (eds.) *Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality)*. P.A. Herzen MNIOI – branchFSBI "NMIC of Radiology" of the Ministry of Health of Russia, Moscow. 2018, p. 250.
2. Butuhanova I., ZHalsanova E., Alekseeva A., Ochirova O. Analysis of the incidence of multiple myeloma in the Republic of Buryatia. *Modern problems of science and education*. 2016;4. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24818>
3. Moruga R., Rodkina G., Putkov S., Kazakov S. Experience of cell phenotyping bone marrow in patients with multiple myeloma. *Medical Immunology*. 2017;19, Special Issue:162.
4. Moruga R., Kazakov S. Interrelation of phenotypic and cytogenetic features of bone marrow cells in patients with multiple myeloma. *Laboratory service*. 2018;7(3):145.
5. Moruga R., Kazakov S. Some aspects of phenotypic and cytogenotypic features of bone marrow cells in patients with multiple myeloma. *Topical issues of modern military medicine; Collection of works of the Jubilee All-Russian interdepartmental scientific and practical conference dedicated to the 70th anniversary of the hospital*. M.: Editorial Board of the journal "On a combat post". 2018:242–244.
6. Pisarevskaya O., Kotel'nikova A., Kazakov S. The role of paraproteins inkidneydamage in patients with lymphoproliferative diseases. *Oncohematology*. 2019;14(3):60–68.
7. Pisarevskaya O., Kotel'nikova A., Kazakov S. Nephropathy inlymphoproliferative diseases accompanied by paraprotein secretion. *Hematology. Transfuztology. Eastern Europe*. 2020;6(1):78–90. doi: 10.34883/PI.2020.6.1.008
8. *Serum Free Light Chain analysis plus Hevlyte*. Birmingham, BSG Ltd. 2015. 7th ed. 416 p.
9. Pop V., Rukavicyn O. *Multiple myeloma and related diseases*. 3rd ed., reprint. and additional. M.: GEOTAR-Media, 2016, 224 p.
10. Kazakov S. International clinical guidelines and algorithms for the diagnosisof myeloma (report). *All-Russian Interdisciplinary Scientificand Practical Conference with International participation "Consolidation of laboratory medicine and clinical practice: diagnostic innovations, laboratory industry" on September 14–16, 2016 at the XX Anniversary Forum "National Days of Laboratory Medicine of Russia – 2016"*. Available at: https://www.youtube.com/watch?v=1G_PyxK6_78
11. Ross F.M. (ed.) European Myeloma Network. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 1997;8:1272–1277.
12. Fonseca R. (ed.) International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spot light review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210–2222.
13. Mikhael J.R. (ed.) 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(4):360–376.
14. Abramova T. *Molecular cytogenetic characteristics of plasma cells inthe onset and progression of multiple myeloma* (PhD Thesis), M. 2018.