



Медицински университет
„Проф. Д-р Параскев Стоянов“ – Варна

Факултет Медицина
Катедра „Медицинска генетика“

д-р Валентина Димитрова Митева

**„ЦИТОГЕНЕТИЧНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-
ЦИТОГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С
МНОЖЕСТВЕН МИЕЛОМ – ПРОГНОСТИЧНО
ЗНАЧЕНИЕ“**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Област на висше образование:

4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма „Генетика“

Научни ръководители:

Проф. д-р Илина Димитрова Мичева, д.м.

Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, д.б.

Варна, 2023

Дисертационният труд е представен на 123 страници и е онагледен с 39 фигури, и 12 таблици.

Библиографията обхваща 206 литературни източника, от които 5 на кирилица и 201 на латиница.

Изследванията свързани с дисертацията са извършени:

- ❖ Катедра по Медицинска генетика, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна
- ❖ Лаборатория по Медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна
- ❖ Клиника по клинична хематология, УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по Медицинска генетика, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна.

Съдържание

Използвани в текста съкращения	6
Въведение	10
I. Литературен обзор	12
1. Множествен миелом.....	12
1.1. Определение	12
1.2. Исторически данни.....	12
1.3. Епидемиология.....	14
1.4. Фамилна предиспозиция	19
1.5. Етиология.....	21
1.6. Клинични и лабораторни характеристики	22
1.6.1. Клонални плазматични клетки в костния мозък	25
1.6.2. Стадиращи системи.....	25
1.6.2.1. Стадираща система по Дюри-Салмон (Durie-Salmon Staging System, DSS) и Дюри-Салмон ПЛЮС (Durie-Salmon PLUS Staging system)	26
1.6.2.2. Международна стадираща система (International Staging System)	27
1.6.2.3. Критерии на Mayo (Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy, mSMART)	29
1.7. Хромозомни нарушения.....	29
1.7.1.1. <i>IGH</i> транслокации	32
1.7.1.1.1. <i>t(11;14)(q13.3;q32.33) CCND1/IGH</i>	33
1.7.1.1.2. <i>t(4;14)(p16.3;q32.33) MMSET/FGFR3/IGH</i>	34
1.7.1.1.3. <i>t(14;16)(q32.33;q23.2) IGH/MAF</i>	35
1.7.1.1.4. <i>t(14;20)(q32.33;q12) IGH/MAFB</i>	35
1.7.1.1.5. <i>t(6;14)(p21.1;q32.33) CCND3/IGH</i>	36
1.7.1.1.6. <i>t(6;14)(p25.3;q32.33) IRF4/IGH</i>	36
1.7.1.1.7. <i>t(8;14)(q24.21;q32.33) MYC/IGH</i>	37
1.7.1.1.8. <i>t(14;18)(q32.33;q21.33) IGH/BCL2</i>	38
1.7.1.2. Бройни хромозомни нарушения	38
1.7.1.2.1. Хипердиплоиден кариотип.....	38
1.7.1.2.2. Нехипердиплоиден кариотип.....	39
1.7.1.2.3. <i>Del(13)(q14)</i>	40
1.7.2. Вторични хромозомни аберации откриващи се при пациенти с множествен миелом ⁴¹	
1.7.2.1. <i>MYC</i> транслокации	41
1.7.2.2. <i>t(8;22)(q24.21;q11.2) MYC/IGL</i>	41

1.7.2.3.	t(1;8)(p11-p13;q24.21) MYC/.....	41
1.7.3.	Бройни хромозомни аберации	42
1.7.3.1.	1q21 gain (+1q)	43
1.7.3.2.	1q21 амплификация, amp(1q)	44
1.7.3.3.	del(1p)	45
1.7.3.4.	Делецията 17p13	45
1.8.	Маркери използвани при диагностиката на Множествения миелом	49
1.8.1.	Хромозомни нарушения	49
1.8.2.	Серумна протеинова електрофореза (SPE)	50
1.8.3.	Наличие на протеин на Vence Jones в урината	50
1.8.4.	Серумни свободни леки вериги (sFLC)	51
1.8.5.	Образна диагностика	51
1.9.	Диагностични биомаркери от ново поколение	52
1.9.1.	Екстрацелуларни матриксни протеини (ЕМП)	53
1.9.2.	Маркери на ангиогенезата	54
1.9.3.	Теломери и теломерази	54
1.9.4.	Циркулиращи плазматични клетки (ЦПК).....	55
1.9.5.	Геномни маркери	55
1.9.6.	Имунни маркери.....	55
II.	Формулиране на целта и задачите	57
2.	Цел и задачи.....	57
2.1.	Цел.....	57
2.2.	Задачи.....	57
III.	Материали и методи	58
3.	Материали и методи	58
3.1.	Материали	58
3.1.1.	Клиничен материал	58
3.1.2.	Биологичен материал	59
3.2.	Критерии за подбор на пациенти	59
3.3.	Методи	60
3.3.1.	Лабораторни методи.....	60
3.3.1.1.	Конвенционален цитогенетичен анализ:	60
3.3.1.2.	Локус-специфична FISH	65
3.3.2.	Софтуерни, онлайн-базирани бази данни и статистически методи	71
3.3.2.1.	Софтуерни програми.....	71

3.3.2.2.	Статистически методи.....	72
3.3.2.3.	Онлайн базирани бази данни.	73
IV.	Резултати.....	74
4.	Характеристика на пациентите по различни признаци.....	74
4.1.	Възрастово-полова характеристика	74
4.2.	Характеристика на пациентите според стадия, клиничните и лабораторните данни.....	77
4.3.	Конвенционални цитогенетични изследвания	79
4.3.1.	Обща характеристика на пациентите	79
4.3.1.1.	Характеристика в зависимост от хромозомния набор	79
4.3.1.2.	Характеристика в зависимост от броя на откритите аномалии в кариотипа 83	
4.4.	Молекулярно-цитогенетични изследвания.....	84
4.4.1.	Обща характеристика на пациентите	84
4.4.2.	Оценка на откритите хромозомни нарушения по отношение на общата преживяемост.....	85
V.	Обсъждане.....	88
VI.	Заключение.....	93
VII.	Изводи.....	94
VIII.	Приноси.....	96
IX.	Приложения.....	97
X.	Научни публикации и участия по темата на дисертационния труд	101
XI.	Библиография	102

Използвани в текста съкращения

Съкращения на кирилица:

ЕМП	- Екстрацелуларни матриксни протеини
КМ	- Костен мозък
КТ	- Компютърна томография
ММ	- Множествен миелом
МНК	- Мононуклеарни клетки
ПЕТ	- Позитрон-емисионна томография
ХМЛ	- Хронична миелоидна левкемия
ЦГ	- Цитогенетика
ЦПК	- Циркулиращи плазматични клетки
ЯМР	- Ядрено-магнитен резонанс

Съкращения на латиница:

ANP32E	- Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 Family Member E
BCL2	- B-cell lymphoma 2
BCR::ABL1	- Breakpoint cluster region- Tyrosine-protein kinase Fusion gene
BMP6	- Bone Morphogenetic Protein 6
BRAF	- B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
BRCA	- Breast cancer gene
CCND1	- Cyclin D1

CD56	- Cell adhesion molecule
CDKN2A	- Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CKS1B	- Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1
c-MAF	- Transcription factor Maf
CN-LOH	- Copy neutral loss of heterozygosity
CG	- Conventional cytogenetic
CRAB	- Hypercalcemia, renal failure, anemia, and bone disease
CYLD	- CYLD lysine 63 deubiquitinase
DAPI	- 4',6-diamidino-2-phenylindole
D1	- Cyclin D1
DIS3	- Exosome Endoribonuclease And 3'-5' Exoribonuclease
DSS	- Durie-Salmon Staging System
EGR1	- Early Growth Response 1
FAF1	- Fas Associated Factor 1
FAM46C	- Family with sequence similarity 46, member C
FAT3	- FAT Atypical Cadherin 3
FDG-PET	- Fluorodeoxyglucose positron emission tomography
FGFR3	- Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	- Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FOXO3	- Transcription factor forkhead box O-3
FRA16D	- Fragile Site, Aphidicolin Type, Common, Fra(16)(Q23.2)
IFNα	- Interferon alfa
IGH	- Immunoglobulin Heavy Locus
IL	- Interleukin

IL6R	- Interleukin 6 Receptor
IMWG	- International Myeloma Working Group
IRF4	- Interferon regulatory factor 4
ISCN	- International System for Human Cytogenomic Nomenclature
ISS	- International staging system
JAK2	- Janus Kinase 2
KRAS	- Kirsten rat sarcoma virus
LDH	- Lactate dehydrogenase
Maf	- Transcription factor Maf
MAPK	- Mitogen-activated protein kinase
MCL1	- Myeloid cell leukemia-1
MGUS	- Monoclonal gammopathy of unknown significance
miRNA	- MicroRNA
MMSET	- Multiple myeloma SET domain
mSMART	- Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy
MTF2	- Metal Response Element Binding Transcription Factor 2
MUC1	- Mucin 1
MYC	- Proto-oncogene
MYD88	- Myeloid differentiation factor 88
NGS	- Next-generation sequencing
NK	- Natural killer cells
NRAS	- Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NSD2	- Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2
PCR	- Polymerase Chain Reaction

PDZK1 - PDZ Domain Containing 1

PSMD4 - Proteasome 26S Subunit Ubiquitin Receptor, Non-ATPase 4

RB1 - Retinoblastoma gene

PBS - Phosphate-buffered saline

R-ISS - Revised international staging system

ROBO1 - Roundabout Guidance Receptor 1

sFLC - Serum free light chains

SMM - Smouldering myeloma

SNP Microarray - Single nucleotide polymorphism

SP140 - SP140 Nuclear Body Protein

TMED5 - Transmembrane P24 Trafficking Protein 5

TP53 - Tumor protein P53

TRAF3 - TNF Receptor Associated Factor 3

UBE2Q1 - Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 Q1

WWOX - WW Domain Containing Oxidoreductase

Въведение

Множественият миелом (ММ) е инвалидизиращо заболяване, представляващо значителен здравен проблем, не само в България, но и в целия свят. Характерно за заболяването е, че се среща по-често сред застаряващото население. Честотата е по-висока сред развиващите се страни, което вероятно се дължи на по-добрите методи на диагностика. Миеломните клетки са със сложен геномен фенотип включващ хромозомни транслокации и бройни нарушения, които са от съществено значение от прогностична гледна точка.

Почти при всички пациенти с ММ се наблюдават асимптоматичните премалигнени състояния, т.нар. миеломни прекурсорни състояния като моноклонална гамопатия с неясно значение (Monoclonal gammopathy of unknown significance, MGUS) и „тлеещ“ миелом (Smouldering myeloma, SMM). Установено е, че при повече от 3% населението над 50 годишна възраст се наблюдава MGUS¹. Средно 1% от случаите с MGUS и 10% с „тлеещ“ миелом прогресират до ММ². Рискът от прогресия зависи и от наличието или не на цитогенетични нарушения. За високо рискови в това отношение се считат делецията на късо рамо на 17 хромозома -del(17p), транслокациите t(4;14) и t(14;20), и намножаването на дълго рамо на хромозома 1 – gain(1q)^{3,4,5,6}. В крайна сметка заболяването може да придобие много по-агресивен характер развивайки се до вторична плазмоклетъчна левкемия и екстрamedуларно заболяване^{7,8}. В тези случаи малигнените клетки вече са напълно независими от костно-мозъчната среда за тяхното развитие.

Преживяемостта на пациентите с ММ варира в границите на 6 месеца до в редки случаи над 10 години⁹. Това се дължи главно на хетерогенността на миеломните клетки, на фактори от страна на пациентите, както и на постоянно развиващите се методи на лечение. Разбирането на поведението на тези клетки, на тяхната биология, са фактори с прогностично значение и са от изключителна важност за диференцирането на рискови групи, и за оптимизиране на прилаганата терапия.

Като високо рискови се определят тези от пациентите, които са с лоша прогноза, риск от ранен рецидив и малка преживяемост. Ревизираната международна стадираща система ги определя като такива, при които има налице високи нива на серумна лактат дехидрогеназа (LDH) и β_2 -микроглобулин, ниски нива на серумен албумин, и наличието на едно от три цитогенетични нарушения ($\text{del}(17\text{p})$, $\text{t}(4;14)$, $\text{t}(14;16)$)^{10,11}.

В подпомагането на диагнозата и провеждането на терапия от основно значение е и генетичния анализ, като най-често се използва конвенционалната цитогенетика (ЦГ) и флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH). Цитогенетичният анализ в късните стадии на заболяването може да идентифицира между 30-50% от хромозомните аномалии¹². От друга страна в ранните етапи на ММ, кариотипът в повечето случаи е нормален и криптични аберации остават „скрити“ поради ниската митотична активност на миеломните клетки. Поради тази причина методи като FISH и микро-арей базирани технологии (SNP Microarray) са за предпочитане, тъй като с тяхна помощ могат да се установят специфични аберации. Макар, че и при тях има недостатъци, тъй като се използват локус специфични сонди, т.е. не е възможно да се открият с едно изследване всички хромозомни нарушения. В последните години знанията ни за миеломагенезата съществено се подобриха с навлизането на секвенирането от ново поколение (Next-Generation Sequencing, NGS), което разкри изключително комплексната геномна структура на ММ.

I. Литературен обзор

1. Множествен миелом

1.1. Определение

Думата миелом произхожда от гръцките думи миело- „мозък“ и ома – „тумор“, а думата „множествен“ е добавена поради факта, че заболяването въвлича множество органи. Множественият миелом (ММ) е неопластичен процес засягащ костния мозък. Той възниква в резултат на неконтролируема неопластична пролиферация и акумулация на плазматични (миеломни) клетки продуциращи моноклонални имуноглобулини в костния мозък¹³. Тези атипични плазматични клетки могат да бъдат открити и в периферната циркулация на пациентите¹⁴. ММ засяга местата на активно кръвотворене при възрастните – това са костите на гръбнака, таза, ребрата, раменете, хълбоците и черепа. Макар и рядко може да се наблюдава засягане на крайниците. Плазматичните клетки, пролиферирайки в костния мозък, причиняват костни лезии асоциирани с дифузна остеопения, бъбречна недостатъчност, хиперкалциемия, имунна супресия и анемия. ММ е изключително хетерогенен и се характеризира с множество хромозомни транслокации, делеции, монозомии, амплификации, които допринасят освен за отговора при лечение, но и за преживяемостта¹⁵.

1.2. Исторически данни

Първият подробно документиран случай, базиран само на клиничната картина е бил описан от английския хирург Samuel Solly през 1844г¹⁶. Той описва пациентка на 39 години с „mollities ossium“ („омекване на костите“), нейните оплаквания били от умора и силни болки в гърба. Четири години след началото на симптомите настъпва exitus letalis, а на извършената аутопсия се установява заместване на спонгиозното вещество на стернума, както и на двата фемура с „червена субстанция“. Също така са описани фрактури на дясни радиус и улна, на леви тибия, и фибула, и на двата

фемура. Solly смятал, че заболяването се дължи на възпалителен процес започващ в кръвоносните съдове, в които спонгиозното вещество на костите се абсорбира и изхвърля с урината¹⁷.

Вероятно най-известният случай е този на д-р Thomas Watson от 1844 г., който предписва хинин и закаляващи процедури на 45 годишен пациент оплакващ се от умора, и силни болки в гърдите¹⁸. Болката се повлиявала добре, но след месец се появявала отново. Последвала поддържаща терапия с вендузи и терапевтична флеботомия, но това само влошило състоянието му. През 1845 след консултация с д-р William Macintyre, същия взима проба от урината на пациента и я изпраща на Henry Bence Jones, който вече си е създал репутация на химичен патолог. При анализа той открива в нея субстанция, преципитираща при добавяне на азотна киселина. Той отбелязва, че при загряване на урината този преципитат се разтваря, но при охлаждането ѝ репреципитира. Той заключава, че откритият протеин е „диоксид на албумина“¹⁹. Пациента умира две години след началото на симптомите, аутопсията е проведена от д-р Shaw в присъствието на д-р Watson, д-р Jones и д-р Macintyre. Те описват лесно чупливи ребра, които „се трошат под натиска на скапела“, а вътрешността им е запълнена с „кърваво червена желатиноподобна субстанция“. Същото е описано и за стернума. Два лумбални прешлена и едно ребро са изпратени на д-р Dalrymple, хирург и член на Микроскопското дружество²⁰. Той заключава, че болестта започва от спонгиозния им слой и преминава в периоста. Погледната под микроскоп в субстанцията се забелязвали големи окръглени клетки, два пъти по-големи от кръвните и съдържащи едно или две ядра със светло ядърце. Някой от по-големите и неравни клетки съдържали три ядра. Като причина за смъртта е отбелязана „атрофия от албуминурия“.

През 1867 д-р Herman Weber описва 40-годишен мъж с „mollities ossium“, който имал оплаквания от чести простуди и болки в гръдната кост, и в лумбалните плешлени, а при движение на главата се появявала болка във врата и раменете. След проведена аутопсия се установява, че стернума е почти напълно заместен от червено-сива субстанция с микроскопското описание на сарком²¹.

Термина „множествен миелом“ се използва за пръв път през 1873 г. от руския патолог von Rustizky, работещ по това време в лабораторията на Friedrich von

Recklinghausen в Страсбург. По време на аутопсия на 47 годишен мъж, той описва осем отделни тумора, червеникави на цвят с мека консистенция, които той нарича „множествени миеломи“. Микроскопското описание разкрива окръглени клетки с едно ядро, разположено по периферията на клетъчната мембрана²².

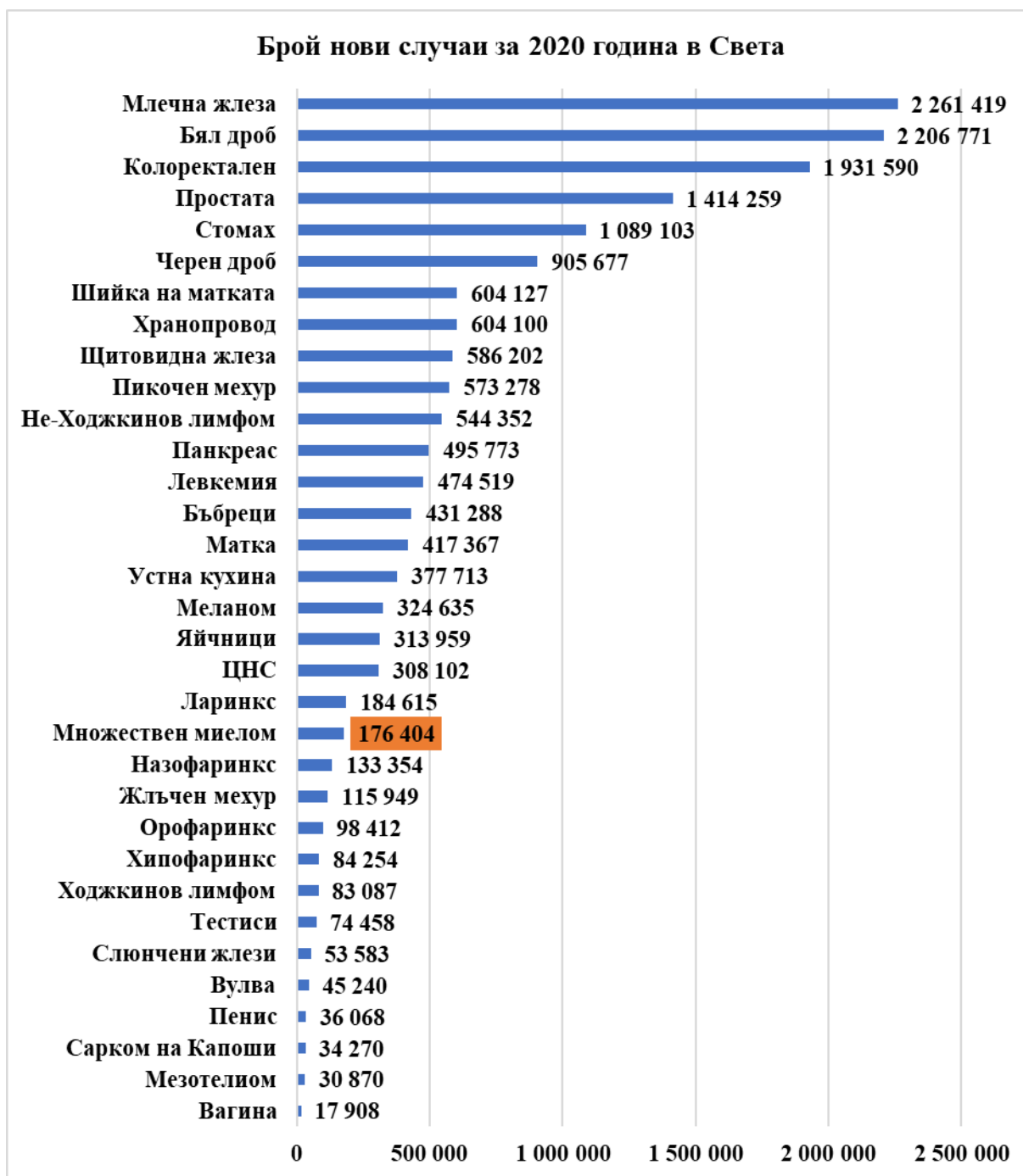
Първият, който споменава термина „плазматична клетка“ през 1875 г. е Heinrich Waldeyer, на него дължим и наименованието „хромозома“²³. Той описва големи клетки с грануларна цитоплазма, но не споменава нищо за ядра. Счита се, че е дал описание на мастни клетки. Терминът протеин на Вence Jones за пръв път се използва през 1880 г. от Fleisher²⁴.

Първото точно описание на плазматични клетки дава невроанатома Сајал през 1896 г. докато изучавал сифилистични кондилломи²⁵. Поставянето на диагнозата ММ се улеснява значително след представената от руския лекар Arinkin проста, но ефективна техника на аспирация на костен мозък (КМ) чрез игла през 1927 г.²⁶.

1.3. Епидемиология

Множествения миелом представлява 1% от всички неоплазии и приблизително 10% от хематологичните. Честотата му в Европа варира между 4,5-6,0:100 000 със средна възраст при поставяне на диагнозата от 69 години; смъртността е 4,1:100 000 на година^{27,28}.

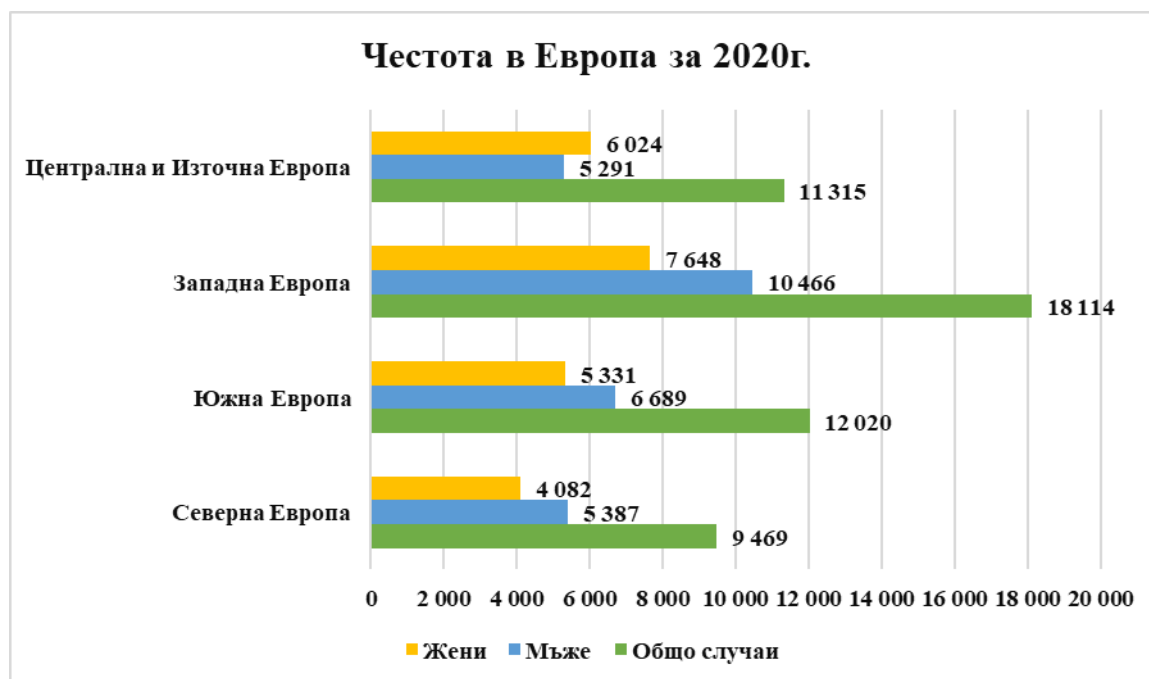
Според Международната агенция за ракови изследвания (International Agency for Research on Cancer) през 2020 година в световен мащаб регистрираните нови случаи на пациенти с ММ са 176 404²⁹. Като това го нарежда на 21^{-во} място в Света (*Фигура 1*)



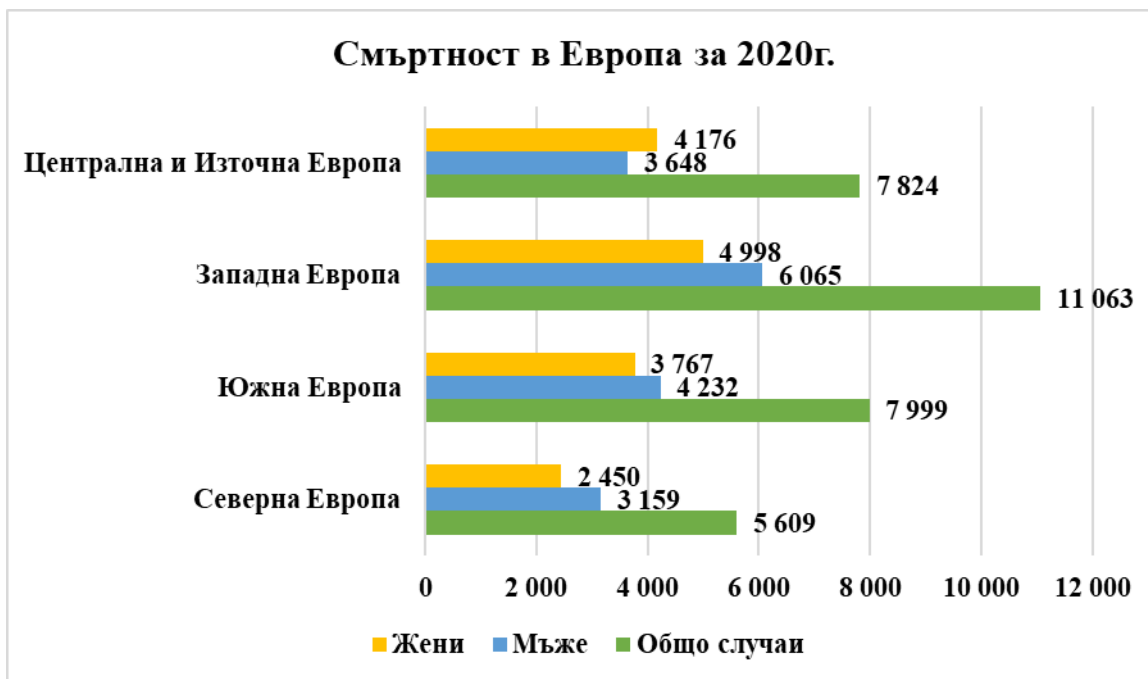
Фигура 1: Брой нови случаи за 2020 година в Световен мащаб според Международната агенция за ракови изследвания (адаптиран по²⁹).

Честотата в Европа е както следва, най-висока в Западна Европа, а най-ниска в Северна. На второ място се нарежда Южна Европа следвана от Централна и

Източна (Фигура 2). Същото е разпределението и при смъртните случаи (Фигура 3). По отношение на половото разпределение, с по-висока честота се среща при мъжете с изключение на Централна и Източна Европа, където преобладаващия пол е женския. Същата е картината и при смъртните случаи.



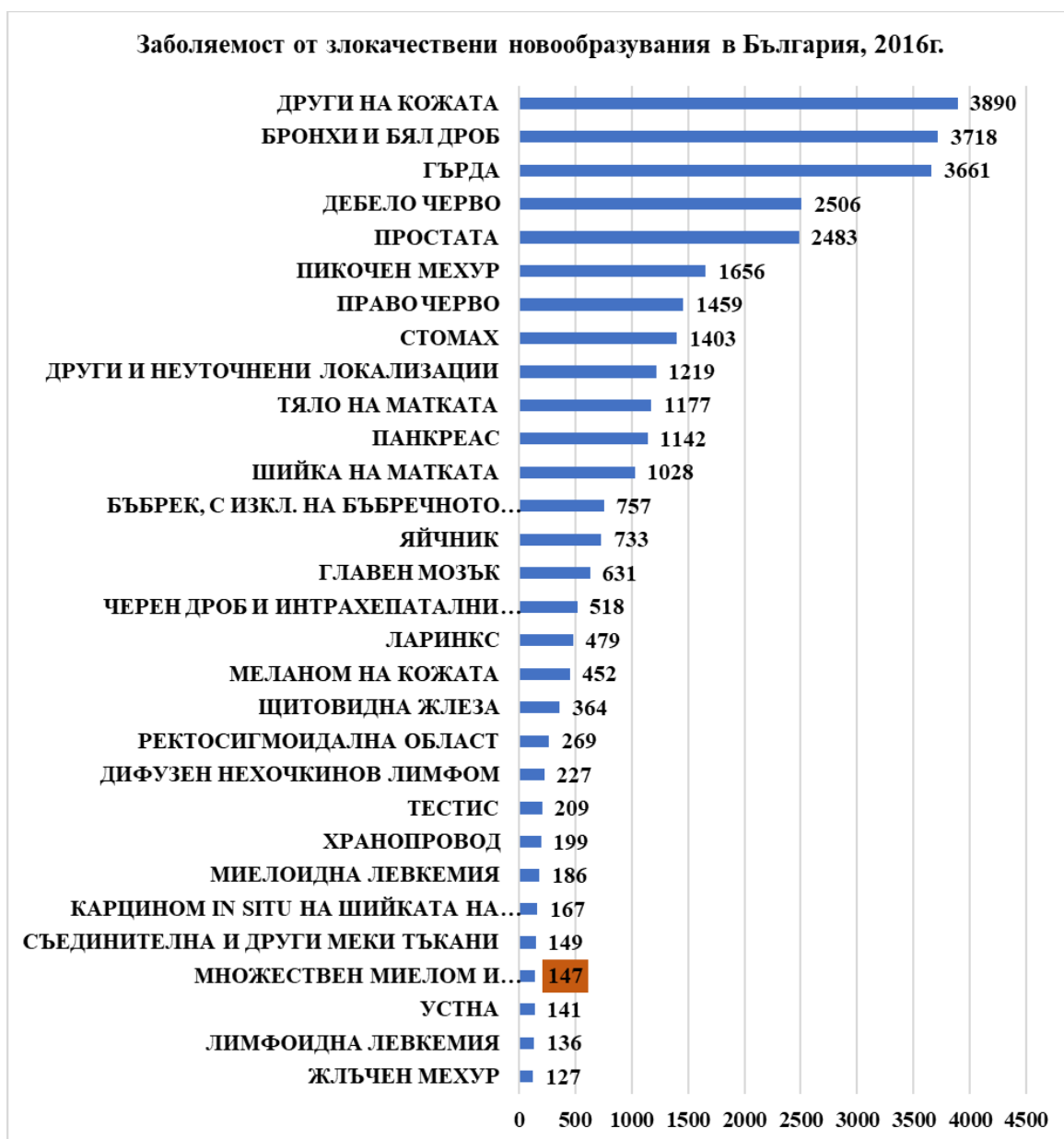
Фигура 2: Брой случаи на пациенти с ММ в Европа за 2020 според Международната агенция за ракови изследвания.



Фигура 3: Брой смъртни случаи от ММ в Европа за 2020 година според Международната агенция за ракови изследвания.

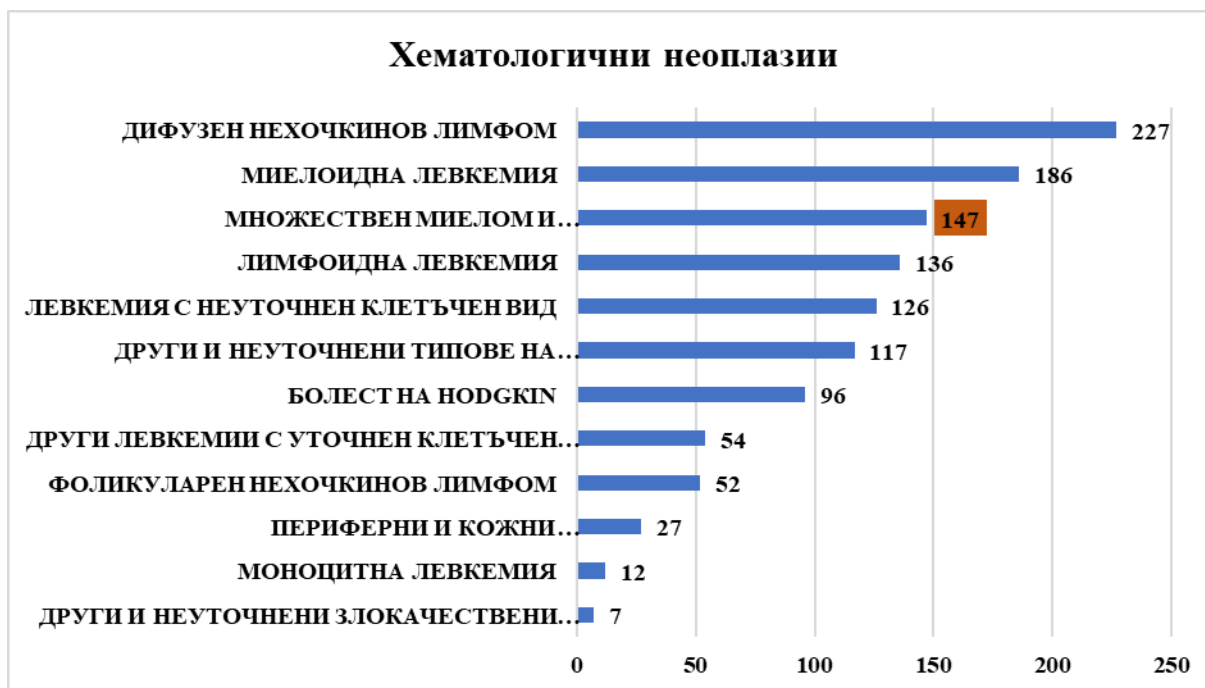
Като цяло честотата в Света варира, като се наблюдава тенденция да се среща по-често в САЩ, Западна Европа и Австралия. Това разпределение вероятно се дължи на по-качественото медицинско обслужване, както и на ранната диагностика. При проучвания е установено, че честотата е до три пъти по-висока сред афро-американци, а най-ниска при испаноговорящи и азиатци^{30,31}.

Последните данни на Българския национален раков регистър са за 2016 г., като тогава са регистрирани 147 случая с ММ или 0,5%, което го поставя на 27-мо място сред злокачествените новообразувания в България (Фигура 4)³².



Фигура 4: Заболеваемост от злокачествени новообразувания в България за 2016г. според Българския национален раков регистър (адаптиран по³²).

Ако се разгледат само хематологичните неоплазии се вижда, че ММ се нарежда на трето място след дифузния неходжкинов лимфом и миелоидната левкемия, което прави 12,4% от всички (Фигура 5).



Фигура 5: Заболяемост от хематологични неоплазии в България за 2016г. според Българския национален раков регистър (адаптиран по³²).

1.4. Фамилна предиспозиция

Първите данни за евентуална генетична предиспозиция към ММ датират още от началото на 20^{-те} години на миналия век. През 1925 година Henry Meyerding, описва общо 13 случая на пациенти с ММ, а при един от тях, мъж на 57 г. е отбелязано, че е имал леля с „костна болест“ и фрактура на крак³³. Три години по-късно е публикувана статия, в която е споменато за двама братя с ММ³⁴. Първите подробно описани и доказани случаи с ММ са при две сестри от 1954 г.³⁵ През 1965 Leslie Alexander и David Benninghoff описват случай на цветнокожа жена с фамилни данни – двама от братята ѝ също са диагностицирани с ММ³⁶. В следващите години има над 10 съобщения за фамилни случаи, повечето от които са при братя и сестри, двама братя или две сестри³⁷.

През 2007 година е описан първия фамилен случай от Турция. Става въпрос за мъж на 50 години с ММ, като фамилната анамнеза показва още двама родственици с ММ – чичо и племенница³⁸.

През 2008 година Henry Lynch и колектив са провели голямо проучване сред родственици на пациент с ММ, изследвани са общо 20 от тях, като в пет се установява ММ, трима с MGUS и 5 случая с простатен карцином. Всичко това се установява в две поколения и с вероятно автозомно доминантен ход на унаследяване. Друг интересен факт е, че във фамилията се наблюдава явлението антиципация – по-ранна изява с по-тежка клиника в следващото поколение³⁹.

През същата година е публикувано друго голямо проучване сред осем фамилии афро-американци, общо 66 са били изследваните. При 20 родственици от първа степен се установява моноклонална гамопатия, а 12 са с ММ. Поради малкия брой на изследваните родственици не може да се определи точен тип на унаследяване, но отново е наблюдаван феномена антиципация⁴⁰.

В няколко съобщения в литературата има данни за увеличен риск от развитие на ММ при пациенти с различни фамилни форми на рак. При проучване направено сред евреи Ескенази с вече доказани мутации на някои от гените *BRCA1* и *BRCA2* се установява, че някои от носителите имат първа степен родственици с ММ⁴¹. През 2002 е описана фамилия с няколко члена с ММ, като по-късно две жени са развили и карцином на гърдата с доказана мутация в *BRCA2* гена⁴². През 2000 година е описан случай при пациент с фамилна форма на меланом с доказана мутация в гена *CDKN2A*, при който по-късно се поставя и диагнозата ММ. Тази мутация се среща при 20-40% от фамилните форми на меланом^{43,44}.

При мащабно проучване направено от Ola Landgren и колектив в онкологичните регистри в Швеция през 2008 г. сред 11 752 пациенти с ММ, както и 27 784 техни родственици първа степен е установен 2,45 пъти по-голям риск за развитие на заболяването⁷. По-късно при използване на същите регистри, но вече сред 13 896 пациенти с ММ както и 37 838 техни родственици първа степен е изчислен 2,1 пъти повишен риск⁴⁵.

Различни данни сочат, че сред фамилии с ММ се наблюдават и определени солидни тумори, като най-често това са простатен и колоректален карцином, меланом, и карцином на пикочния мехур^{45,46,47,48,49,50}. Други епидемиологични проучвания показват висок риск от развитие на лимфоидни неоплазии при

родственици от първа степен, като хронична лимфоцитна и остра лимфобластна левкемия, неходжкинов лимфом и макроглобулинемия на Waldenström^{7,51,52}.

При друго проучване на регистрите в Швеция направено сред 153 115 пациенти с различни хематологични неоплазии, някои от пациентите с ММ вторично са развили лимфоплазмоцитен лимфом, полицитемия вера или миелопролиферативни неоплазии⁵³.

1.5. Етиология

Развитието на ММ е многостъпален процес, като най-ранния етап се нарича моноклонална гамопатия с неясно значение (monoclonal gammopathy of unknown significance, MGUS), следвана от асимптоматичен или „глеец“ миелом (smouldering multiple myeloma, SMM) до симптоматичен ММ и накрая до плазмоклетъчна левкемия⁵⁴. Предшественика на ММ, MGUS е възраст зависимо състояние, което се открива при повече от 5% от пациентите над 70 годишна възраст⁵⁵. По принцип това състояние е асимптоматично като се открива малка популация от плазматични клетки продуцираща моноклонал протеин, но те не водят до тежки увреди. Необходими са допълнителни генетични промени, които да доведат до прогресия. При проучване направено сред 1384 пациенти за периода 1960 – 1994 с поставена диагноза MGUS с цел проследяване се е установил риск от прогресия от 1% годишно⁵⁶.

„Глеещият“ миелом се разграничава от MGUS по количеството плазматични клетки в КМ (>10%). Въпреки, че MGUS, SMM и ММ са дефинирани много добре клинично, открити са много прилики и на биологично ниво⁵⁷.

1.6. Клинични и лабораторни характеристики

На *Таблица 1* са представени критериите за поставяне на диагноза ММ⁵⁸. Според нея за поставянето на диагнозата са необходими освен наличието на повече от 10% плазмоцити в КМ и някой от следните критерии известни с аббревиатурата CRAB. Те са хиперкалциемия, бъбречна недостатъчност, анемия или литични костни лезии, както и три специфични биомаркери: клонални плазмоцити в костния мозък в количество над 60%, серумни свободни леки вериги над 100 mg/L и наличието на повече от една огнищна лезия открита с ЯМР. Всеки от тези биомаркери се свързва с приблизително 80% риск от прогресия.

Таблица 1: Диагностични критерии

Наличие на >10% плазматични клетки в костен мозък или екстрамедуларен плазмоцитом
плюс някои от следните данни свидетелстващи органна увреда:
<ul style="list-style-type: none">• хиперкалциемия: серумен калций по-висок от 2.75 mmol/L (> 11 mg/dL)• Бъбречна недостатъчност: креатининов клирънс <40ml/min или серумен креатинин по-висок от 177 μmol/L (> 2mg/dL)• Анемия: Hb < 10 g/dL• Костни лезии: една или повече остеолитични лезии открити с образно изследване• наличие на клонални костномозъчни плазматични клетки над 60%• FLC над 100mg/L• повече от една фокална лезия доказана с ЯМР

„CRAB“ критериите, са предложени и включени през 2003 година от международната група по миелом с цел улеснение при поставянето на

диагнозата⁵⁸. Те могат да се използват за отграничаване на активен и симптоматичен ММ, както и прекурсорните състояния като MGUS и „тлеещ“ миелом. Това е от особено значение не само за класификацията на ММ, но и за терапевтичните режими и прогнозата⁵⁹. На таблица 2 са представени най-често срещаните симптоми при пациенти с ММ подредени по честота^{59,60}.

Таблица 2: Най-често срещани симптоми при пациенти с ММ.

Симптоми	Честота в %
Анемия	73
Осалгия	58
Повишена обща уморяемост	32
Загуба на тегло	24

Атипичните плазматични клетки продуцират функционално негодни моноклонални имуноглобулини. Инфилтрацията им в костния мозък причинява анемия, тежестта на която зависи от степента ѝ. Освен това, това води и до разрушаване на костта, което причинява типичната костна болка (осалгия) и повишено освобождаване на калций в кръвта. Клинично това се отразява като дехидратация, констипация, повишена обща уморяемост. Костното засягане се проявява като болка, усещане за подутина, патологична фрактура. Често се наблюдава и засягане на бъбреците от натрупването на моноклонални парапротеини в бъбречните каналчета^{59,61}.

Нарушените функции на нормалните имуноглобулини води до чести и протрахиранни инфекции. Няколко са факторите, които водят до повишен риск от инфекции, включително дисфункция на вродения и придобит имунитет, външни като някои терапевтични агенти, възраст, придружаващи заболявания и други. При някои пациенти е описана дисфункция на В- и Т-лимфоцитите, НК- и дендритните клетки⁶².

Приблизително при 10% от пациентите се наблюдава синдром на хипервискозитет, който е типичен за макроглобулинемията на Waldenström. Това се дължи на голямата молекула IgM, която е с по-голям вискозитет от другите имуноглобулини. Синдрома на хипервискозитет протича с абнормно кървене,

замъглено зрение, главоболие, световъртеж, обърканост, нистагъм и атаксия⁶³.

Съществуват различни типове ММ в зависимост от типа имуноглобулин произвеждан от плазматичните клетки. Всеки имуноглобулин е изграден от две тежки и две леки вериги. Тежките вериги биват пет типа (подредени по честота): G, A, D, E, M, а леките два: капа (κ) и ламбда (λ). Те се установяват с имуноелектрофореза или имунофиксация на серум или урина. Около 52% от случаите миеломите са IgG (κ или λ), следващият по честота е IgA, а IgD, IgE и IgM са редки. Приблизително 16% от пациентите произвеждат само леки вериги, тогава ММ се нарича тип „Bens-Jones” (Таблица 3). При малка част пациентите се произвежда много малко или никакво количество моноклонален протеин, това е т.нар. “несекретиращ миелом”^{60,64}.

Таблица 3: Лабораторни находки при пациенти с ММ

Лабораторни данни	Честота в %
Моноклонални имуноглобулини откривани в серум или урина	
IgG	97
IgA	52
Леки вериги	21
IgD	16
Биклонален	2
IgM	0,5
„Несекретиращ“	6,5
Серумни моноклонални имуноглобулини установени със стандартна електрофореза	82
Плазматични клетки в костен мозък >10%	90
Повишени нива на креатинин	48
Хиперкалциемия	28

1.6.1. Клонални плазматични клетки в костния мозък

Както вече беше отбелязано при ММ, плазматични клетки пролиферират и акумулират в КМ, което налага и установяването на тяхното съотношение там. Ключов компонент в диагностицирането на ММ е установяването на плазмоцитоза в КМ чрез аспирационна биопсия. Това е един от скриниращите тестове, който се използва най-често, въпреки че процедурата е инвазивна. Костният мозък може да бъде дифузно въвличен, но най-често се наблюдава огнищно разположение на плазматичните клетки. Процентното им съотношение варира от 10% до визуално пълно заместване на КМ⁶⁵. В някои случаи може да се наблюдава нормално съотношение на клетки, което се дължи на неравномерното им разположение. Диагнозата ММ може да бъде поставена и при наличие на <10% плазматични клетки в случаите на категорични симптоматични данни или на хистопатологичен резултат от биопсия на туморна формация.

1.6.2. Стадиращи системи

За новодиагностицираните пациенти с ММ правилното стадиране е от изключително значение за избора на лечение, както и за прогнозата. За тази цел преди повече от 40 години са предложени няколко стадиращи системи:

- Стадираща система по Durie-Salmon (Durie-Salmon Staging System, DSS)
- Стадираща система по Durie-Salmon ПЛЮС (Durie-Salmon PLUS Staging System, DSS)
- Международна стадираща система (International Staging System, ISS)
- Критерии на Mayo (Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy, mSMART)

1.6.2.1. Стадираща система по Дюри-Салмон (Durie-Salmon Staging System, DSS) и Дюри-Салмон ПЛЮС (Durie-Salmon PLUS Staging system)

Стадиращата система на Дюри-Салмон е предложена през 1975 година⁶⁶. Тя подразделя ММ на три стадия в зависимост от наличието на клинични и лабораторни данни, но като недостатък се счита определянето на костни лезии с конвенционална рентгенография. При неопластични състояния като ММ, костните лезии са видими едва след 30-50% загуба на костна плътност⁶⁷. Това е довело до появата на висок процент фалшиво-отрицателни резултати и поради тази причина е възникнала необходимостта от въвеждането на нова система.

През 2006 е представена стадиращата система Дюри-Салмон ПЛЮС, в която са включени две нови образни изследвания позитрон емисионна томография (PET/CT) и ядрено-магнитен резонанс (MRI). Тя подразделя пациентите на три групи, всяка, от които с по две субгрупи. Това разделяне става въз основа на броя огнищни лезии или от тежестта на костната инфилтрация⁶⁸. На Таблица 4 е представена сравнителна характеристика между двете стадиращи системи.

Таблица 4: Сравнение между Дюри-Салмон и Дюри-Салмон ПЛЮС стадиращите системи

Дюри-Салмон стадираща система	
I стадии	Наличие на някой от следните: Hb > 10 g/dL Серумен Ca < 10,5 mg/dL Нормална костна структура или солитарен плазмоцитом установени с рентгенография Ниски нива на имуноглобулини
II стадии	Пациенти, които не са нито в първи, нито в трети стадии
III стадии	Едно или повече от следните: Hb < 8,5 mg/dL Серумен Ca > 12,5 mg/dL Напреднали литични костни лезии установени с рентгенография Увеличени нива на имуноглобулини
Дюри-Салмон ПЛЮС стадираща система	
Находки установени с ЯМР и/или FDG PET/CT	
MGUS	Не се установяват находки
Стадии IA, тлеещ или <u>индолентен</u>	Наличие на единичен плазмоцитом или минимални данни за заболяване
Стадии IB	< 5 огнищни лезии
Стадии IIA или IIB	5-20 огнищни лезии
Стадии IIIA или IIIB	> 20 огнищни лезии

1.6.2.2. Международна стадираща система (International Staging System)

През 2006 година е представена нова, по-опростена и добила широка популярност Международна стадираща система (International Staging System, ISS)⁶⁹. Тя разделя пациентите на три групи въз основа на два параметъра: серумен β_2 -микроглобулин и серумен албумин. Но и това се оказва недостатък, при пациенти с MGUS и SMM, при които е налице бъбречна увреда в резултат на диабет например, в такъв случай нивата на тези показатели също са високи⁷⁰. Така те биват неправилно стадирани. През 2015 година тази система е

ревизирана (Revised International Staging System, R-ISS) с добавянето на анализ на LDH и наличието на хромозомни нарушения (Таблица 5)¹¹.

Таблица 5: Ревизирана международна стадираща система (R-ISS)

Ревизирана международна стадираща система (R-ISS)	
Стадии	Параметри
I	$\beta 2M < 3,5 \text{ mg/l}$ Albumin $\geq 3,5 \text{ g/dl}$ LDH-нормално ниво Стандартни цитогенетични маркери, установени с FISH анализ
II	Пациенти, които не са нито в първи, нито в трети стадии
III	$\beta 2M \geq 5,5 \text{ mg/l}$ или високи нива на LDH, или високорискови цитогенетични маркери установени с FISH (като del(17p), t(4;14), t(14;16)).

1.6.2.3. Критерии на Mayo (Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy, mSMART)

Според критериите на Mayo предложени през 2007 г., пациентите се разделят на ниско рискови и високо рискови спрямо цитогенетичната находка (Таблица 6)⁷¹.

Таблица 6: Критерии на Mayo

Риск	Нарушения
Стандартен риск	Тризомии <ul style="list-style-type: none"> t(6;14) t(11;14)
Висок риск	Високо рискови хромозомни аберации <ul style="list-style-type: none"> t(4;14) t(14;16) t(14;20) del(17p) p53 мутация gain 1q Стадии 3 по R-ISS Високо ниво на плазматични клетки

1.7. Хромозомни нарушения

Подобно на други хематологични неоплазии, множествения миелом се характеризира с комплексни и разнообразни хромозомни нарушения. Процентът на откриваемост на абнормни метафази при конвенционалната цитогенетика е нисък, в рамките на 20-30%, което се дължи на ниската пролиферативна активност на плазматичните клетки⁵⁷. Кариограмата обикновено е нормална, но наличието на абнормни метафази се счита за лош прогностичен белег⁷².

Цитогенетичните аномалии са комплексни, често с наличие на бройни и структурни аберации, каквито се откриват и при солидните тумори. Те са типични, често срещани, комплексни и при плазмоклетъчна левкемия. Спектърът от

генетични аномалии, лежащи в основата на ММ, стават известни благодарение на навлизането в рутинната клинична практика на флуоресцентната *in situ* хибридизация (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) върху материал от костен мозък⁷³.

Въз основа на цитогенетичната находка пациентите с множествен миелом се разделят на две субгрупи:

- ❖ Хипердиплоидни с повече от 47 до 65 хромозоми, често с наличие на тризомии на нечетни хромозоми: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 и 21.
- ❖ Нехипердиплоидни, които включват пациенти с:
 - хиподиплоиден кариотип (кариотип с 45 или по-малко хромозоми), често със загуба на хромозоми 13, 14, 16, 22 и половите хромозоми.
 - хиперхиплоиден кариотип (кариотип с 24-34 хромозоми)
 - псевдодиплоиден кариотип (44/45 или 46/47 хромозоми)
 - тетраплоиден кариотип (четири пълни хромозомни набора или 92 двойки хромозоми).

Най-общо казано генетичните аномалии, които се откриват могат да се разделят на две категории въз основа на пloidност и други параметри (Таблица 7). Първичните хромозомни аберации в развитието на MGUS, SMM и ММ включват хромозомни транслокации засягащи тежките вериги на имуноглобулините (*IGH*) и анеуплоидии (като хипердиплоидията е с най-висока честота). Вторичните включват *MYC* транслокации, монозомии и делеции. Честотата на вторичните хромозомни аберации има тенденция да се увеличава при прехода от моноклонална гамопатия с неясно значение до „тлеещ“ или множествен миелом^{74,75}.

Таблица 7: Първични и вторични хромозомни нарушения откривани при пациенти с ММ

Хромозомни нарушения	Честота в %	Прогностичен фактор
Първични хромозомни нарушения		
<i>IGH</i> Транслокации	50 -70%	
t(11;14)(q13.3;q32.33) <i>CCND1/IGH</i>	15–20%	Добра прогноза
t(4;14)(p16.3;q32.33) <i>MMSET/FGFR3/IGH</i>	15-20%	Лоша прогноза
t(14;16)(q32.33;q23.2) <i>IGH/MAF</i>	6 -7%	Лоша прогноза
t(14;20)(q32.33;q12) <i>IGH/MAFB</i>	2%	Лоша прогноза
t(6;14)(p21.1;q32.33) <i>CCND3/IGH</i>	4%	Стандартен риск
t(6;14)(p25.3;q32.33) <i>IRF4/IGH</i>	Недостатъчно данни	
t(8;14)(q24.21;q32.33) <i>MYC/IGH</i>	Недостатъчно данни	
t(14;18)(q32.33;q21.33) <i>IGH/BCL2</i>	Недостатъчно данни	
Бройни хромозомни аберации		
Нечетни хромозоми: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 и 21		
Хипердиплоидии	70 %	Добра прогноза
Нехипердиплоидии		Лоша прогноза
Тризомии	50%	Лоша прогноза
Делеция 13q14	50%	Лоша прогноза
Вторични хромозомни нарушения		
<i>MYC</i> транслокации	15-20%	Лоша прогноза
t(8;22)(q24.21;q11) <i>MYC/IGL</i>		
t(1;8)(p11-p13;q24.21) <i>MYC/</i>		
Бройни		
Монозомии: 13, 14, 16, 17, 22		
1q21 gain	20-50%	Лоша прогноза
1q21 амплификация	40%	
1p делеция	20-25%	
13p делеция	10 %	
17p13 делеция	5-10%	

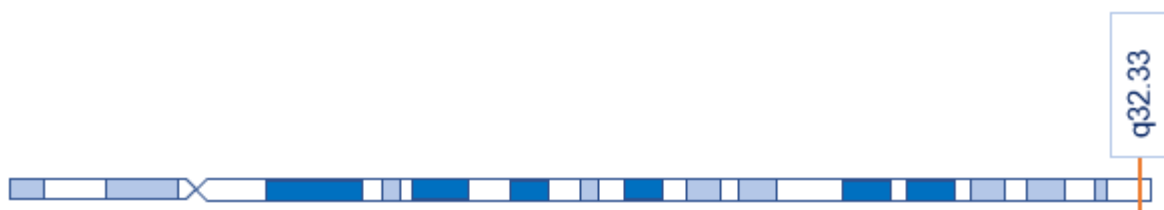
1.7.1. Първични хромозомни аберации откриващи се при пациенти с множествен миелом

В широк смисъл, повечето първични хромозомни аберации при пациенти с множествен миелом са или транслокации, или тризомии ⁷⁶. Те често се асоциират с хиподиплоиден кариотип и включват превключване на класа (class switch) на тежките вериги на имуноглобулините в локус 14q32.

Транслокациите възникват рано и вероятно са инициращ фактор в патогенезата на ММ. Тези от тях, които въвличат гени кодиращи тежките вериги на имуноглобулините и други гени, като *NSD2*, *FGFR3* (кодиращ рецептор 3 на фибробластния растежен фактор) и *CCND1* (кодиращ циклин D1) представляват важен клас от първични събития идентифицирани в MGUS, SMM и ММ. Нещо повече, фузията на IGH енхансер с други гени, води до свръхекспресия на сдвоения ген ^{77,78}.

1.7.1.1. IGH транслокации

IGH (*Immunoglobulin Heavy Locus*) (локус 14q32.33) (Фигура 6) транслокациите открити при хиподиплоиден множествен миелом включват наличието на т.нар партньорна хромозома (Таблица 8).



Фигура 6: Хромозомен локус 14q32.33

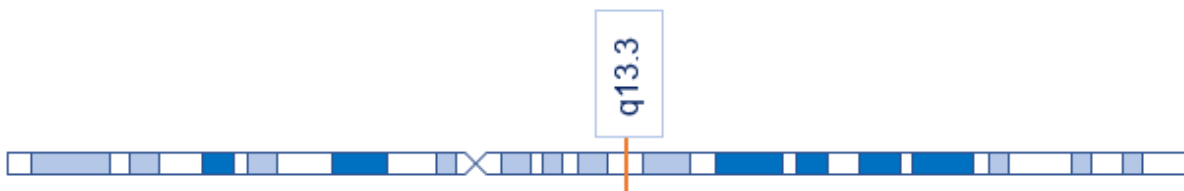
Таблица 8. Партньорни хромозоми при IGH транслокации откривани при пациенти с MM подредени по честота

Хромозомен локус	Ген
11q13.3	CCND1
4p16.3	FGFR и MMSET
16q23.2	MAF
20q12	MAFB
6p21.1	CCND3
6p25.3	GMDS
8q24.21	MYC

Те се наблюдават при 50-70% от случаите с MM и повече от 90% от тях включват хромозома 14, в която се намира *IGH* локуса в 14q32.33^{78,79}. *IGH* транслокациите водят до дерегулация на експресията на партньорен ген под контрола на *IGH* енхансер²⁷. Петте най-често срещани партньорни хромозоми при MM са хромозоми 4, 6, 11, 14 и 20, много рядко, при по-малко от 5% от случаите може да се наблюдават и хромозоми 8 и 12⁸⁰.

1.7.1.1.1. t(11;14)(q13.3;q32.33) CCND1/IGH

Най-често срещаната транслокация при MM t(11;14)(q13.3;q32.33) откриваща се при 15-20% от пациентите е видима, както с конвенционална цитогенетика така и с FISH анализ, и е свързана с добра прогноза (*Фигура 7*)^{81,82}. В повечето случаи е балансирана, т.е. не се наблюдава загуба или излишък на генетичен материал, а в 25% от случаите се наблюдава в комбинация с тризомия 13 или в комплексен кариотип⁸³. Тя води до повишена експресия на *CCND1*, чийто продукт, циклин D1 е важен за прогресията на клетъчния цикъл от G1 до S фазата, и нормално не се експресира в плазматичните клетки⁵⁷.



Фигура 7: Хромозома 11, локус q13.3

1.7.1.1.2. t(4;14)(p16.3;q32.33) MMSET/FGFR3/IGH

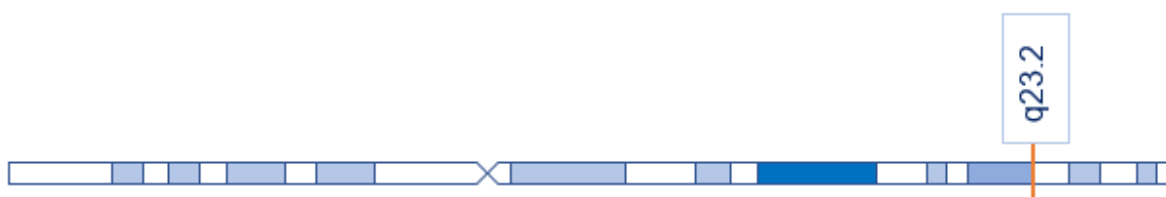
Втората по честота реципрочната транслокация t(4;14)(p16.3;q32.3) се среща при 15-20% от пациентите и се счита за лош прогностичен белег⁸⁴. Тя е неустановима с конвенционална цитогенетика заради теломерното разположение на счупванията на хромозомите. Включва два протеин-кодиращи гена в района 4p16.3 - единия е *MMSET* (multiple myeloma SET domain), а вторият *FGFR3* (Fibroblast growth factor receptor 3), който е онкогенен тирозин киназен рецептор (Фигура 8). Транслокацията е небалансирана в 23% от случаите, тъй като има загуба на дериватната 14 хромозома, което се асоциира и със загуба на експресия на *FGFR3*⁸⁵. Тя от своя страна рефлектира на един от многото възможни пътища на клонална еволюция по време на прогресията на заболяването. В повечето случаи тази транслокация може да се наблюдава в комбинация с монозомия или делеция по 13 хромозома. Наблюдава се и при MGUS, но се среща много по-често при пациенти с „тлеещ“ или с множествен миелом.



Фигура 8: Хромозома 4, локус p16.3

1.7.1.1.3. **t(14;16)(q32.33;q23.2) IGH/MAF**

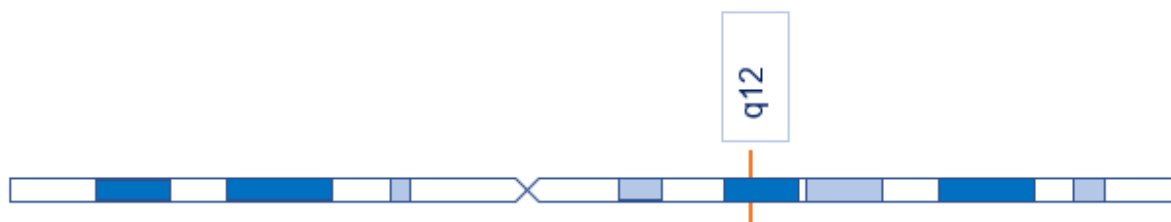
Най-рядко срещаните, но клинично важни транслокации въвличат *MAF* гените. Транслокацията $t(14;16)(q32.3;q23)$ откриваща се при 6-7% от пациентите, съпоставя *IGH* (14q32) локуса и *c-MAF* (16q23.2) (Фигура 9) локуса се счита за лош прогностичен белег⁸⁶. Тя води до свръхекспресия на *c-MAF* прото-онкогена, който е член на голяма фамилия транскрипционни фактори участващи в много клетъчни процеси, особено тези въвличащи IL-6-цитокина с централна роля в патогенезата на миелома. Освен това *c-MAF* играе роля и като Т-клетъчен транскрипционен фактор. Точките на чупливост на 16p23 се намират в интроните на голям ген *WWOX*, който покрива чупливия участък *FRA16D* в хромозома 16q23.2⁸⁷. Проучване на пациенти с $t(14;16)$ сочи, че тази транслокация е свързана с липса на експресия на CD56 и висока пролиферативна активност, което води до лош терапевтичен отговор⁸⁸.



Фигура 9: Хромозома 16, локус q23.2

1.7.1.1.4. **t(14;20)(q32.33;q12) IGH/MAFB**

Най-рядка и с лоша прогноза е транслокацията $t(14;20)(q32.33;q12)$, която се среща при около 2% от пациентите⁸⁹. За разлика от другите транслокации, тази може да се установи с конвенционален цитогенетичен анализ. Тя води до свръхрегулация на *MAFB* онкогена разположен в локус 14q12 (Фигура 10). Генът *MAFB* част от фамилията *Maf* се състои от един екзон, и кодира протеин, чието действие е или като транскрипционен активатор, или като репресор. Той играе много важна роля в регулацията и развитието на хемопоезата, а транслокацията води до повишената му експресия⁹⁰.



Фигура 10: Хромозома 20, локус q12

1.7.1.1.5. **t(6;14)(p21.1;q32.33) CCND3/IGH**

Транслокацията t(6;14)(p21.1;q32.33) се среща се при около 4% от пациентите с ММ⁷⁶. Освен при ММ и плазмоклетъчна левкемия, се наблюдава и при дифузен В-клетъчен неходжкинов лимфом и при спленален лимфом с вилонни лимфоцити⁹¹. Тя включва гена *CCND3* разположен в късото рамо на шеста хромозома 6p21.1 (Фигура 11) и съответно води до дерегулацията му. Тя често се среща в комбинация с комплексен кариотип, като дериватната 14 хромозома в повечето случаи е намножена^{91,92}.



Фигура 11: Хромозома 6, локус q21.1

1.7.1.1.6. **t(6;14)(p25.3;q32.33) IRF4/IGH**

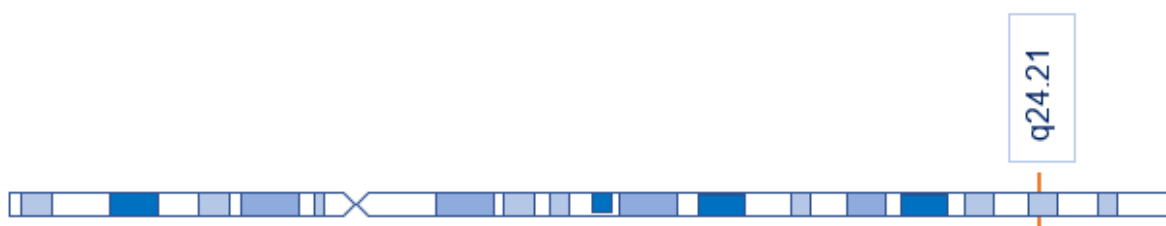
Транслокацията t(6;14)(p25.3;q32.33) включва транскрипционно активирания ген *IRF4* (interferon regulatory factor 4) разположен в локус 6p25.3 (Фигура 12). Значението ѝ все още е неясно, и е неоткриваема с конвенционален цитогенетичен анализ⁹³. *IRF* гена кодира протеин важен за лимфоцитната активация и В-клетъчната диференциация, и е важен за патогенезата на ММ⁹⁴.



Фигура 12: Хромозома 6, локус p25.3

1.7.1.1.7. $t(8;14)(q24.21;q32.33)$ *MYC/IGH*

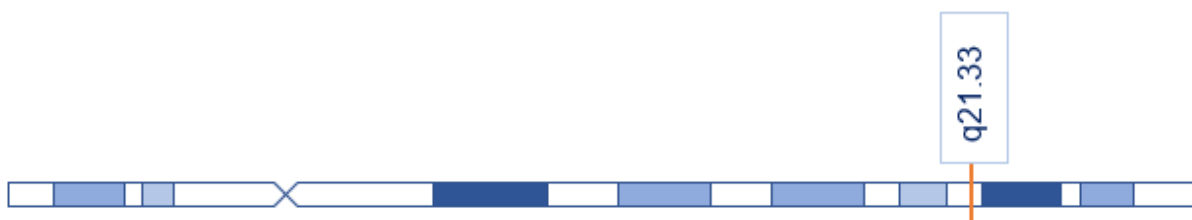
Една от най-редките е транслокацията $t(8;14)(q24.21;q32.33)$ съпоставяща *MYC* гена в локус 8q24.21 (Фигура 13) с *IGH* енхансери, което води до инактивация, повишена транскрипционна активност и онкогенна трансформация. В 60-70% от случаите се среща в комбинация с други структурни аберации като 1q и 13q, тризомии 7 и 12, делеции 6q, 13q и 17p⁹⁵.



Фигура 13: Хромозома 8, локус q24.21

1.7.1.1.8. $t(14;18)(q32.33;q21.33)$ *IGH/BCL2*

Транслокацията $t(14;18)(q32.33;q21.33)$ се среща основно при фоликуларен лимфом и изключително рядко при ММ. Тя включва гена *BCL2* разположен в локус 18q21.33 (Фигура 14), чиято свръхекспресия се наблюдава при повечето от пациентите⁹⁶. *BCL2* е голяма фамилия от регулаторни протеини, които регулират апоптозата, установено е, че засягането му води до резистентност към химиотерапия⁹⁷.



Фигура 14: Хромозома 18, локус q21.33

1.7.1.2. Бройни хромозомни нарушения

1.7.1.2.1. Хипердиплоиден кариотип

Кариотипа при пациенти с ММ най-често е хипердиплоиден (приблизително 70% от случаите). Хипердиплоидията е най-честата форма на анеуплоидия при множествения миелом, като в кариотипа се наблюдават между 47 и 65 хромозоми⁹⁸. При 50-60% от пациентите хипердиплоидията се характеризира с поява на тризомии на някои от следните нечетни хромозоми, подредени по честота: 15, 9, 5, 19, 3, 11, 7 и 21⁸⁸. Хипердиплоиден кариотип в комбинация с *IGH* транслокация се среща при около 5% от пациентите⁹⁹.

Хипердиплоидията вероятно възниква в следствие на дефект в делителното вретено и центрозомиите. Прогнозата при такива пациенти обикновено е благоприятна, а лоша при наличието на комбинацията хипердиплоиден кариотип с $del(17p13)$, $t(4;14)$ или допълнителна 1q gain⁹⁹. Фенотипно се асоциира с IgG

изотип, експресия на капа леки вериги и се среща по-често при възрастни пациенти¹⁰⁰.

1.7.1.2.2. Нехипердиплоиден кариотип

Нехипердиплоидния кариотип се подразделя на три групи:

- Хиподиплоиден (≤ 45 хромозоми)
 - хиперхиплоидия
- Псевдодиплоиден (44/45 или 46/47 хромозоми)
 - при тези две групи най-често срещаните монозомии са по хромозоми 13, 14, 16 и 22⁸⁶.
- Тетраплоиден
 - изключително рядка полиплоидия, при която кариотипа се състои от четири копия на всяка хромозома, в резултат на което общия им брой е 92.

При хиподиплоидния кариотип хромозомите наброяват 35-45 и са характерни загуби на 13, 14, 16 и 22 хромозома. При него често се наблюдават структурни аберации плюс *IGH* транслокации¹⁰¹.

Интересна, но рядка подгрупа на хиподиплоидията е хиперхиплоидията, която е рядка бройна аномалия характеризираща се с почти същия брой хромозоми както при хипердиплоидия, но с наличие на дизомии вместо тризомии, и асоциираща се с лоша прогноза¹⁰².

Хиперхиплоидията се среща много рядко при пациенти с ММ, по-често се наблюдава при деца с остра лимфобластна левкемия¹⁰³. Кариотипа наброява 24 – 34 хромозоми, като се наблюдават дизомии на следните нечетни хромозоми 3, 5, 7, 9, 11, 15, 18, 19 и 21, същите които се откриват и при хипердиплоидия плюс хромозома 18¹⁰². Откриват се също монозомии на всички автозомни хромозоми,

като с клинична значимост са следните 1p, 6q, 13q, 16q и 17p, които попадат в графата лоша прогноза^{83,102,104,105}.

Сред пациентите попадащи в групата на нехипердиплоидния кариотип, тези с хиподиплоидия са с най-агресивно протичане и с наличие на висок процент маркери свързани с прогресията на заболяването^{106,107}.

1.7.1.2.3. Del(13)(q14)

Del(13q) се среща при 50% от пациентите с новодиагностициран ММ, където тя е клонална, докато при MGUS е или субклонална, или клонална¹⁰⁸. По-често се наблюдава пълна монозомия 13. По-рядко се среща делеция, като тя може да обхване цялото дълго рамо, в което са разположени няколко локуса или като интерстициална обхващаща региони 13q14.11-13q14.23¹⁰⁹. В 13q14 локуса е разположен *RB1* гена, но загубата на 13q най-често е моноалелна и в много редки случаи се откриват мутации, или делеции, водещи до биалелна инактивация¹¹⁰. Del(13q14) рядко се наблюдават като единична аномалия, често се среща в комбинация с t(4;14) и t(14;16). С по-висока честота се установява при хиподиплоиден кариотип. Въпреки, че се установява при около 20% от случаите с конвенционална цитогенетика, се счита за критичен прогностичен фактор¹¹¹. При проучване направено в Mayo Clinic Rochester между 2005-2015 година сред 1181 пациенти с FISH анализ, при 411 от тях (35%) е открита монозомия 13, при 73 (6%) делеция, а при 9 (1%) комбинацията от двете¹¹¹.

1.7.2. Вторични хромозомни аберации откриващи се при пациенти с множествен миелом

1.7.2.1. *MYC* транслокации

Аберациите въвличащи *MYC* прото-онкогена разположен на дългото рамо на 8 хромозома (8q24.1) са вторични и се откриват при 15-20% от новодиагностицираните пациенти чрез FISH анализ¹¹². Те могат да бъдат инсерции, инверсии и транслокации, които водят до свръхекспресия на *MYC*, който кодира транскрипционен фактор участващ в най-различни клетъчни процеси като растеж и пролиферация, метаболизъм, протеинов синтез, и апоптоза. Т.нар. партъорни локуси при транслокациите включват *IGH*, *IGL*, *IGK*, *FAM46C*, *FOXO3*, и *BMP6*^{113,114,115}. Активацията на *MYC* прото-онкогена е ключов момент в прогресията от MGUS и SMM до MM^{74,95}.

1.7.2.2. **t(8;22)(q24.21;q11.2) *MYC/IGL***

Транслокацията t(8;22)(q24.21;q11.2) *MYC/IGL* обикновено се открива при лимфом на Burkitt, но може да се срещне макар и рядко, и при пациенти с плазмоклетъчен миелом¹¹². През 2009 година транслокацията е описана в комбинация с комплексен кариотип при жена с MM¹¹⁶.

1.7.2.3. **t(1;8)(p11-p13;q24.21) *MYC/***

Транслокацията t(1;8)(p11-p13;q24.21) *MYC/* се открива основно при множествен миелом, което подсказва, че играе много важна роля в патогенезата и прогресията на заболяването. Тя включва *MYC* локуса 8q24.21 и е описана само при няколко пациента⁷⁴.

Установено е, че $der(1)t(1;8)(p13;q24)$ може да се дублицира в резултат на което да се получат допълнителни копия, както на *MYC* така и на 1q21. Това е вторична аберация, която е пример за *MYC* транслокация, невключваща пренареждане на веригите на имуноглобулините¹¹⁷. Приблизително при две трети от случаите $del(1p)$ се среща заедно с $del(13q)$ ¹¹⁸.

MYC транслокациите играят важна роля в патогенезата на множествения миелом и са индикация за агресивен ход на заболяването. Те често са комплексни, като локусите 1p11-13, предизвикват дерегулация на *MYC* засягаща пролиферацията, растежа и апоптозата, което води до по-агресивен ход на заболяването¹¹⁴.

1.7.3. Бройни хромозомни аберации

Вторичните хромозомни аберации наблюдавани при пациенти с ММ включват загуба на късо рамо на 1 хромозома $del(1p)$, амплификация на дълго рамо на 1 хромозома (наличие на 4 или повече копия на рамото) $amp(1q)$, $gain(1q)$ - допълнителни до 3 копия на дълго рамо, делеция на дълго рамо на 13 хромозома - $del(13q)$ и загуба на късо рамо на 17 хромозома $del(17p)$ ^{57,119}.

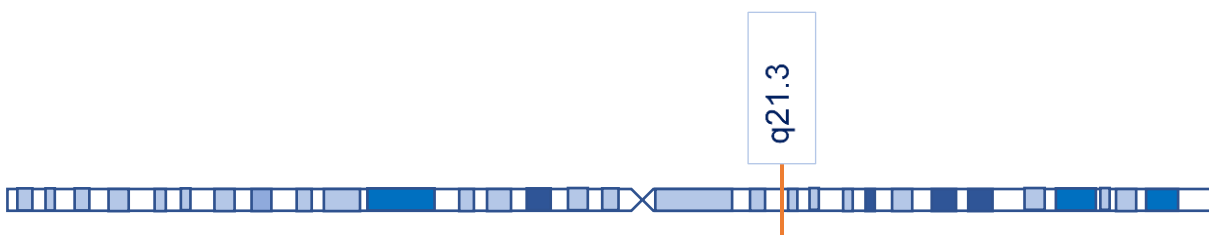
Хромозомните аберации по първа хромозома са най-често срещаните структурни такива при ММ¹²⁰. По късото рамо най-често се наблюдават делеции – $del(1p)$, докато по дълго рамо, най-често амплификации – $amp(1q21)$ ¹². Аберациите по дългото рамо са особено комплексни и с тенденция да стават нестабилни по време на туморната прогресия. Конвенционалната цитогенетика разкрива дупликации в райони 1q12-q23, изохромозома 1q, скачащи или на цяло рамо транслокации¹²⁰.

Наличието им в кариотипа повишава риска от прогресия, а амплификация се наблюдава с много по-висока честота при пациенти с рецидив, отколкото при новодиагностицирани¹²¹.

1.7.3.1. 1q21 gain (+1q)

Най-често срещаната структурна аберация наблюдавана при 20-50% от пациентите е наличието на 3 копия на региона 1q21.3 (Фигура 15), и е известна като 1q gain^{122,123}. Тя се представя като дупликация на 1q, небалансирана транслокация на цялото дълго рамо, изохромозома или скачаща транслокация, всички видими на конвенционална цитогенетика. Аберациите настъпили в първа хромозома възникват в резултат на нестабилност в 1q12 района, който представлява силно декондензиран перицентромерен хетерохроматин⁸⁸.

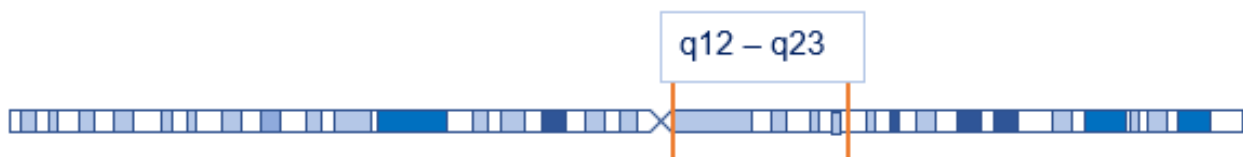
Това хромозомно нарушение е най-често срещаното при ММ и е лош прогностичен фактор, както за периода свободен от заболяване, така и за общата преживяемост^{122,123,124,125}. Наличието на 1q21.3 gain влияе на туморната прогресия чрез дозов ефект на онкогени като *CKS1B* в 1q21.3 и се счита за лош прогностичен белег^{121,122}. Генът *CKS1B* е член на фамилия протеини Cks1, които взаимодействат с циклин-зависими кинази и играят много важна роля в клетъчния цикъл¹²¹. Броят на копията се свързва, както с прогресията, така и с прогнозата на заболяването¹²⁶.



Фигура 15: Хромозома 1, локус 1q21.3

1.7.3.2. 1q21 амплификация, amp(1q)

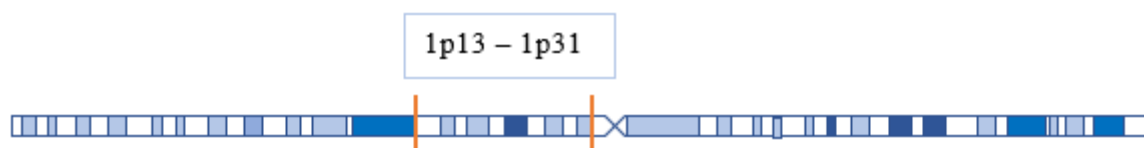
Амплификацията на проксималния край на 1q21 се установява с FISH при около 40% от новодиагностицираните пациенти и при 70% от пациентите с рецидив¹²⁷. Тя възниква в резултат на формиране на дицентрични хромозоми, последвано от множество цикли на счупвания и фузии, които в крайна сметка водят до амплификация (повече от 4 копия) на транскрипционен участък в 1q21¹²⁵. Района, намиращ се между 1q12-q23 (Фигура 16), съдържа няколко ключови за патогенезата на миелома гени като *MUC1*, *MCL1*, *PDZK1*, *IL6R*, *BCL9*, *CKS1B*, *PSMD4*, *UBE2Q1*, *ANP32E*^{126,128,129}. Те се свръхекспресират и амплифицират в резултат на 1q gain. Установено е също, че пациентите с повече от 4 копия на дълго рамо на първа хромозома са с по-лоша прогноза, отколкото тези с 3, т.е. наблюдава се дозова зависимост¹²¹. Както при del(1p), приблизително при две трети от случаите, amp(1q) се среща заедно с del(13q)¹²⁶. В проучване е установено, че пациентите с амплификация 1q имат резистентност към лечение с протеазомни инхибитори¹²⁸.



Фигура 16: Хромозома 1, локус q12 - q23

1.7.3.3. del(1p)

Делециите на късото рамо на първа хромозома (del(1p)) се срещат при 20-25% от пациентите и често възникват заедно с хиподиплоидия¹³⁰. За разлика от хипердиплоидията, хиподиплоидията е лош прогностичен фактор, какъвто е и наличието само на del(1p)¹²⁷. Делециите най-често са интерстициални и обхващат район простиращ се между 1p12 до 1p32.3 (*Фигура 17*), като между най-често срещаните са 1p12 и 1p32.3, които се срещат съответно при 15% и 8% от пациентите^{131,120,130}. При проучване направено сред 127 пациенти е установено, че с по-кратка преживяемост са тези с установена делеция в района 1p31-32¹³². Няколко са тумор-супресорните гени намиращи се между тези райони *CDKN2C*, *FAF1*, *MTF2*, *TMED5* и *FAM46C*^{57,113,133}. Делециите по първа хромозома са видими, както на конвенционална цитогенетика, така и с FISH¹³⁴.



Фигура 17: Хромозома 1, локус p13 до p31

1.7.3.4. Делецията 17p13

Аберациите по късото рамо на 17 хромозома засягат ключовия в патогенезата на ММ ген *TP53* (*Фигура 18*). Те могат да бъдат или делеция, или мутация само на единия алел, или и на двата, т.нар. биалелна инактивация. Пациентите с биалелна инактивация имат по-агресивно протичане и съответно лоша прогноза^{135,136,137}. Тя води до загуба на хетерозиготност на гена, чиято функция е да регулира клетъчния цикъл и апоптоза. Среща се рядко при

новодиагностицирани пациенти (5 до 10% от случаите), като честотата нараства с прогресията на заболяването^{108,138,139}. По-често се наблюдава при рецидивиращи или рефрактерни случаи (20 до 40%), или при по-агресивно протичащи заболявания като плазмоклетъчна левкемия, и особено при засягане на централна нервна система^{8,140,141}. Наличието ѝ се свързва с лоша прогноза, често водеща до рецидив¹⁰. При проучване направено сред 520 новодиагностицирани пациенти е установено, че с най-тежко протичане са тези с установена делеция 17p13, в комбинация с фактори като възраст и високи нива на β_2 -микроглобулин¹²³. Делецията или инактивацията на *TP53* е късен момент в еволюцията на ММ и се наблюдава чрез FISH при 10% от пациентите^{108,123,135}.



Фигура 18: Хромозома 17, локус p13

Три са главните характеристики, които отличават първичните цитогенетични аномалии от вторичните. Първичните не се припокриват, т.е. не могат да се открият едновременно две транслокации въвличащи 14 хромозома, но могат да се наблюдават една или две вторични едновременно с първична⁵⁷.

Първичните цитогенетични нарушения възникват на ниво MGUS и се считат за инициращ момент, водещ до установяването на доминантна MGUS клонална популация. Такива аномалии могат да се установят на етап MGUS и SMM, въпреки, че в сравнение с ММ, чувствителността на FISH е ниска при работа с малки по размери клонални популации¹². Първичните се откриват с FISH в почти цялата популация от клонални клетки в една проба, докато вторичните цитогенетични аномалии са предимно субклонални⁵⁷.

Ролята на епигенетичните дефекти при ММ включват промяна в ДНК метилирането, хроматиновата структура и miRNA дерегулация¹⁴². Метилацията

при ММ показва вариабилност, при някои пациенти е налице хипометилация, а при други хиперметилация в сравнение с нормалните плазматични клетки. Нивата на хиперметилация са подобни при MGUS и ММ, докато нивата на хипометилация се повишават при ММ, което предполага роля в развитието на болестта. ДНК хиперметилацията в енхансерни региони се свързва с намалена експресия на гени асоциирани с тези енхансери¹⁴².

Цитогенетичните находки имат много важна прогностична роля за ММ, особено в разграничаването на високо-рискови пациенти. При всички неопластични заболявания, идентификацията на първичните хромозомни аберации, които са уникални за клетъчната популация с общ произход подпомага точната класификация на неоплазиите, както и техния диагностичен и терапевтичен потенциал. Например, идентификацията на фузионния ген *BCR::ABL1* при хронична миелоидна левкемия (ХМЛ)¹, *JAK2* мутацията при полицитемия вера² и *MYD88* мутацията при макроглобулинемията на Waldenström³ улесниха диагностицирането на тези заболявания. Тези първични хромозомни аберации са съществени за установяването на клонални субпопулации, които са причина за прогресията на заболяването и, които в много от случаите могат да бъдат обект на таргетна терапия. Като примери могат да се посочат Imatinib при пациенти с ХМЛ, Ruxolitinib при такива с полицитемия вера и Ibrutinib при макроглобулинемията на Waldenström.

При мащабни проучвания в последните години, при които на пациенти с ММ е проведено цялогеномно секвениране са установени мутации в множество гени (Таблица 9). Установените молекулярни нарушения хвърлят светлина към по-доброто разбиране на клоналната еволюция на заболяването при всеки пациент. Това показва и забележителната генетична хетерогенност на ММ^{143,144,145}.

Таблица 9: Молекулярни нарушения срещани се при пациенти с ММ (адаптирана по⁸⁰).

Ген	Честота (%)	Функция
<i>KRAS</i>	20-25	MAPK сигнален път
<i>NRAS</i>	23-25	MAPK сигнален път
<i>TP53</i>	8-15	тумор-супресорен ген
<i>DIS3</i>	11	Ексом ендорибонуклеаза
<i>FAM46C</i>	11	неясна
<i>BRAF</i>	6-15	MAPK сигнален път
<i>TRAF3</i>	3-6	NF-κB сигнален път
<i>ROBO1</i>	2-5	Трансмембранен рецептор въввлечен в клетъчния растеж
<i>CYLD</i>	2-3	NF-κB сигнален път
<i>EGR1</i>	4-6	Транскрипционен фактор
<i>SP140</i>	5-7	Кодирания протеин се открива в големи количества в ядрата на левкоцитите
<i>FAT3</i>	4-7	Член на кадхерините
<i>CCND1</i>	3	Клетъчен цикъл

1.8. Маркери използвани при диагностиката на Множествения миелом

Няколко са маркерите, които се използват в наши дни в полза на диагностицирането на ММ (Фигура 19)



Фигура 19: Диагностични маркери използвани при ММ

1.8.1. Хромозомни нарушения

Конвенционалният цитогенетичен анализ не е от най-информативните методи за изследване на хромозомни нарушения при ММ. Това се дължи на няколко фактора, между които ниския пролиферативен индекс на плазматичните

клетки, наличието на криптични нарушения и ниския процент на плазмоцитна инфилтрация в КМ¹⁴⁶. Поради тази причина използването на ЦГ анализ е препоръчително да се извършва при наличие на плазмоцити в КМ > 15%^{27,147,148}.

Препоръчителен метод за доказване на хромозомни нарушения е флуоресцентната *in situ* хибридизация. При този анализ се препоръчва материалът за изследване да е от първото теглене на аспирата. Освен това за най-добра ефективност е необходимо плазмоцитите да са CD138-селектирани или маркирани за цитоплазмени леки вериги на имуноглобулини, а самият анализ да е направен върху минимум 100 плазмоцита^{147,149,150}.

1.8.2. Серумна протеинова електрофореза (SPE)

При ММ плазматичните клетки продуцират имуноглобулини – тежки вериги, леки вериги или и двете заедно. Те се наричат моноклонални протеини или парапротеини, и се установяват чрез серумна електрофореза. Наличието им се използва за мониториране на заболяването – за прогресия, ремисия или рецидив¹⁵¹.

1.8.3. Наличие на протеин на Bence Jones в урината

Протеинът на Bence Jones е специфичен и се открива в урината на пациенти с ММ. Той се състои от капа или ламбда протеини. При пролиферацията на плазматични клетки се образува голямо количество леки вериги, които преминават в урината¹⁵². Наличието му в урината е един от важните параметри за поставянето на диагнозата и има прогностично значение при пациенти с ММ¹⁵³.

1.8.4. Серумни свободни леки вериги (sFLC)

Нормалните плазматични клетки продуцират леки и тежки вериги, като леките обикновено са в по-голямо количество. Този излишък на леки вериги се открива в циркулацията като свободни леки вериги. При пациентите с ММ се откриват в излишък или капа, или ламбда sFLC, като това може да се използва както за мониториране на прогресията на заболяването, така и за терапията. Установено е, че преживяемостта на пациентите с високо ниво на sFLC е намалена с 30%, и поради тази причина този индикатор е от изключителна важност¹⁵⁴.

1.8.5. Образна диагностика

Много са образните методи, които се използват в настоящия момент. Приблизително 80% от пациентите с ММ имат радиологично видими изменения по костите. Използването на рентгенография подпомага установяването на вече налични лезии, но при условие, че е налична загуба на 50 до 70% костна маса¹⁵⁵. Счита се, че 10% до 20% от ранните лезии биват „изпускани“, освен това не може да се използва за проследяване на ефекта от лечение, тъй като настъпилите изменения са необратими¹⁵⁶.

Ядрено-магнитният резонанс (ЯМР) е широко използван и при новодиагностицирани пациенти, и при пациенти с рецидив, както и при съмнение за компресия на гръбначния мозък. Той е препоръчителен и при пациенти с нормална рентгенография, но със симптоми покриващи критериите за ММ. Едно от предимствата на ЯМР е, че може директно да се визуализира миеломната инфилтрация в костите^{157,158}.

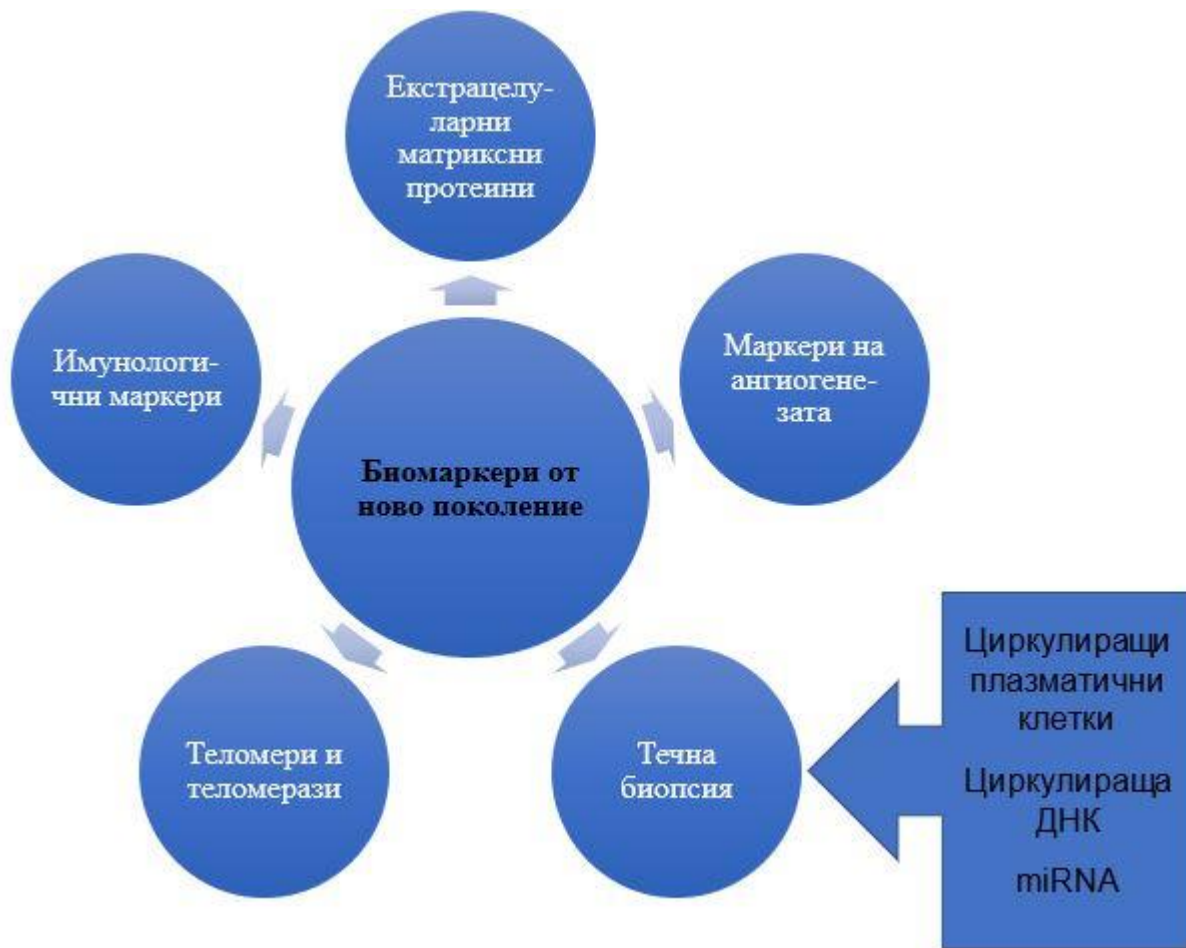
Позитрон емисионната томография (ПЕТ), особено в комбинация с компютърна томография (КТ) може да се използва в случаите на активно заболяване. С този метод

могат да се установят лезии, които са минимум 1 см, съответно недостатъка е, че се „изпускат“ по-малките^{159,160}.

Недостатъците на методите могат да се заобиколят при приложението им в комбинация, при което чувствителността им нараства до 92%¹⁶¹. Най-пълна информация за наличие на костни лезии и инфилтрация в костния мозък предоставят компютърната томография (КТ), ядрено-магнитния резонанс (ЯМР) и позитрон емисионната томография (ПЕТ) с флуородексиглюкоза (FDG)¹⁶². Нещо повече, с тяхна помощ ММ може да се установи още в ранен етап, което е от голямо значение за прилагането на лечение. Установено е, че чувствителността на FDG – PET се равнява на 85-90%, а установяването на миеломни лезии на 75%^{163,164,165,166}. Въпреки, че имат голямо значение за диагностиката на ММ тези методи не са в графата „златен стандарт“, но се използват често в диференциално диагностичен план.

1.9. Диагностични биомаркери от ново поколение

С развитието на технологиите и нуждата от по-точно и своевременно поставяне на диагноза идва и необходимостта от търсенето, и въвеждането на нови, т.нар. биомаркери (*Фигура 20*).



Фигура 20: Диагностични биомаркери от ново поколение използвани при ММ.

1.9.1. Екстрацелуларни матриксни протеини (ЕМП)

Костният мозък се състои от хемопоеични и не-хемопоеични клетки, както и от екстрацелуларен матрикс, и свързаните с него протеини, и цитокини. В литературата има съобщения, че те играят много важна роля в диференциацията на плазматичните клетки. Освен това има данни, че са отговорни за лекарствената резистентност, като това ги прави потенциални цели за таргетна терапия¹⁶⁷. Тези протеини участват в много патологични процеси включително и в ММ, и биха могли да се използват като маркери за диагностика и прогнозиране.

Друг ЕМП, за който има съобщение, че участва в патогенезата на ММ се нарича Versican (VCAN). Установено е, че той има диагностичен потенциал, както и че е с имунорегулаторна роля в ММ ^{168,169,170}.

1.9.2. Маркери на ангиогенезата

От всички фактори на ангиогенезата, васкуларният ендотелен растежен фактор (VEGF) е най-проучен и е цел на много химиотерапевтици. Има наблюдения, че свръхекспресията на VEGF, както и на други проангиогенни фактори като ангиопоетин 1 и 2, и хепатоцитния растежен фактор в ММ са показали потенциал да се използват като диагностични маркери¹⁷¹.

1.9.3. Теломери и теломерази

Теломерите са специализирани структури, които се намират в краищата на хромозомите и се състоят от тандемни повтори TTAGGG, и шелтерин, който е протеинов комплекс. В комбинация те защитават хромозомата от увреди и фузии. Дължината на теломерите се счита за биомаркер за стареенето и преживяемостта. Непрекъснатото делене на клетката води до намаляване на размера на теломерите, проблем, който може да бъде коригиран с теломераза, която представлява ензим обратна транскриптаза. Неговата функция е да добавя ДНК секвенцията TTAGGG към 3' края на хромозомите и по този начин да възстанови целостта им¹⁷². Активността на теломеразата и шелтерина се открива в множество неоплазии. При проучване е установена потенциалната им диагностична роля и при ММ¹⁷³.

1.9.4. Циркулиращи плазматични клетки (ЦПК)

Циркулиращите туморни клетки могат да бъдат открити в кръвната циркулация. Те се отделят от първични и метастазирани тумори и могат да дадат информация за стадия на заболяването. Тези клетки се установяват с флоуцитометрия с помощта на специфични маркери намиращи се по повърхността им. Разкриването на циркулиращите плазматични клетки може да е от помощ за статуса и преживяемостта на пациентите с ММ¹⁷⁴. Метаанализ показва, че наличието на ЦПК е показател за агресивно протичане и ниска преживяемост¹⁷⁵. А при друго проучване направено сред новодиагностицирани пациенти се установява връзка с прогресията, цитогенетичните маркери с лоша прогноза, ниската обща преживяемост и висок риск от рецидив¹⁷⁶.

1.9.5. Геномни маркери

Тези маркери представляват различни мутации и полиморфизми, които се установяват с помощта на секвенирането от ново поколение (Next generation sequencing, NGS). Установени са локуси като rs12521798 и rs17748074, които са свързани с Vortezomib-индуцирана периферна невропатия при пациенти с ММ¹⁷⁷. При друго проучване се прави връзка между полиморфизмите на глутатион S трансфераза и тумор некротизиращия фактор алфа с прогнозата, и преживяемостта на пациентите¹⁷⁸. Установено е, че полиморфизма rs4240803, един от медиаторите на резорбцията на Melphalan е индикатор за по-добър терапевтичен отговор¹⁷⁹.

1.9.6. Имунни маркери

Имунните клетки участват във всички физиологични и патологични състояния в човешкия организъм, а имунната система се дестабилизира в резултат на нарушената им функция. Именно тези параметри при ММ формират основата на терапията с

имуномодулатори, като Lenalidomide или Pomalidomide. При ММ се наблюдава дерегулация на ефекторните Т клетки и свръхекспресия на регулаторните Т клетки, и миелоидни супресори. В резултат на всичко това се наблюдава нарушена експресия на цитокини и хемокини. При проучване са установени високи нива на Th₂ цитокини (IL-4 и IL-10) и ниски на Th₁ асоциираните цитокини, което предполага поляризация на клетките към Th₂ при ММ¹⁸⁰. При друго проучване се установява, че имуномодулатора Lenalidomide предизвиква повишаване на продукцията на IFN-α от плазмоцитоид дендритните клетки, което води до повишен имунен отговор за елиминация на миеломните клетки¹⁸¹.

При анализи е установено още, че в плазматичните клетки на пациенти в рецидив се установява повишено количество на програмиралия протеин за клетъчна смърт 1 (PD-1)^{182,183}. Повишена експресия на PD-1 се наблюдава още и в NK- и Т-клетките. Всички тези данни за имунните маркери дават основание на авторите да смятат, че те биха могли да се използват в диагностичен, прогностичен и терапевтичен план.

II. Формулиране на целта и задачите

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Целта на настоящата работа е да се установи и анализира вида, честотата и прогностичното значение на хромозомните нарушения при новодиагностицирани пациенти с клинична диагноза множествен миелом.

2.2. Задачи

Във връзка с тази цел бяха формулирани следните задачи:

1. Да се селектира обекта на проучването, да се групира по стадии
2. Да се установи честотата и структурата на откритите хромозомните аберации
3. Да се анализират хромозомните аберации разкрити чрез конвенционален цитогенетичен метод и тяхното прогностично значение.
4. Да се анализират хромозомните аберации разкрити чрез молекулярно-цитогенетичен метод FISH и тяхното прогностично значение.
5. Да се направи анализ на количеството плазматични клетки в костен мозък спрямо цитогенетичните резултати.
6. Да се установи преживяемостта спрямо цитогенетичните резултати.
7. Да се направи сравнителен анализ на кривите на преживяемост в зависимост от стадиращата система.

III. Материали и методи

3. Материали и методи

3.1. Материали

Материална база за реализиране на дисертационния труд:

- Катедра по Медицинска генетика, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна
- Лаборатория по Медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна
- Клиника по клинична хематология, УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна
- Използвана е информация от електронна база данни “Gamma MultiLab” на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.

3.1.1. Клиничен материал

В проучването са включени 110 пациенти на възраст от 38 до 91 години насочени за генетичен анализ към Лаборатория по Медицинска генетика на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна от Клиника по клинична хематология за период от 5 години (2016-2020 година).

Клиничното проучване е проведено след получено разрешение от Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна с решение №103 от 27.05.2021г. в съответствие с изискванията на Хелзинкската декларация.

3.1.2. Биологичен материал

Конвенционалният цитогенетичен и молекулярно-цитогенетичният анализ са осъществени върху клетъчна суспензия от костен мозък.

3.2. Критерии за подбор на пациенти

Включващи критерии:

1. Възраст на пациентите над 18 г.
2. Пациенти с диагноза „множествен миелом“ поставена съгласно критериите на международната работна група по миелом.
3. Пациенти с проведен ЦГ анализ.
4. Пациенти с проведен FISH анализ.

Изключващи критерии:

1. Пациенти с поставена диагноза ММ, но без проведен ЦГ анализ.
2. Пациенти с поставена диагноза ММ, но без проведен FISH анализ.

3.3. Методи

3.3.1. Лабораторни методи

Лабораторните методи в настоящото проучване са:

- конвенционален цитогенетичен метод (стандартно кариотипиране)
- молекулярно-цитогенетичен метод върху интерфазни ядра (локус-специфична FISH)

Описание на лабораторните методи, застъпени в настоящото проучване:

3.3.1.1. Конвенционален цитогенетичен анализ:

Конвенционалният цитогенетичен анализ се състои от пет етапа – посявка, обработка, разкапване, оцветяване и анализиране.

Работи се по протокола на Лаборатория по Медицинска генетика – Варна.

Посявка на костен мозък (I етап):

Необходими реактиви:

- Хранителна среда – комбинирана (MarrowPrime, кат. № MP-B, Capricorn Scientific, Германия),
- Хепарин (Хепарин 500 IU/ml)
- Телешки серум (FBS, Fetal Bovine Serum, кат. № 16000044 Gibco, САЩ),
- L-glutamine 200 mM (кат. № 25030081, Gibco, САЩ)

Протокол за посявка на костен мозък (I етап):

Посявката на костен мозък представлява смесване на известно количество костен мозък с хранителна среда с цел култивиране на ядрени клетки за нуждите на цитогенетичното изследване. Работи се с костен мозък, взет стерилно в затворена система (вакутейнер) с хепарин (Lithium Heparin).

В стерилна среда (ламинарен бокс) в 2 епруветки с конично дъно се добавят по 5 ml хранителна среда, след това 0,25 ml (125 IU) хепарин. Вакутейнера с костния мозък се разклаща добре и се излива внимателно в епруветката, след което се центрофугира за 10 мин. на 1000 rpm. След старателно почистване на ламинарния бокс с дезинфектант, се включва UV-лампа с цел дезинфекция за поне 20 мин. Във флашка за клетъчно култивиране се поставя 5 ml хранителна среда, след това се добавят 0,5 ml телешки серум и 0,2 ml L-glutamine. От центрофугирания вакутейнер с костен мозък внимателно се отпипетира на границата на пелетата и супернатанта и се добавят 7-8 капки във всяка флашка за клетъчно култивиране от суспензията. Те се затварят и разклащат леко с въртеливи движения за добро размесване, и се поставят в термостат на 37 °C за 48-72 часа.

Обработка на костен мозък (II етап):

Необходими реактиви:

- Хипотоник на Ohnuki (0,410 g KCl в 100 ml дестилирана вода (dH₂O), 0,09 g Na₃C₆H₅O₇ в 20 ml dH₂O и NaNO₃ в 50 ml dH₂O)
- Метанол (Methanol ≥ 99,8%)
- Ледена оцетна киселина (Acetic acid ≥ 99,8%)
- 5-флуоро-2-дезоксисуридин 0,1 ml (FudR, 5-Fluoro-2-deoxyuridine, кат. № F05-03, Sigma Aldrich, САЩ)
- Колцемид 10 µg/ml (Colcemid, кат. № 477-30-5, Capricorn Scientific, Германия)

Техника на изпълнение:

На 24^{-тия} час след посявката се накапват по 20 µl FUdR във флашка за клетъчно култивиране и се прибират в термостат. FUdR подпомага издължаването на хромозомите. След 24 часа се накапват по 150 µl митотичен инхибитор Colcemid, флашките за клетъчно култивиране се затварят плътно и се инкубират за 15 мин. На този етап работата преминава към камината за химична обработка, съдържанието от флашките за клетъчно култивиране се пресипва в конична епруветка и се центрофугира за 10 мин. на 1000 rpm. Следващата стъпка е отпипетиране на надстоящата течност и размесване на останалата с леки почуквания по епруветката. Следва обработка с 3 ml хипотоник на Ohnuki, като първоначално се добавят няколко капки за адаптация, а после останалата част се накапва по стената и внимателно се ресуспендира. Така епруветките престояват 20 мин. в термостат, след което отново се центрофугират за 10 мин. на 1000 rpm. Повтарят се стъпките с хипотоника, след което се пристъпва към добавянето на пресен фиксатор (метанол и ледена оцетна киселина в обемно съотношение 3:1) до общо количество 5 ml на епруветка. След енергично ресуспендиране те се затварят плътно и се прибират за 30 мин. в хладилник, след което се центрофугират за 10 мин. на 1000 rpm. Отново следва отпипетиране на надстоящата течност и размесване на останалата с леки почуквания по епруветката, и струйно добавяне на фиксатор, и пак центрофугиране. Тези стъпки се повтарят още веднъж. Етапа завършва с отпипетиране на надстоящата течност, като в епруветката трябва да останат не повече от 0,5 ml течност. Отново се размесва чрез почукване с пръст, след това се добавя фиксатор по преценка до опалесценция и 3-4 капки от пробата се накапват върху студени предметни стъкла от височина 20-25 см. Готовите стъкла се оставят да изсъхнат и прибират в кутия, това са т.нар. контролни стъкла, които не се оцветяват. Епруветките се допълват с фиксатор до 4 ml и се съхраняват в хладилник.

Протокол за разкапване на стъкла за оцветяване (III етап):

Техника на изпълнение:

Епруветките, които са престояли 24 часа с фиксатор в хладилник се центрофугират за 10 мин. на 1000 rpm. Със серологична пипета с обем 3 ml се отпипетира надстоящата течност до 0,5 ml, остатъка се размесва с почукване с пръст. Добавя се фиксатор по преценка до опалесцентен вид, като количеството варира според гъстотата на културата. Предметните стъкла се поставят на водна баня за загряване, с температура на водата 40-42 °C. Накапват се 3-4 капки от пробата от височина 20-25 см върху обезмаслени стъкла и се оставят да изсъхнат на стайна температура до следващия ден.

Протокол за оцветяване на препарати от костно-мозъчни култури (IV етап):

За оцветяване се използва техниката на G-лентовото оцветяване (G-banding), като след предварително третиране с трипсин, препаратите се подлагат на въздействието на багрило.

Необходими реактиви:

- Водороден пероксид 15%
- Динатриев хидроген фосфат фосфат 0,552 g в 55 ml dH₂O (Na₂HPO₄)
- Дикалиев хидроген фосфат 0,433 g в 45 ml dH₂O (KH₂PO₄)
- 1 × PBS (pH 7,4) (Фосфатно-буферизиран физиологичен разтвор, Phosphate Buffered Saline, кат. № AM9624, Invitrogen, Германия)
- Трипсин 0,25 % (Trypsin-EDTA solution, Sigma Aldrich, САЩ)
- Дестилирана вода,
- Багрило на Giemsa (Giemsa's azur eosin methylene blue solution for microscopy, кат. № HX20201004, Sigma Aldrich, САЩ).

Техника на изпълнение:

За съкращаване на процеса на „остаряване“ на предметните стъкла разкапани предния ден, е необходимо те да се поставят на нагрята до 90 °C плоча за 30 мин. В бехерова чаша се измерват 0,0625 g трипсин и се добавя 50 ml PBS, след което течността се прехвърля в стъклена колба и се размесва добре. Така изготвения реактив се прехвърля в стъклена вана на Хелендал и се разбърква със стъклена бъркалка. В отделна вана се наливат 50 ml 15%^{-тен} разтвор на водороден пероксид (разреден 30% водороден пероксид с дестилирана вода в съотношение 1:1). В друга се смесват 45 ml дикалиев хидроген фосфат и 55 ml динариев фосфат. В градуирана епруветка се слага стъклена фуния с два листа филтърна хартия и се добавя багрило, така че крайното количество да е 6 ml. Филтрираното багрило се добавя към ваната с калиев и натриев фосфат и се разбърква със стъклена бъркалка. Предметните стъкла се потапят последователно във ваните с водороден пероксид, изплакват се с дестилирана вода и се отцеждат, след което се потапят в трипсина, и отново се изплакват. Последната стъпка е стъклена вана на Хелендал с багрило, като там се оставят за 2-5 мин., след което отново се изплакват с дестилирана вода и се оставят да изсъхнат на стайна температура.

Микроскопиране (V етап)

Анализират се 10-20 добре окръглени метафазни пластинки, по-възможност с минимално припокриващи се хромозоми и с добро качество на хромозомните ленти. Анализът и заснемането са извършени на микроскоп Carl Zeiss JenaVal при увеличение 1000×. Всички хромозомни аберации са описани съгласно международната номенклатура (International System for Human Cytogenomic Nomenclature, ISCN 2020)¹⁸⁴.

3.3.1.2. Локус-специфична FISH

Локус-специфична FISH

- ***Необходими реактиви за работа с флуоресцентна сонда XCyting Locus-Specific Probes, за откриване на делеции в региона del(17)(p13):***

Реактиви:

- етанол (70 %, 86 % и 99,9 %).
- DAPI/Antifade Solution, готов за употреба (кат. № S7113, Sigma Aldrich, САЩ)
 - 0.4×SSC (рН 7,0-7,5) загрят на 72°C (2×SSC кат. № AM9770, Invitrogen, Германия)
 - 50 ml 2×SSC
 - 200 ml Aqua destillata
- 2×SSC, 0,05 % Tween-20 (рН 7,0) на стайна температура (Tween, кат. № P1379-1L, Sigma-Aldrich, САЩ)
- Полихлоропропеново лепило ХЕЛМЕВЕКТ
- флуоресцентна сонда XL TP53/17cen 10 µl (кат. № D-5103-100-OG, MetaSystems, Германия)

Подготовка на препарата

Протокол за работа:

Охладената клетъчна суспензия се центрофугира за 10 мин. на 400 rpm, след което фиксатора се отпипетира до 1 ml. Материала се разрежда по преценка с няколко капки пресен фиксатор (метанол и ледена оцетна киселина в обемно съотношение 3:1) до опалесценция. Върху охладени и обезмаслени предметни стъкла се накапват 6-8 капки от клетъчната суспензия, след което се оставят да съхнат на стайна

температура под 45° наклон. След като препаратът изсъхне е необходимо да се избере поле с добре разпръснати клетки, което се прави на светлинен микроскоп със смет кондензор.

Етап денатурация:

Върху изсъхналите предметни стъкла с предварително маркирания район се накапва 10 µl от готовата за употреба сонда. Поставя се покривно стъкло с размер 22×22 mm², обезвъздушава се и се облепя внимателно с лепило, след това се поставя на нагриваща плоча при 75 °C (±1 °C) за 5 мин. По този начин се получава паралелна денатурация (ко-денатурация) на ДНК сондата и на препарата.

Етап хибридизация:

Предметното стъкло се поставя във влажна хибридизационна камера за една нощ при 37 °C (±1 °C).

Пост-хибридизационно измиване на несвързаната сонда:

Този етап се осъществява на тъмно с помощта на измиващи агенти и под въздействието на температура. Покривното стъкло се отстранява внимателно и препаратът се поставя във вана на Хелендал от полиметилпентен за 2 мин. с разтвор на 0,4 × SSC (pH 7,0) при 72 °C (±1 °C) (на водна баня), след това в стъклена вана на Коплен за 30 секунди в разтвор на 2 × SSC, 0,05 % Tween-20 (pH 7,0) на стайна температура. Етапа завършва с дехидратация с етанол, което се постига с последователно потапяне на стъклото в стъклени вани на Коплен (по 1 мин. съответно в 70 %, 86 % и 99,9 % етанол). Покривното стъкло съхне на тъмно и на стайна температура.

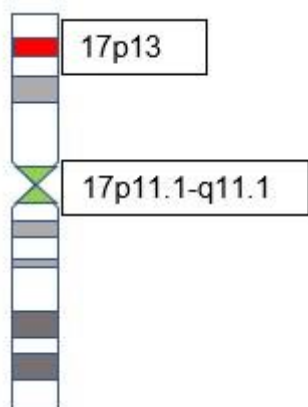
Оцветяване с DAPI/antifade:

DAPI/antifade (4',6-diamidino-2-phenylindole/Antifade Solution) е флуоресцентно багрило, което се свързва с богатите на тимин и аденин региони в ДНК и оцветява интензивно клетъчното ядро. Върху изсъхналият препарат се накапва 10 µl готов за

употреба разтвор DAPI/antifade и се покрива с покривно стъкло с размер 24×32 мм², като се избягва образуването на въздушни мехурчета. Необходими са 10-15 мин. за добро проникване на багрилото и препаратът е готов за микроскопиране. При невъзможност за анализиране веднага може да се съхранява във фризер на -20 °C (±5°C), като при това положение хибридизационните сигнали са активни до 6 месеца.

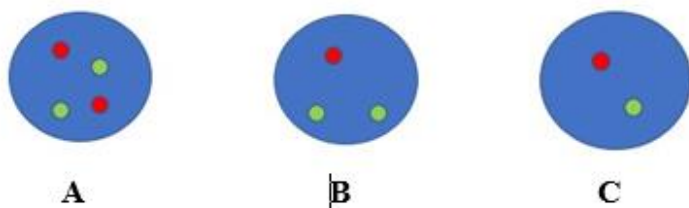
Микроскопиране:

Необходимия брой ядра за анализиране е 200, като за патологичен резултат се счита наличието на ≥10% абнормни ядра. XL TP53/17cen FISH сондата се използва за установяване на делеции в района 17p13, като специфичната проба е в червен цвят, а зелената, която хибридизира с центромера на хромозома 17 е контролата (*Фигура 21*).



Фигура 21: Диаграма на местоположението на сигналите получавани при FISH анализа.

При нормалните клетки се наблюдават 2 червени и 2 зелени сигнала (2R2G), при делецията очакваните сигнали са един червен (1R) и два зелени (2G). При наличие на един червен и един зелен сигнал (1R1G) се отчита пълна липса на едната 17 хромозома (монозомия 17) (*Фигура 22*).



Фигура 22: очаквани сигнали от FISH анализа: А-нормална клетка, В-делеция, С-МОНОЗОМИЯ

- **Необходими реактиви за работа с флуоресцентна сонда Kreatech™ FISH probes за откриване на делеции в региона *del(17)(p13)*, транслокации *t(4;14)*, *t(14;16)* и преустройства в региона *14q32***

Реактиви:

- 2 × SSC (рН 7,0) (кат. № AM9770, Invitrogen, Германия)
- 0,005 % пепсин в 0,01 М HCl (HCl, кат. №7647-01-0, Sigma Aldrich, САЩ)
- 1 × PBS (рН 7,4) (Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор, Phosphate Buffered Saline, кат. № AM9624, Invitrogen)
- 1 % Формалдехид в 1 × PBS/ 20 mM MgCl₂ (Formaldehyde solution 37%, кат. №8187081000, Sigma Aldrich, САЩ; 1 М MgCl₂, кат. № AM9530G, Invitrogen, Германия)
- етанол (70 %, 86 % и 99,9 %),
- измиващ буфер I (0,4 × SSC/20 × Tween),
- измиващ буфер II (2 × SSC/ 20 × Tween),
- DAPI/Antifade Solution, готов за употреба (кат. № S7113, Sigma Aldrich, САЩ)
- Метанол (Methanol ≥ 99,8 %)

- Ледена оцетна киселина (Acetic acid \geq 99,8 %)
- Флуоресцентни сонди (кат.№ KBI-10610, KBI-10602, KBI-10601, KBI-10738, Kreatech™ FISH probes, Leica Biosystems, Германия)

Подготовка на препарата:

Охладената клетъчна суспензия се центрофугира за 10 мин. на 400 rpm, след което фиксатора се отпипетира до 1 ml. Материала се разрежда по преценка с няколко капки пресен фиксатор (метанол и ледена оцетна киселина в обемно съотношение 3:1) до опалесценция. Върху студени и обезмаслени предметни стъкла се накапват 6-8 капки от охладената клетъчна суспензия, след което се оставят да изсъхнат на стайна температура под 45° наклон. След като препарата изсъхне е необходимо да се избере поле с добре разпръснати клетки, което се прави на светлинен микроскоп със снет кондензор. Следва нагряване за 10 мин. върху гореща плоча на 75 °C (\pm 1 °C) и охлаждане на стайна температура.

Етап денатурация:

Охладеното предметно стъкло първо се потапя за 2 мин. във вана на Хелендал от полиметилпентен на 37 °C (на водна баня) в разтвор 2 x SSC (pH 7,0), след това непосредствено преди поставянето във втория разтвор съдържащ 0,01 M HCl се добавят 50 μ l пепсин и така престоява 5 мин. на същата температура (на водна баня). Следва последователно потапяне в стъклени вани на Коплен - 3 мин. в 1 x PBS (pH 7,4), 10 мин. в 1% формалдехид разтворен в 1 x PBS и 20 mM MgCl₂, 3 мин. 1 x PBS (pH 7,4) и дехидратация в спиртна редица (по 1 минута съответно 70 %, 86 % и 99,9 % етанол). След това предметното стъкло се оставя да изсъхне напълно на стайна температура.

Етап ко-денатурация:

Темпериранията сонда се завърта на мини центрофуга (spin down), след което се изтегля с микропипета 10 μ l от нея и се накапва върху предварително определения район на предметното стъкло. Поставя се покривно стъкло с размер 22x22 mm², обезвъздушава се и внимателно се облепя с лепило, след това стъклото се поставя

на нагриваща плоча при 75 °C (± 1 °C) за 10 мин. По този начин се получава паралелна денатурация (ко-денатурация) на ДНК сондата и на препарата.

Етап хибридизация:

Предметното стъкло се поставя във влажна хибридизационна камера за една нощ при 37 °C (± 1 °C).

Пост-хибридизационно измиване на несвързаната сонда:

Този етап се осъществява на тъмно с помощта на измиващи агенти и под въздействието на температура. Покривното стъкло се отстранява внимателно и препаратът се поставя във вана на Хелендал от полиметилпентен за 2 мин. в Буфер I (0,4 × SSC/20 × Tween) при 72 °C (± 1 °C) (на водна баня), след това в стъклена вана на Коплен за 1 мин. в Буфер II (2 × SSC/ 20 × Tween) на стайна температура. Етапа завършва с дехидратация с етанол, което се постига с последователно потапяне на претметното стъкло в стъклени вани на Коплен (по 1 минута съответно в 70 %, 86 % и 99,9 % етанол). Покривното стъкло съхне на тъмно под 45° ъгъл и на стайна температура.

Оцветяване с DAPI/antifade (4',6-diamidino-2-phenylindole/Antifade Solution)

Върху изсъхналият препарат се накапва 15 μ л готов за употреба разтвор DAPI/antifade и се покрива с покривно стъкло с размер 24×32 мм². Необходими са 10-15 мин. за добро проникване на багрилото и препаратът е готов за микроскопиране. При невъзможност за анализиране веднага се прибира във фризер на -20°C (± 5 °C), като така може да престои до 1 месец.

TP53 (17p13) FISH сондата се използва за установяване на делеции в района 17p13, като специфичната проба е в червен цвят, а зелената, която хибридизира с центромера на хромозома 17 е контролата. Делеции в района 17p13 се визуализират с един червен сигнал и два зелени (1R2G). При наличие на един червен и един зелен

сигнал (1R1G) се отчита пълна липса на едната 17 хромозома (монозомия 17) Очакваните нормални сигнали са два червени (R) и два зелени (G) – 2R2G.

При транслокационните FISH сонди t(4;14) и t(14;16) очакваните нормални сигнали са червен (R) и зелен (G) сигнал идентифициращи всяка една от хромозомите. При наличие на транслокация очакваните сигнали са два фузионни в жълт цвят, един зелен и един червен – 2F1R1G.

Със сондата за търсене на преустройства в региона 14q32 се търсят инверсии или транслокации. При наличие на такива очакваните сигнали са един физиуонен в жълт цвят, един зелен и един червен – 1F1R1G. Ко-локализирани червен/зелен или жълт сигнал е очаквания нормален резултат – 2F.

Микроскопиране: Флуоресцентните сигнали са визуализирани и заснети с помощта на дигитална софтуерна система AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 и флуоресцентен микроскоп Zeiss Axio Imager Z2 и Apotome 2.0 (Carl Zeiss Microscopy, NY, US)

3.3.2. Софтуерни, онлайн-базирани бази данни и статистически методи

3.3.2.1. Софтуерни програми

- **AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия):** софтуерна програма за обработка, анализ и документиране на цитогенетични и молекулярно-цитогенетични изследвания – рутинен кариотип и FISH.
- **AmScope 3.7 (AmScope, САЩ):** софтуерна програма за обработка, анализ и документиране на цитогенетични изследвания (рутинен кариотип).
- **Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016):** софтуерна програма с помощта на която се обработват цифрови данни. В настоящото проучване е използвана за създаване на диаграми,

графики, база данни, както и при статистическата обработка на данните от проучването.

- **GraphPad Prism v.8.3.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, California, САЩ):** софтуерна програма използвана за статистическа обработка на данни.

3.3.2.2. Статистически методи

- **Корелационен анализ:** използван е за оценка на зависимости между изследваните показатели. При тестването на хипотезите за влиянието на даден фактор е използван екзактният тест на Фишер (Fisher's exact test) и χ^2 на Pearson.
- **Вариационен анализ:** използван е за обработка и анализ на количествено измерими признаци. Критерия на Student (t-критерии) е приложен при сравняване на средни величини.
- **Анализ на преживяемостта:** за анализ на преживяемостта на пациентите е използван метода на Kaplan-Meier (Kaplan-Meier test).
- **Регресионен анализ:** използвани са метод на линейна регресия и трендови модел. Приложени са за изследване на конкретния механизъм на връзката между явленията, за моделиране на корелационни връзки, определяне формата на зависимостта, функцията на регресията и оценка на нейните параметри.
- При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост $p < 0,05$ при доверителен интервал 95 %.
- **Графичен анализ:** използван е за изобразяване на статистическите данни и за илюстриране на определени закономерности, и зависимости с помощта на Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016) и GraphPad Prism v.8.3.0.

3.3.2.3. **Онлайн базирани бази данни.**

- **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology:** онлайн журнал, енциклопедия и база данни за гени, цитогенетика и клинични данни за неопластични заболявания.

<http://atlasgeneticsoncology.org/BackpageAbout.html>

- **Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer:** онлайн база данни за хромозомни нарушения и генни фузии при неопластични заболявания.

<https://mitelmandatabase.isb-cgc.org/>

- **GeneCards®: The Human Gene Database (The Weizmann Institute of Science):** онлайн база данни за човешкия геном.

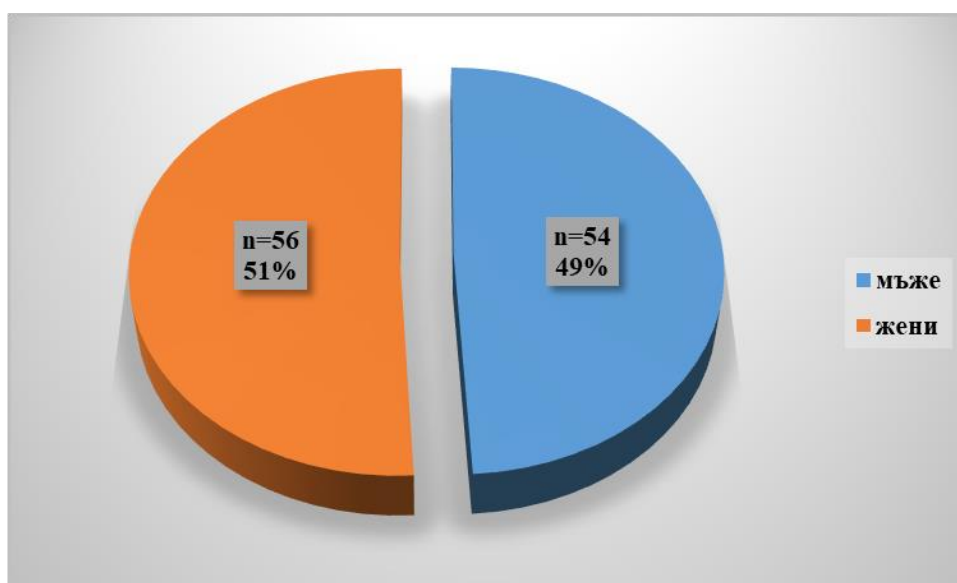
<https://www.genecards.org/>

IV. Резултати

4. Характеристика на пациентите по различни признаци

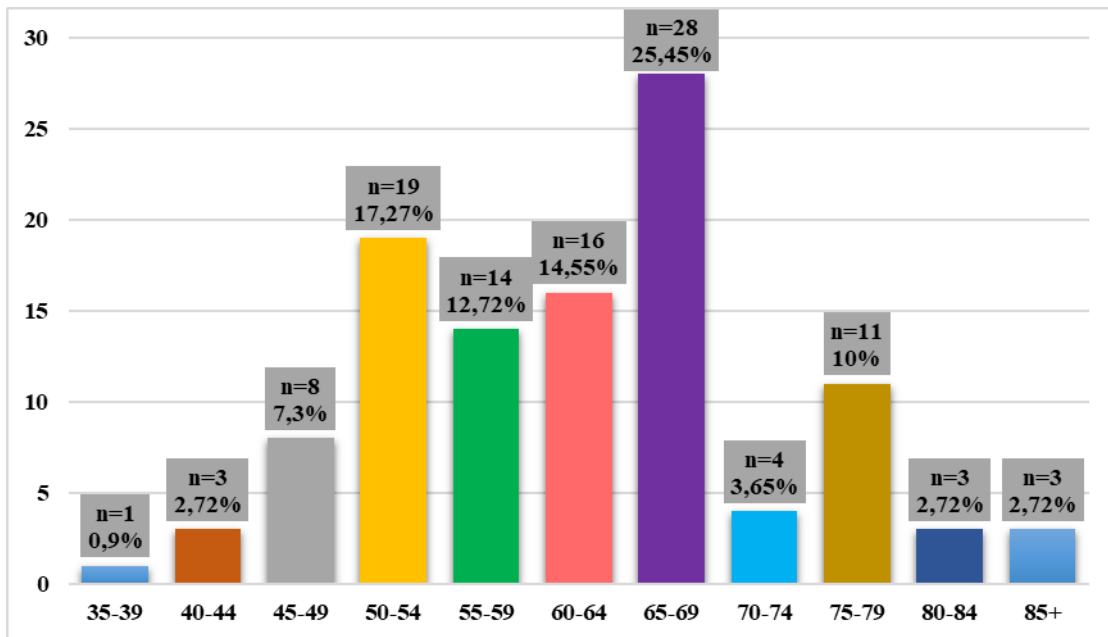
4.1. Възрастово-полова характеристика

В настоящото проучване са анализирани данните на 110 новодиагностицирани пациенти с ММ за периода 2016-2020. От тях, 54 (49,1%) са от мъжки пол и 56 (50,9%) от женски, като съотношението мъже:жени е 1:1,03 и е представено на *Фигура 23*.



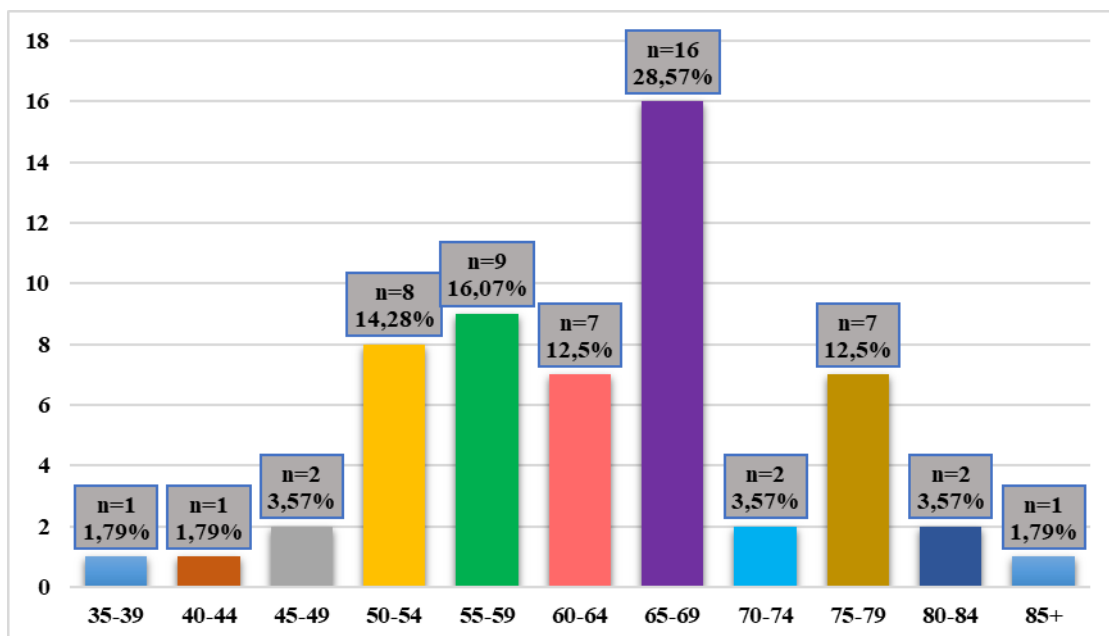
Фигура 23: Разпределение на пациентите с ММ по пол

Възрастовото разпределение е представено във *Фигура 24*. Най-младият пациент е жена на 39 години, а най-възрастният - мъж на 91 години. Най-голяма заболеваемост се отчита във възрастовата група 65-69 години (25,45%), като това се отнася и за двата пола. Средната възраст на изследваната група лица при поставяне на диагнозата е 62 години.



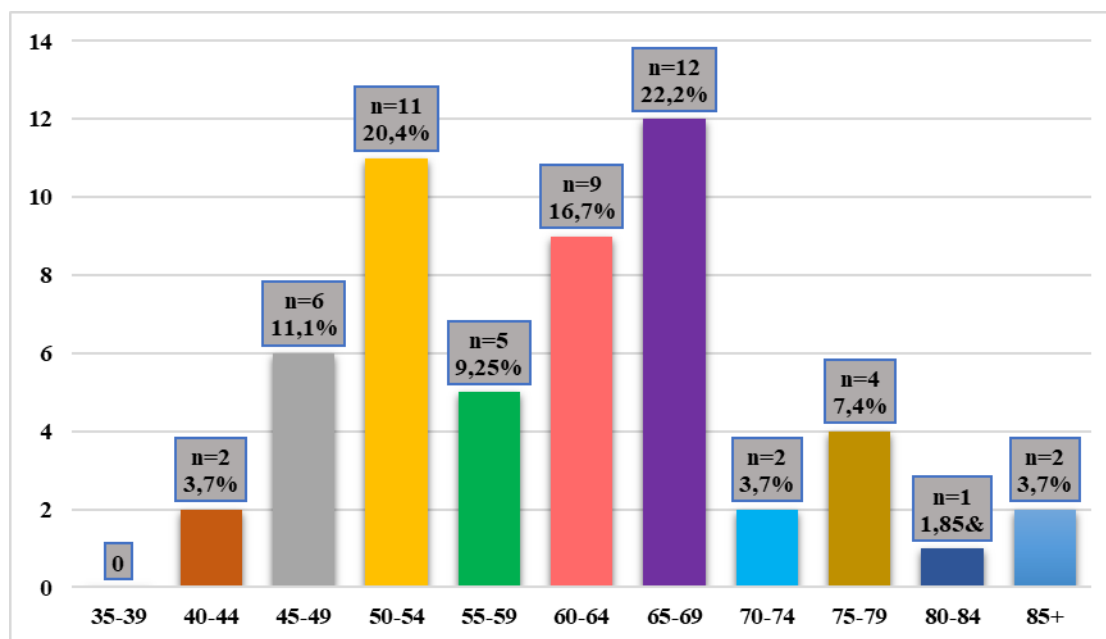
Фигура 24: Възрастово разпределение на пациентите с диагноза ММ

Възрастовото разпределение при жените показва най-голям брой пациенти (n=16) в групата 65-69 години (28,57%)(Фигура 25).



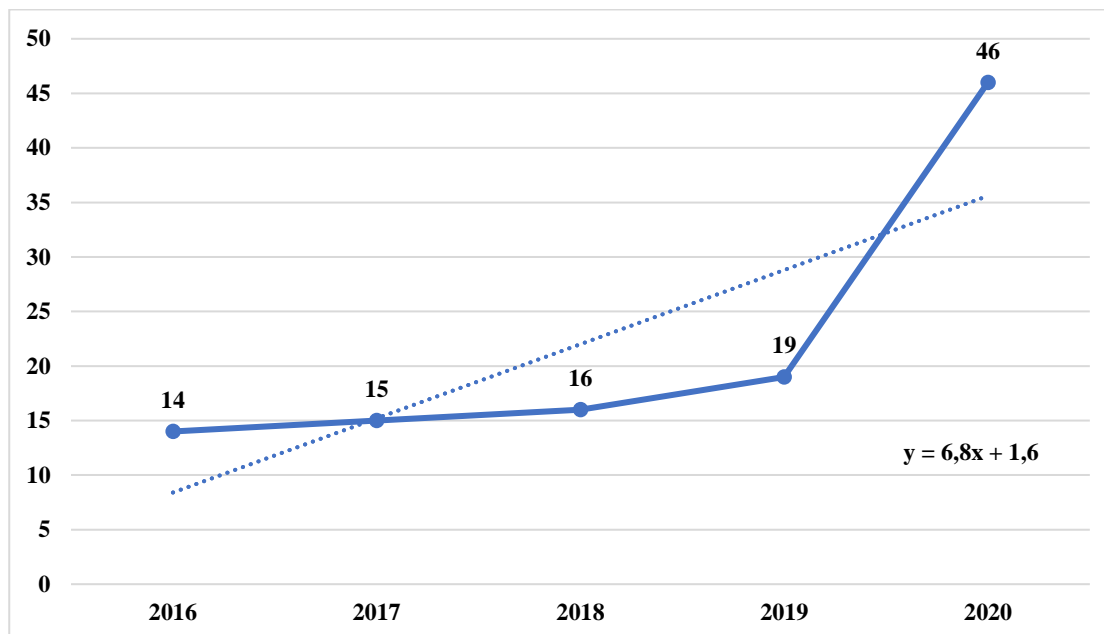
Фигура 25: Възрастово разпределение на пациентите от женски пол с диагноза ММ

Възрастовото разпределение при мъжете също показва като най-голяма група пациенти между 65-69 години (n=12, 22,2%) (Фигура 26)



Фигура 26: Възрастово разпределение на пациентите от мъжки пол с диагноза MM

Разпределението на изследваните пациенти през годините показва тенденция към увеличаването им с около 3,3 пъти. Средния темп на нарастване броя на изследваните лица е 5,82%, което се вижда и от представения трендовия модел (Фигура 27)



Фигура 27: Трендови модел на пациентите с ММ за периода на проучването 2016-2020

4.2. Характеристика на пациентите според стадия, клиничните и лабораторните данни

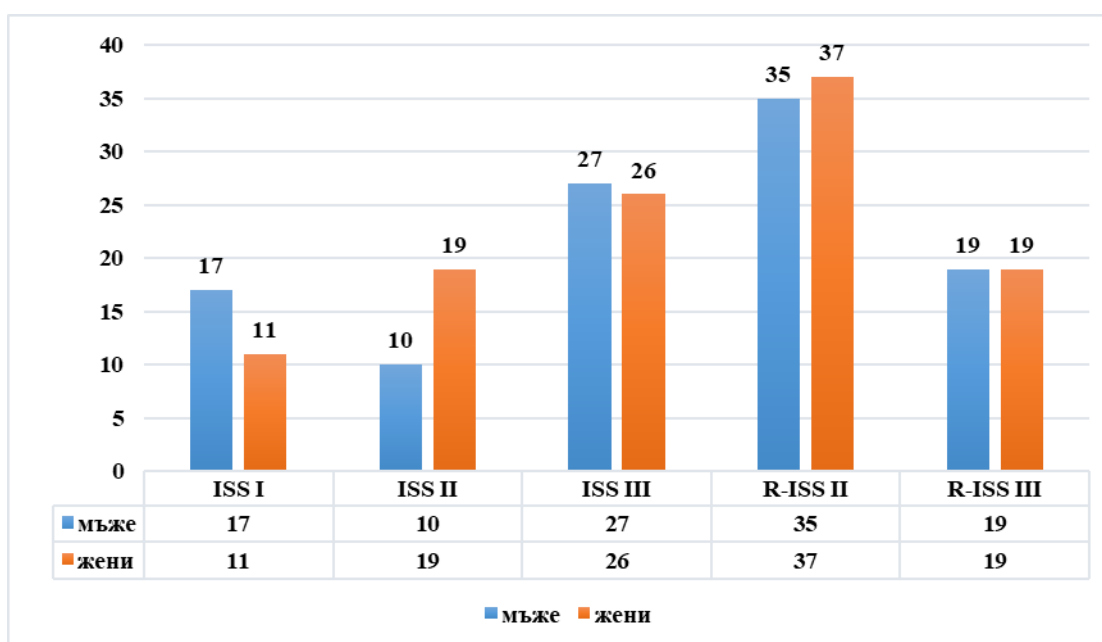
Въз основа на критериите на Международната стадираща система за множествен миелом (International Staging System, ISS) пациентите в настоящото проучване са разделени в три групи. Най-малко са били в първи стадий (ISS I) – 25,45% (n=28), следвани от втори (ISS II) 26,36% (n=29), а най-много в трети (ISS III) 48,19% (n=53)

Групирането на пациентите спрямо ревизираната стадираща система показва следното разпределение в първи стадий не попада нито един пациент, във втори са 72 (65,45%), а в трети 38 (34,55%) (Таблица 10).

Таблица 10: Разпределение на пациентите според ISS и R-ISS стадия.

	ISS I	ISS II	ISS III	Общо
Мъже	17	10	27	54
Жени	11	19	26	56
Общо	n=28 (25,45%)	n=29 (26,36%)	n=53 (48,19%)	n=110
	R-ISS I	R-ISS II	R-ISS III	Общо
Мъже	/	35	19	54
Жени		37	19	56
Общо		n= 72 (65,45%)	n=38 (34,55%)	n=110

Разпределението на пациентите по ISS стадий спрямо пола не показва статистически значима разлика (Chi-square тест, $\chi^2=4,063$, $p=0,13$), същото се отнася и при разпределението по R-ISS (Chi-square тест, $\chi^2=0,019$, $p=0,88$) (Фигура 28)



Фигура 28: Разпределение на пациентите с ММ според ISS и R-ISS стадия спрямо пола.

4.3. Конвенционални цитогенетични изследвания

4.3.1. Обща характеристика на пациентите

При поставяне на диагнозата ММ при 97 (88%) от пациентите е бил проведен конвенционален цитогенетичен анализ. Той е бил успешен при 83 (86%) от тях, а при 14 (18%) въпреки култивацията не са открити метафази за анализ.

4.3.1.1. Характеристика в зависимост от хромозомния набор

От 83 (86%) успешно проведени анализа кариотипа е бил нормален при 69 (83%), а при 14 (17%) аберантен.

В зависимост от хромозомния набор се установяват две групи пациенти с аберантен кариотип. Първата се състои от 5 пациента с хипердиплоиден кариотип (кариотип с ≥ 47 хромозоми), а втората група се състои от 8 пациенти с нехипердиплоиден кариотип (кариотип с ≤ 45 хромозоми). Отделно от тези групи при 1 пациент във всички метафази е открита делеция в 16 хромозома – del(16)(q21).

Таблица 11 : Пациенти с нормален кариотип (N) след проведен конвенционален цитогенетичен анализ

№	Възраст	Пол	ISS	Кариотип	FISH
1	62	М	3	46,XX[18]	-
2	54	М	1	46,XY[10]	-
3	53	М	3	46,XX,inv(9)(qh)[20]	-
4	47	М	1	46,XY[20]	-
5	68	Ж	2	46,XX[11]	-
6	56	Ж	2	46,XX[17]	-
7	59	Ж	3	46,XX[20]	-
8	68	Ж	3	46,XX[20]	-
9	45	М	1	46,XY[16]	-
10	58	Ж	3	46,XX[18]	-
11	64	М	3	46,XY[20]	14q32N
12	48	Ж	2	46,XX[18]	-

№	Възраст	Пол	ISS	Кариотип	FISH
13	50	Ж	1	46,XX[15]	-
14	76	Ж	1	46,XX[20]	14q32N
15	53	Ж	3	46,XX[18]	-
16	65	М	1	46,XY[20]	-
17	65	Ж	2	46,XX[18]	-
18	68	Ж	1	46,XX[13]	-
19	77	М	3	46,XY[20]	-
20	51	Ж	2	46,XX[20]	-
21	51	М	3	46,XY[20]	17pN 14q32N
22	61	Ж	1	46,XX[14]	-
23	66	М	1	46,XY[20]	-
24	68	М	2	46,XY[20]	-
25	72	М	3	46,XY[20]	-
26	62	М	3	46,XY[14]	-
27	57	Ж	3	46,XX[11]	-
28	53	Ж	2	46,XX[20]	17p- (27,4%)
29	64	М	1	46,XY[18]	-
30	66	М	3	46,XY[18]	-
31	77	Ж	1	46,XX[20]	-
32	67	Ж	2	46,XX[7]	-
33	65	Ж	2	46,XX[20]	14q32N
34	66	Ж	2	46,XX[8]	-
35	64	М	1	46,XY[20]	-
36	62	Ж	3	46,XX[18]	-
37	64	М	2	46,XY[13]	-
38	44	М	3	46,XY[20]	-
39	65	М	3	46,XY[10]	-
40	64	Ж	1	46,XX[20]	-
41	79	Ж	3	46,XX[18]	-
42	74	М	2	46,XY[9]	-
43	58	Ж	3	46,XX[20]	-
44	48	Ж	3	46,XX[17]	17p- (11,3%)
45	64	Ж	1	46,XX[20]	17pN, t(4;14)N, t(14;16)N
46	68	Ж	3	46,XX[17]	-
47	56	М	3	46,XY[20]	-
48	68	Ж	2	46,XX[20]	-

№	Възраст	Пол	ISS	Кариотип	FISH
49	56	Ж	1	46,XX[20]	17pN, t(4;14)N, t(14;16)N
50	67	Ж	1	46,XX[20]	-
51	66	Ж	1	46,XX[14]	-
52	66	Ж	3	46,XX[20]	-
53	86	Ж	3	46,XX[20]	17pN
54	53	М	1	46,XY[18]	-
55	59	Ж	3	46,XX[12]	-
56	75	Ж	3	46,XX[20]	-
57	54	М	1	46,XY[15]	-
58	65	М	3	46,XY[20]	17p- (14%), t(4;14)N, t(14;16)N
59	67	М	3	46,XY[20]	-
60	75	Ж	3	46,XY[20]	-
61	65	М	1	46,XY[20]	-
62	79	М	1	46,XY[10]	-
63	74	Ж	3	46,XX[20]	-
64	51	Ж	1	46,XX[18]	17pN, t(4;14)N, t(14;16)N
65	75	Ж	3	46,XX[14]	-
66	58	М	2	46,XY[18]	-
67	61	М	2	46,XY[20]	-
68	70	Ж	2	46,XX[16]	-
69	55	М	3	46,XY[18]	-

При пациентите с хипердиплоиден са открити тризомии по следните хромозоми – 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 14, 18, 19, 20, 21, 22, делеции – 1p13, 1p12, 5q13-33, 6q21, 8q23, 22q13, монозомия 8, транслокация t(11;14)(q13;q32) и други структурни нарушения. При втората група, която се състои от 9 пациента с нехипердиплоиден кариотип (≤ 45 хромозоми) са открити освен структурни нарушения, но и транслокации - t(11;14)(q13;q32) и t(1;11)(q31;q12). При един пациент е открита и делеция в 8 хромозома - del(8)(p21). Отделно от тези групи при един пациент е открита делеция в 16 хромозома – del(16)(q21) (Таблица 12).

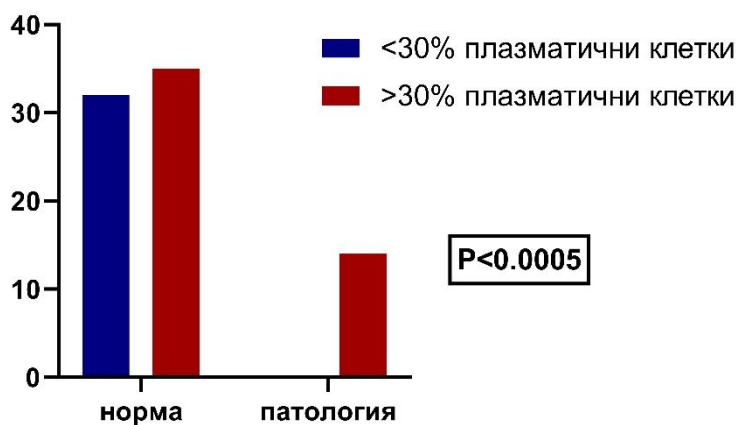
При 11 пациенти има данни за направен повторен ЦГ анализ няколко месеца след първия. Един от тях е проследяван три пъти, като след първоначалния нормален

резултат от ЦГ и открита делеция в 17 хромозома с FISH, следващите два са с хиподиплоиден кариотип. В този случай заболяването прогресира до плазмоклетъчна левкемия и летален изход.

Таблица 12: Пациенти с патологичен кариотип при проведен конвенционален цитогенетичен анализ

№	Въ	П	IS	Кариотип	FISH
1	53	Ж	3	46,XX,-1,-1,-C(?8),- C,i(10)(q10),+11,del(12)(p12),add(14)(q32),del(Dq),del(20)(q11),+4~ 5mar{cp15} [20]	-
2	80	Ж	2	47,XX,del(5)(q?15-q33),+21 [20]	-
3	57	Ж	2	46,XX,-1,-C(?12),+?der(11),t(1;11)(q21;q23),- D,+18,+F(20)[8]/46,XX[2]	-
4	66	Ж	2	45,XX,-11[2]/46,XX,-11,+16[13]/46,XX[5]	-
5	57	М	3	45,XY,t(11;14)(q?13;q32),-D(?13),-D(?14),+mar[9]/46,XY[1]	-
6	69	М	3	55~56,XY,del(1)(p13),+1,+3,+5,+6,+del(6)(q21),+9,+i(?9)(q10),+10,+ 14,+19,+mar{cp8}/46,XY[12]	-
7	49	М	3	46,XY,del(16)(q21)[5]/46,XY[15]	-
8	47	М	2	47,XY,+1,del(8)(q23),- 8,t(11;14)(q13;q32),del(22)(q13),+22[2]/46,XY[18]	17pN t(4;14)N t(14;16)N
9	91	М	3	45,X,-Y[6]/46,XY[14]	-
10	81	Ж	3	59,XX,+3,+B,+B,+C,+C,+C,+D,+F,+F,+G,+3mar[2]/46,XX[18]	-
11	61	М	3	45~46,XY,-2,-C,-C,del(11)(q22),add(Dq),+3mar[10]/46,XY[3]	17p- (57,8%) t(4;14)N t(14;16)N
12	68	М	3	53~60,XY,del(1)(p12),+2,+3,+5,+9,+C,+18,+19,+20,+21,+22,+2~3m ar{cp3}/46,XY[9]	-
13	86	М	3	45,X,-Y[14]/46,XY[6]	-
14	66	М	3	44,X,-Y,+der(1),t(1;11)(q31;q12),-4,add(7)(q?36),-7,del(8)(p21),- ?13,+mar[5]/46,XY[15]	-

При всички пациенти е извършена и аспирационна биопсия на костен мозък (миелограма). Както беше отбелязано при 69 пациенти кариотипа е бил нормален, при 35 (51%) от тях процента плазматични клетки в КМ е надхвърлял 30%, при 32 (46%) е бил по-малко от 30%, а при двама (3%) стерналната пункция е била суха. При всички 14 пациенти с патологичен кариотип броя плазматични клетки в КМ е надхвърлял 30%. При сравнителна оценка на двете групи пациенти открихме статистически значима разлика между тези с нормален и с патологичен кариотип, и процента плазматични клетки открити в КМ $p < 0,0005$ ($p < 0,05$, екзактен тест на Fisher) (Фигура 29).



Фигура 29: Количество плазматични клетки при пациенти с нормален и патологичен кариотип (екзактен тест на Fisher).

4.3.1.2. Характеристика в зависимост от броя на откритите аномалии в кариотипа

По отношение на броя аномалии открити в кариотипите пациентите могат да бъдат разделени и по следния начин: с комплексен кариотип и такива с единична аномалия. При 69 (83%) успешно проведен анализа, кариотипа е бил нормален, а

при 14 (17%) патологичен. При така направената класификация при пет пациента се установява единична аномалия, а при девет комплексен кариотип.

Някой от кариотипите са представени в раздел Приложения.

4.4. Молекулярно-цитогенетични изследвания

4.4.1. Обща характеристика на пациентите

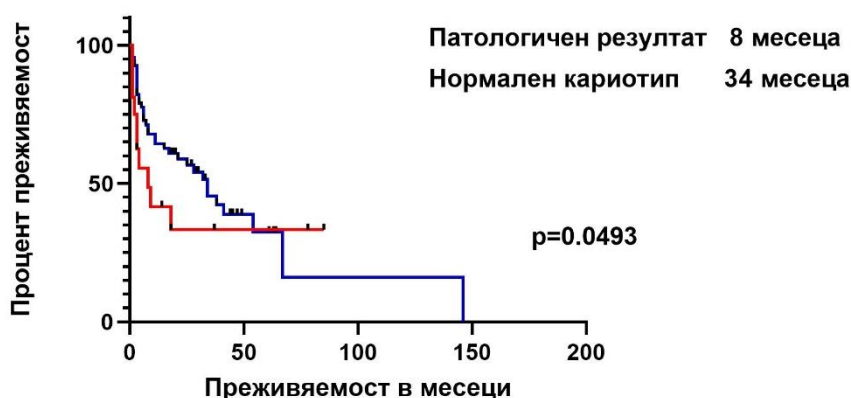
С FISH са анализирани успешно общо 30 пациенти, комбинацията ЦГ и FISH е била приложена при 17 (57%) от тях, а останалите 13 (43%) са анализирани само с FISH. При 9 пациента е проведен FISH само за търсене на делеция в 17 хромозома – del(17)(p13), при 6 (67%) е открита делеция, а при останалите 3 (33%) резултата е нормален. FISH за търсене само на преустройство в IGH гена в района 14q32 е проведен при 6 пациента, резултата е нормален при всички. При 15 пациента са приложени последователно в различни анализи три сонди: за търсене на делеция в 17 хромозома – del(17)(p13), транслокациите t(4;14) и t(14;16). При 3 от тях (20%) е открита del(17)(p13), а транслокации не са установени.

При един от пациентите, при който са проведени ЦГ и FISH, се установява комплексен кариотип чрез ЦГ и делеция в 17 хромозома чрез FISH. При същия пациент са използвани и транслокационни сонди – t(4;14) и t(14;16), резултатът от които е бил нормален. При друг пациент, при който е установен хипердиплоиден кариотип чрез ЦГ, FISH анализа за търсене на делеция в 17 хромозома и транслокационните сонди – t(4;14) и t(14;16), показва нормален резултат.

4.4.2. Оценка на откритите хромозомни нарушения по отношение на общата преживяемост

Установената средна преживяемост спрямо пола при мъжете е 41 месеца, а при жените 28 месеца ($p=0,15$, екзактен тест на Fisher)).

Установява се статистически значима разлика по отношение на средната преживяемост спрямо цитогенетичната находка, при пациентите с нормален кариотип тя е 34 месеца, а при тези с патологичен – 8 месеца (Фигура 30) ($p=0,0493$, екзактен тест на Fisher).

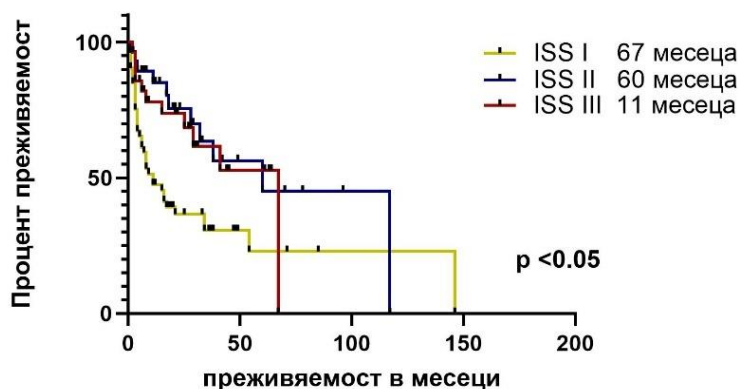


Фигура 30. Крива на преживяемостта по Каплан-Майер при пациенти с нормален и патологичен кариотип.

Не се установява статистически значима разлика в средната преживяемост между пациентите с хипердиплоиден и нехипердиплоиден кариотип вероятно поради малкия брой пациенти ($p=0,63$). Същото се отнася и за откритите хромозомни нарушения по ISS стадий ($p=0,094$).

Статистически значима разлика се установява в преживяемостта спрямо ISS стадия ($p<0,05$) (Фигура 31). Данните от анализа показват средна преживяемост от 11 месеца при пациентите в трети стадий. При тези във втори стадий тя е средно 60

месеца, а в първи – 67 месеца. Както е видно най-кратка е преживяемостта в трети стадий, а най-продължителна в първи.



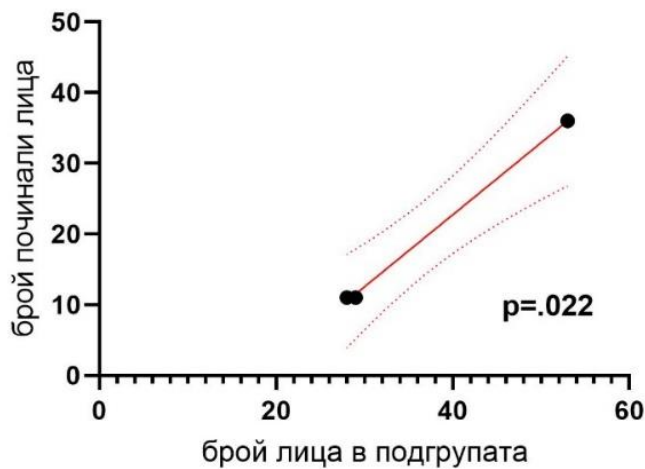
Фигура 31. Крива на преживяемостта по Kaplan-Meier при пациенти в различен ISS стадий.

Не се откри статистически значима разлика в преживяемостта спрямо R-ISS стадия ($p=0,14$). Средната преживяемост на пациентите във втори стадий по R-ISS е 41 месеца, а в трети – 18 месеца.

При започването на настоящия анализ 52,7% от пациентите са починали, а смъртността по клиничен стадий е както следва:

- ISS I: 39,29%
- ISS II: 37,93%
- ISS III: 67,92%

Както се вижда тя е най-голяма в трети стадий, а най-малка във втори. Чрез проведен регресионен анализ (линейна регресия) се установи статистическа значимост по отношение на смъртността на пациентите в различните ISS стадии ($p= 0,022$) (Фигура 32)



Фигура 32: Регресионен анализ по отношение на смъртността на пациентите

Обобщените данни за хромозомните нарушения установени чрез ЦГ и FISH при пациентите в различните стадии по ISS са както следва: в първи стадии има един пациент с патологичен кариотип ($n=1$, 3,6%), във втори 7 ($n=7$, 24,1%), а в трети 15 ($n=15$, 28,3%). При проведен анализ се установи статистически значима разлика между тези пациенти (Chi-square тест, $\chi^2=7,024$, $p=0,0298$). Данните за хромозомните нарушения установени чрез FISH при пациентите групирани по R-ISS също показват статистически значима разлика $p=0,0077$ (екзактен тест на Fisher). При тази класификация в R-ISS II има двама пациента с патологичен кариотип ($n=2$, 2,8%), а в R-ISS III – 7 ($n=7$, 18,4%).

V. Обсъждане

Множественият миелом (ММ) е неопластично заболяване, което се характеризира с клонална пролиферация на плазматични клетки. В резултат на това се наблюдава акумулацията им в костния мозък, водеща до анемия и цитопения, хипогамаглобулинемия, остеолитични лезии, хиперкалциемия и бъбречна недостатъчност. Свръхпродукцията на моноклонален протеин, т.нар. М-протеин води до бъбречна увреда в резултат на протеинурия или хипервискозитет. ММ е 1% от всички неоплазии и близо 10% от хематологичните ^{27,28}.

По литературни данни повечето от пациентите с ММ се диагностицират между 65-74 години, със средна възраст на изява около 69 години. При ретроспективно проучване сред 1027 новодиагностицирани пациенти с ММ, Robert A. Kyle и колеги, установяват средна възраст на изява от 66 години, като 59% от тях са мъже, общо 38% над 70 годишна възраст ⁶⁰. Проучване сред 1830 пациенти, проведено от екипа на Fiona M. Ross установява средна възраст на изява от 65 години, като 21% са на възраст над 75 години⁶. Друго ретроспективно проучване представено от Ji-Hun Lim сред 525 новодиагностицирани пациенти средната възраст на изява е 63,3 години¹⁸⁵. Сред 242 пациенти във Франция, Benjamin Hebraud и колеги, описват средна възраст на изява от 59,6 години⁸⁵. Ретроспективно проучване проведено отново във Франция от Nicole Veronique Smadja и сътрудници сред 208 пациенти, средната възраст при диагностициране е 64 години¹⁰⁹. Между 2001 и 2005 година при мащабно проучване на 861 пациенти от Matthew W. Jenner и колеги в Обединеното кралство се установява средна възраст на изява от 65 години, като 19% са на над 75 годишна възраст¹⁸⁶. Резултатите от друго проучване проведено в Испания сред 86 пациенти от Norma с. Gutiérrez, средната възраст при поставяне на диагнозата ММ е 69 години¹⁸⁷. Данни от ретроспективно проучване в Бразилия проведено от P. Segges и колеги сред 152 новодиагностицирани пациенти установяват средна възраст на изява от 55 години, като 12,7% на възраст над 70 години¹⁸⁸. При проучване проведено на 170 пациента, от Sang-Yong Shin и колеги между 2001 и 2015г средната възраст на поставяне на диагноза е 64 години¹⁸⁹. Нашият анализ установи сходни резултати, като най-голяма заболяемост се отчита между 65-69 години (25,45%), със средна възраст на изява от 62 години. Преобладаващите пациенти са на над 60 годишна възраст (59,1%, n=65),

а тези на възраст над 70 представляват 19,1% (n=21). Всички проучвания показват леко преваляване на пациентите от мъжки пол, което се наблюдава и при нас. Съотношението мъже:жени в нашето проучване е 1:1,03

Хромозомните нарушения, които се откриват при ММ обикновено са комплексни и се характеризират с бройни и структурни аномалии⁵⁷. Цитогенетичните нарушения при ММ биват първични и вторични. Те често са комплексни с наличие на бройни и структурни аберации. Повечето от първичните са или транслокации, или тризомии, и включват превключване на тежките вериги на имуноглобулините в локус 14q32¹⁰⁶. Най-често срещаната транслокация при множествен миелом е t(11;14)(q13.3;q32.33), в повечето случаи е балансирана и се свързва с добра прогноза^{83,108}. Втората по честота е реципрочната транслокация t(4;14)(p16.3;q32.3), тя е неустановима с конвенционална ЦГ заради теломерното разположение на счупванията на хромозомите. Наличието ѝ се счита за лош прогностичен белег^{15,190}. Една от най-рядко срещаните, но с важно клинично значение и неблагоприятна прогноза е транслокацията t(14;16)(q32.3;q23)^{86,101}.

Вторичните хромозомни нарушения включват МУС транслокации, монозомии и делеции. Честотата им има тенденция да се увеличава при прехода от моноклонална гамопатия с неясно значение до тлеещ или множествен миелом⁵⁷. Към тях спадат загубата на късо рамо на 1 хромозома del(1p), амплификацията на дълго рамо на 1 хромозома amp(1q) – наличие на 4 или повече копия, gain (1q) - допълнителни до 3 копия на дълго рамо, делеция на дълго рамо на 13 хромозома - del(13q) и загуба на късо рамо на 17 хромозома del(17p)^{121,136,191}. Аберациите по 17 хромозома засягат ключовия в патогенезата на ММ ген TP53. Те могат да бъдат или делеция/мутация само на единия алел, или и на двата едновременно, т.нар. биалелна инактивация. Пациентите с биалелна инактивация имат по-агресивно протичане и съответно лоша прогноза^{102,139,192}.

Chumyong Seong и колеги при проучване направено между 1984 и 1995, са анализирали 79 новодиагностицирани пациенти с ЦГ анализ, като при 46% е установен кариотип с хромозомни нарушения. В 63% той е хипердиплоиден, а най-често срещаните тризомии са по хромозоми 9, 15, 19 и 21¹⁹³. При проучване от 1985г. на 100 пациенти, при които е проведен конвенционален цитогенетичен анализ от Gordon W. Dewald, при 36% е установен абнормен кариотип¹⁹⁴. Между 1990 и 1994г.,

Jean Luc Lai и колектив, публикуват данните от проведен ЦГ анализ на 117 новодиагностицирани пациенти, като при 47% е установена патология¹⁹⁵. Проучване направено през 1997г. от Maria J. Calasanz сред 280 пациенти при 33% е установен абнормен кариотип. При 46% от тях е установен хипердиплоиден кариотип, а най-често срещаните тризомии са по хромозоми 3, 5, 7, 9, 11, 15 и 21¹⁹⁶. Между 1994 и 1999г. N.V. Smadja и колектив при ЦГ изследване на 138 пациенти с ММ установяват хромозомни нарушения в 66% от тях. С хипердиплоиден кариотип са 54%, а с хиподиплоиден 46%. При пациентите с хипердиплоиден кариотип преобладават тризомиите по хромозоми 9, 19, 15, 5, 11, 3, и 7, а при групата с хиподиплоиден кариотип преобладават структурните нарушения¹⁰⁹. През 1995 г. Jeffrey R. Sawyer и колеги провеждат ЦГ анализ на 200 пациенти, като установяват хромозомни нарушения при 32% от тях. Най-често срещаните бройни аберации са тризомиите по хромозоми 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 и 21, а най-честите монозомии – 13 и 16. Структурни нарушения по хромозома 1 са описани в 48% от пациентите¹⁹⁷. През същата година в Япония, K. Suzuki анализира 25 пациента с ЦГ анализ, като установява патология в 20% от тях¹⁹⁸. При проучване проведено в Испания от Maria Calasanz и колектив през 1996г. сред 280 пациенти, процента на откритите абнормни кариотипи е 31%. Повечето с хипердиплоиден, а най-малко с хиподиплоиден кариотип¹⁹⁶. През 2000г. при проучване проведено също в Испания от Norma C. Gutiérrez и колеги сред 86 пациенти с проведен ЦГ анализ, при 43% се установява хипердиплоиден кариотип, като най-често срещани са тризомиите по хромозоми 3, 5, 9, 11, 15, 19, 22, 1, 7, 17, 18 и 21¹⁸⁷. Данни от ЦГ анализ на 170 пациента, проведен от Sang-Yong Shin и колеги между 2001 и 2015г., показват хромозомни нарушения при 31,1%. Тук с най-голям процент са пациентите с хиподиплоиден кариотип, следвани от хипердиплоиден и псевдодиплоиден. Най-честите монозомии са по хромозоми 13,14,16 и 22, освен това при някои от пациентите се установява загуба на X или Y хромозома¹⁸⁹. През 2011г. проучване в Аржентина проведено от F. Stella и колектив сред 50 пациенти с ММ, патологичен резултат от ЦГ анализ е установен при 26%¹⁹⁹. При ретроспективно проучване от 2013г. представено от Ji-Hun Lim сред 525 новодиагностицирани пациенти, абнормен кариотип е установен при 42,3%. И тук най-голяма е групата с хипердиплоидия, най-малка с хиподиплоидия, а делецията по хромозома 13 е най-честото открито нарушение¹⁸⁵. През 2013г. Dong Wook Jekarl представя резултати на 130 пациенти с проведен ЦГ анализ, като при 42,3% кариотипа е абнормен¹⁰¹.

Проучване на 41 пациента с ММ, Ji Won Lee и колеги установяват хромозомни нарушения при 39% от случаите²⁰⁰.

Нашето проучването показва наличие на абнормен кариотип при 20% от пациентите при поставяне на диагнозата ММ, стойност подобна на описаните в литературата данни вариращи от 18% до близо 66%. В нашия анализ прави впечатление, че при пациентите с хипердиплоиден кариотип преобладават тризомиите, докато при тези с нехипердиплоиден - структурните нарушения. Резултати подобни на описаните в литературата проучвания. Подобно на други данни и при нашето най-често откриваните нарушения са тризомиите. При един пациент е открита делеция в 8 хромозома - del(8)(p21), за която има данни, че е причина за резистентност към лечението с протеазомния инхибитор Bortezomib (Velcade)²⁰¹. Вида на откритите нарушения корелира с тези описани в литературата, с изключение на откритата делеция del(8)(q23), за която не бяха открити данни^{82,196,194,197}. При друг пациент е открита делеция в 16 хромозома (del(16)(q21)), което се счита за лош прогностичен белег⁸⁷.

Установено е, че бройните нарушения са с прогностично значение, като нехипердиплоидията е с по-лоша прогноза от хипердиплоидията^{79,107}. Проучването на Chumyong Seong и колеги, при което са анализирани 79 новодиагностицирани пациенти с ЦГ анализ, с най-лоша средна преживяемост от 14 месеца са тези с нехипердиплоиден кариотип¹⁹³. През 2003г. при мащабно проучване на C. S .Debes-Magun и колеги, при което са анализирани цитогенетичните находки на 254 пациента с абнормен кариотип е установена обща преживяемост на групата от 23,4 месеца. Най-лоша преживяемост е отчетена в групата с нехипердиплоиден кариотип, а най-добра в групата с псевдодиплоиден²⁰². През 2000 г. N. V. Smadja установяват обща преживяемост от 30,6 месеца при 159 пациенти, като най-лоша е отчетена при тези с нехипердиплоиден кариотип – 12,5 месеца¹⁰⁹. В нашето проучване не се отчита статистически значима разлика в средната преживяемост между пациентите с хипердиплоиден и нехипердиплоиден кариотип ($p=0,3042$), вероятно поради малкия брой на анализиранията група.

При мащабно проучване проведено през 2004 година обхващащо 10750 пациента за периода 1981-2002 се установява най-малка преживяемост сред пациентите в трети стадий по ISS, а най-продължителна в първи⁶⁹. При

ретроспективно проучване сред 1181 новодиагностицирани пациенти с ММ за периода 2005-2015, M. Binder и колеги установяват най-малка преживяемост сред пациентите в трети стадий по ISS, а най-продължителна в първи¹¹¹. В нашето проучване се наблюдава закономерност по отношение на смъртните случаи по стадий. Това се потвърди чрез провеждането на регресионен анализ (линейна регресия), при което се установи статическа значимост ($p=0,022$), водеща до извода, че във всеки следващ стадий нараства и смъртността. Както и при други проучвания, така и при нашето с най-малка преживяемост са пациентите в трети стадий по ISS, а с най-продължителна в първи.

Установяването на ЦГ нарушения при пациенти с ММ е лимитирано поради ниския митотичен индекс на миеломните клетки. Влияние оказва и процента плазмоцити откриващи се в КМ. Въпреки това откриването на абнормни метафази се счита за лош прогностичен белег. Поради ниската информативна стойност на конвенционалната цитогенетика предпочитам метод за анализ е FISH анализа. За постигане на максималната му ефективност се препоръчва плазмоцитите да са CD138-селектирани или маркирани за леки вериги на имуноглобулини, а анализът да е направен на минимум 100 плазмоцита. Много проучвания сочат, че използването на Microarray анализ върху белязани плазмоцити е възможно да открие нарушения в 95% от изследваните проби. В повечето случаи са открити повече от 20 нарушения като биалелни загуби, загуба на хетерозиготност (CN-LOH), наличие на допълнителен генетичен материал или загуба на такъв, особено на места „неуловими“ от FISH анализа. Нещо повече, геномни нарушения като хромотрипсис и хромоанасинтезис, и свързаната с тях загуба на хетерозиготност могат да бъдат установени само с Microarray анализ^{203,204,205}. Друг метод, който също може да се използва в подпомагането на диагностиката е полимеразно-верижната реакция (PCR)^{90,147,206}.

VI. Заключение

Установяването и разбирането на цитогенетичните находки при ММ е от изключително значение при избора на терапевтична схема. Чрез използването на ЦГ анализ и FISH през годините се въведоха различни прогностични маркери за рисковата стратификация на ММ. Разделянето на пациентите на високорискови, интермедиерни и със стандартен риск става въз основа предимно на генетични маркери, като това лежи основата за избор на оптимална терапия. Въз основа на откритите данни може да се смята, че бройните и структурни хромозомни нарушения вероятно са важен прогностичен фактор, особено в комбинация с някои от лабораторните. Наличието на нехипердиплоиден кариотип, в това число хиподиплоиден, псевдодиплоиден, хипотриплоиден се счита за лош прогностичен белег, за разлика от стандартния риск при хипердиплоидия.

Установените нарушения дори и при малкия брой пациенти в нашето проучване показва определящо значение за терапията и хода на заболяването, което потвърждава необходимостта от ЦГ анализ и по възможност комбинирането му с FISH за повишаване на изчерпателността на генетичната оценка.

VII. Изводи

1. Приложеният сравнителен анализ на честотата и структурата на хромозомните нарушения при новодиагностицирани пациенти с ММ показва голямо съответствие на данните от нашето проучване с тези описани в литературата.
2. Честотата на откритите хромозомни аберации установени чрез конвенционална ЦГ е 17% (n=14), като те са разделени на хипердиплоидни и нехипердиплоидни. Честотата за открита патология чрез FISH анализ е 30% (n=9).
3. Оценката на откритите хромозомни нарушения чрез ЦГ:
 - При пациентите с хипердиплоиден кариотип преобладават тризомиите
 - При пациентите с нехипердиплоиден кариотип преобладават структурните нарушения
4. Оценката на откритите хромозомни нарушения чрез FISH анализ
 - Чрез FISH анализ при 9 пациента (30%) е открита делеция в 17 хромозома – del(17)(p13), при останалите резултата в бил нормален.
 -
5. Установена е зависимост между количеството плазматични клетки в аспирационна биопсия на КМ и патологичните кариотипи:
 - При всички пациенти (n=14) с патологичен кариотип броя плазматични клетки е надхвърлял 30%.
 - При пациентите с нормален кариотип при 51% (n=35) процента плазматични клетки в КМ е надхвърлял 30%, при 32 (46%) е бил по-малко от 30%, а при двама (3%) стерналната пункция е била суха.

6. Установява се статистически значима разлика по отношение на средната преживяемост спрямо цитогенетичната находка, при пациентите с нормален кариотип тя е 34 месеца, а при тези с патологичен – 8 месеца ($p=0,0493$).
- Не се установява статистически значима разлика в средната преживяемост между пациентите с хипердиплоиден и нехипердиплоиден кариотип вероятно поради малкия брой пациенти ($p=0,63$). Същото се отнася и за откритите хромозомни нарушения по ISS стадий ($p=0,094$).
7. Статистически значима разлика се установява в преживяемостта спрямо ISS стадия ($p<0,05$) Данните от анализа показват средна преживяемост от 11 месеца при пациентите в трети стадий. При тези във втори стадий тя е средно 60 месеца, а в първи – 67 месеца.
- Не се откри статистически значима разлика в преживяемостта спрямо R-ISS стадия ($p=0,14$). Средната преживяемост на пациентите във втори стадии по R-ISS е 41 месеца, а в трети – 18 месеца.

VIII. Приноси

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е значението на системите за класификация и рискова стратификация като прогностични фактори
2. Потвърдено е значението от приложението на конвенционален цитогенетичен метод и FISH анализ като рутинни методи с цел разграничаване на ниско и високо рискови пациенти с ММ
3. Потвърдено е значението на хромозомните нарушения като прогностичен фактор за преживяемостта в българската популация

Приноси с приложен характер

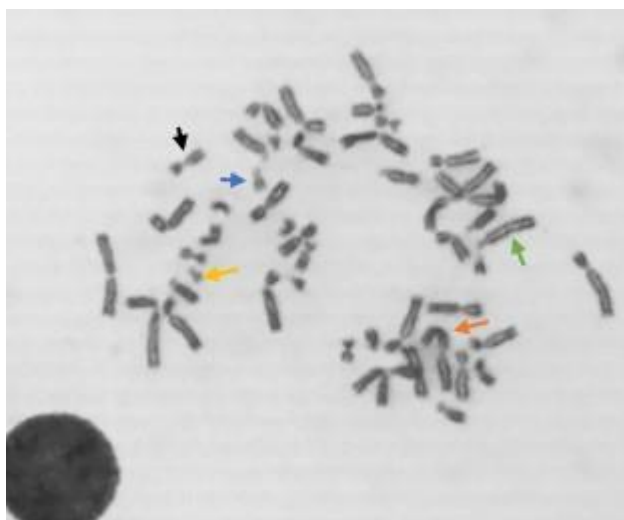
1. При всички новодиагностицирани пациент с ММ се препоръчва провеждане на ЦГ и FISH, които са от изключително значение при избора на терапевтична схема, а също и за прогнозата.
2. Насочването за изследване на t(4;14) и del(17p), които са с неблагоприятна прогноза при новодиагностицирани пациенти с ММ, се препоръчва като задължителен елемент от диагностичния панел изследвания.
3. Препоръчително е анализа за t(4;14) и del(17p13) да се провежда чрез FISH.

IX. Приложения

Представяне на някои от кариограмите описани в настоящия дисертационен труд*.

➤ 47,XY,+1,del(8)(q23),-8,t(11;14)(q13;q32),del(22)(q13),+22[2]/46,XY[18]

Хипердиплоиден кариотип установен при мъж на 47 години.



Фигура 33: Кариограма

47,XY,+1,del(8)(q23),-8,t(11;14)(q13;q32),del(22)(q13),+22[2]/46,XY[18]

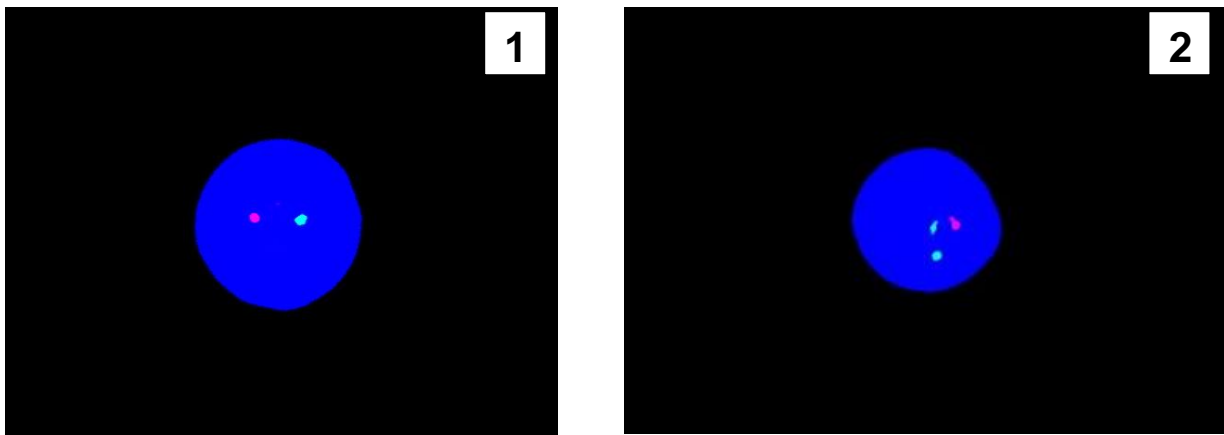
➤ 45~46,XY,-2,-C,-C,del(11)(q22),add(Dq),+3mar[10]/46,XY[3]

Нехипердиплоиден кариотип установен при мъж на 61 години.



Фигура 34. Кариограма 45~46,XY,-2,-C,-C,del(11)(q22),add(Dq),+3mar[10]/46,XY[3]

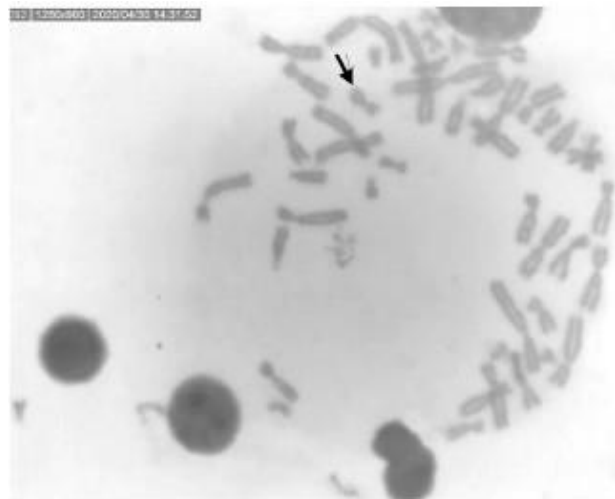
При същия пациент е проведен и FISH анализ, при който се установява делеция по 17 хромозома в 57,8% от анализираниите интерфазни ядра.



Фигура 35: Снимки на интерфазни ядра илюстриращи пълна монозомия на снимка 1 и делеция на 17 хромозома на снимка 2.

➤ $46,XY,del(16)(q21)[5]/46,XY[15]$

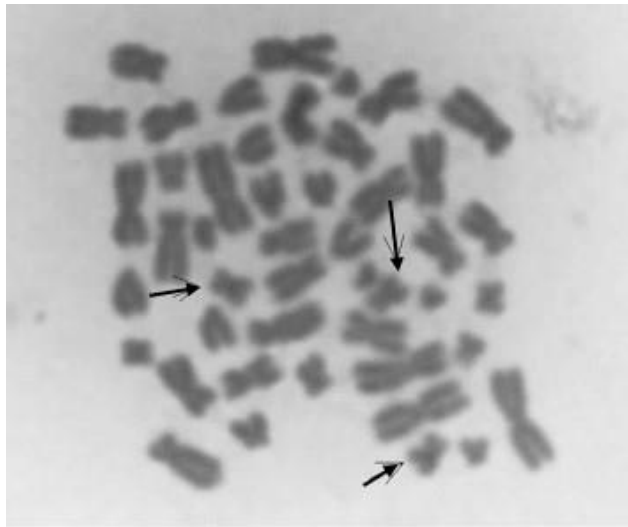
→
Кариотип с делеция в 16 хромозома при мъж на 49 години



Фигура 36: Кариограма $46,XY,del(16)(q21)[5]/46,XY[15]$

➤ 45,XX,-11[2]/46,XX,-11,+16[13]/46,XX[5]

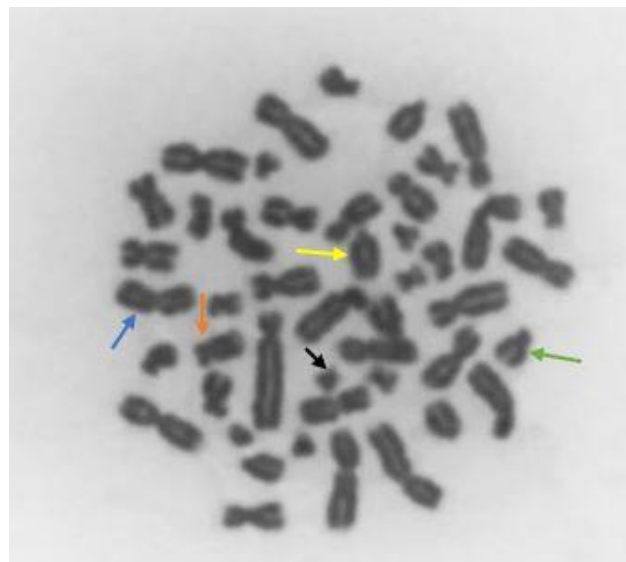
Нехипердиплоиден кариотип установен при жена на 66 години



Фигура 37: Кариограма 45,XX,-11[2]/46,XX,-11,+16[13]/46,XX[5]

46,XX,-1,-1,-C(?8),-C,i(10)(q10),+11,del(12)(p12),add(14)(q32),del(Dq),del(20)(q11),+4~5mar{cp15} [20]

Нехипердиплоиден кариотип установен при жена на 66 години

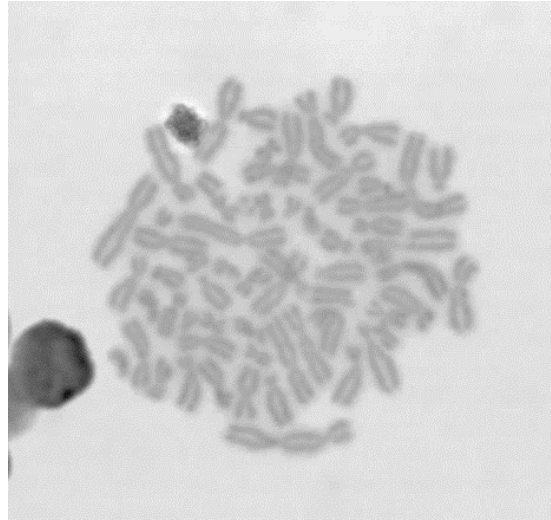


Фигура 38: Кариограма:

46,XX,-1,-1,-C(?8),-C,i(10)(q10),+11,del(12)(p12),add(14)(q32),del(Dq),del(20)(q11),+4~5mar{cp15} [20]

➤ 55~56,XY,del(1)(p13),+1,+3,+5,+6,+del(6)(q21),+9,+i(?9)(q10),+10,+14,+19,+mar{cp8}/46,XY[12]

Нехипердиплоиден кариотип установен при мъж на 69 години



Фигура 39: Кариограма

55~56,XY,del(1)(p13),+1,+3,+5,+6,+del(6)(q21),+9,+i(?9)(q10),+10,+14,+19,+mar{cp8}/46,XY[12]

*Снимковият материал е предоставен от Лаборатория по Медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Марина“, Варна.

Х. Научни публикации и участия по темата на дисертационния труд

Научни публикации в пълен текст по темата на дисертационния труд

1. **V. Miteva**, С. Ruseva, Т. Chervenkov, I. Micheva. Cytogenetic findings in 126 patients with Multiple Myeloma – a retrospective single-centre study. *Archives of Hellenic medicine* 2023:40(3):349–355.
2. Dinnar Yahya, **Valentina Miteva**, Iilina Micheva, Tsanka Ruseva, Lyudmila Angelova. Cytogenetic analysis of patients with hematological malignancies. *Cytology and Genetics*, 2023:57(3):272-281.
3. Хачмериян М., М.Левкова, М.Стоянова, **В.Митева**, Л.Ангелова. Предизвикателства на медико-генетичната консултация в ерата на геномната медицина. *Обща медицина* 2019:21(6):37-40.
4. **Митева В.**, Хачмериян М., Червенков Т., Мичева И..Цитогенетични аберации при пациенти с множествен миелом. *Медицински преглед*, 2021:57(5):28-35.
5. **Митева В.**, Русева Ц., Червенков Т., Мичева И. Хромозомни нарушения и тяхното предиктивно значение при пациенти с множествен миелом. *Медицински преглед* 2022:58(1):38-43.

Научни съобщения по темата на дисертационния труд

1. R. Lukanov, S. Dimitrova, **V. Miteva**, I. Micheva. Conventional cytogenetic analysis in patients with multiple myeloma-single center study. Abstract Book HemaSphere, 2021:5:S2:p.797
2. **Miteva**, Т. Ruseva, М. Hachmeriyan, М. Levkova, L. Angelova; A retrospective study of patients with Multiple Myeloma tested in Laboratory of Medical genetics, Varna, Bulgaria; *European Journal of Human Genetics*,2020:28(SUPPL 1):940-941.

XI. Библиография

1. van de Donk NWCJ, Mutis T, Poddighe PJ, Lokhorst HM, Zweegman S. Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Int J Lab Hematol.* 2016;38:110-122. doi:10.1111/ijlh.12504
2. Goyal G, Rajkumar SV, Lacy MQ, et al. Impact of prior diagnosis of monoclonal gammopathy on outcomes in newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia.* 2019;33(5):1273-1277. doi:10.1038/s41375-019-0419-7
3. Rajkumar S V., Gupta V, Fonseca R, et al. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia.* 2013;27(8):1738-1744. doi:10.1038/leu.2013.86
4. Neben K, Jauch A, Hielscher T, et al. Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t(4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load. *J Clin Oncol.* 2013;31(34):4325-4332. doi:10.1200/JCO.2012.48.4923
5. Lakshman A, Paul S, Rajkumar SV, et al. Prognostic significance of interphase FISH in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia.* 2018;32(8):1811-1815. doi:10.1038/s41375-018-0030-3
6. Ross FM, Chiecchio L, Dagrada G, et al. The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Haematologica.* 2010;95(7):1221-1225. doi:10.3324/haematol.2009.016329
7. Landgren O, Kristinsson SY, Goldin LR, et al. Risk of plasma cell and lymphoproliferative disorders among 14 621 first-degree relatives of 4458 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance in Sweden. *Blood.* 2009;114(4):791-795. doi:10.1182/blood-2008-12-191676
8. Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia.* 2008;22(5):1044-1052. doi:10.1038/leu.2008.4

9. Ailawadhi S, Jagannath S, Lee HC, et al. Association between race and treatment patterns and survival outcomes in multiple myeloma: A Connect MM Registry analysis. *Cancer*. 2020;126(19):4332-4340. doi:10.1002/cncr.33089
10. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2018;(36):e418-e423. doi:10.1200/edbk_159009
11. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863-2869. doi:10.1200/JCO.2015.61.2267
12. 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. doi:10.1038/leu.2009.174
13. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66:7-30. doi:10.3322/caac.21332
14. Gonsalves WI, Gertz MA, Gupta V, et al. Prognostic Significance of Quantifying Circulating Plasma Cells in Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(September):S147. doi:10.1016/j.clml.2014.06.087
15. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim C-S, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28:269-277. doi:10.1038/leu.2013.247
16. Solly S. Remarks on the Pathology of Mollities Ossium. With Cases. *J R Soc Med*. 1844;MCT-27(1):435-461. doi:10.1177/095952874402700129
17. Ribatti D. A historical perspective on milestones in multiple myeloma research. *Eur J Haematol*. 2018;100(3):221-228. doi:10.1111/ejh.13003
18. Macintyre W. *CASE OF MOLLITIES AND FRAGILITAS OSSIUM, ACCOMPANIED WITH URINE STRONGLY CHARGED WITH ANIMAL MATTER.*
19. Jones HB. Papers ON CHEMICAL PATHOLOGY;. Prefaced by the Gulstonian Lectures, read at the Royal College of Physicians, 1846. *Lancet*. 1847;50(1263):511-514. doi:10.1016/S0140-6736(00)63246-4
20. Dalrymple. On the microscopical character of mollities ossium. *Dublin Q J Med Sci*.

1846;2(1):85-95. doi:10.1007/BF02963147

21. Weber H. Mollities ossium, doubtful whether carcinomatous or syphilitic. Transactions of the Pathological Society of London. Published 1867. Accessed April 30, 2021.
https://scholar.google.com/scholar?cluster=363974614528433375&hl=en&as_sdt=2005&scioldt=0,5
22. v. Rustizky J. Multiples Myelom. *Dtsch Zeitschrift für Chir.* 1873;3(1-2):162-172. doi:10.1007/BF02911073
23. Waldeyer W. Ueber Bindegewebszellen. *Arch für Mikroskopische Anat.* 1875;11(1 Supplement):176-194. doi:10.1007/BF02933794
24. Fleischer R. Ueber das Vorkommen des sogenannten Bence Jones'schen Eiweisskörpers im normalen Knochenmark. *Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med.* 1880;80(3):482-489. doi:10.1007/BF01949235
25. Martínez A, Marín VG, Junquera SRYC, Martínez-Murillo R, Freire M. The contributions of Santiago Ramón y Cajal to cancer research - 100 years on. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(11):904-909. doi:10.1038/nrc1741
26. Arinkin MI. Die intravitale Untersuchungsmethodik des Knochenmarks. *Folia Haematol.* 1929;38:233-240.
27. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 2017;28(suppl_4):iv52-iv61. doi:10.1093/annonc/mdx096
28. Myeloma — Cancer Stat Facts. Accessed July 14, 2021.
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html#incidence-mortality>
29. International Agency for Research on Cancer. <https://www.iarc.who.int>
30. Waxman AJ, Mink PJ, Devesa SS, et al. Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study. doi:10.1182/blood-2010-07-298760
31. Tang CH, Liu HY, Hou HA, et al. Epidemiology of multiple myeloma in Taiwan, a population based study. *Cancer Epidemiol.* 2018;55(March):136-141. doi:10.1016/j.canep.2018.06.003

32. УСБАЛ по онкология ЕАД София - Национален Раков Регистър. Accessed April 15, 2021. <https://www.sbaloncology.bg/index.php/bg/структура/национален-раков-регистър.html>
33. Meyerding HW. Multiple Myeloma. *Radiology*. 1925;5(2):132-146. doi:10.1148/5.2.132
34. Geschickter CF. MULTIPLE MYELOMA. *Arch Surg*. 1928;16(4):807. doi:10.1001/archsurg.1928.01140040002001
35. Mandema E. WLS. Kahler's disease (multiple myeloma) in two sisters. *J Genet Hum*. Published 1954. Accessed March 21, 2021. [https://www.semanticscholar.org/paper/%5BKahler's-disease-\(multiple-myeloma\)-in-two-Mandema-Wildervanck/7992f36108050f9a3e16da64856f394a4b52b9c3](https://www.semanticscholar.org/paper/%5BKahler's-disease-(multiple-myeloma)-in-two-Mandema-Wildervanck/7992f36108050f9a3e16da64856f394a4b52b9c3)
36. Alexander LL, Benninghoff DL. Familial Myeloma*. 1965;57(6):471-475.
37. Koura DT, Langston AA. Inherited predisposition to multiple myeloma. *Ther Adv Hematol*. 2013;4(4):291-297. doi:10.1177/2040620713485375
38. Özet A, Güran Ş, Beksac M. Familial multiple myeloma associated with disorders of chronic inflammation: First report from Turkey. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2008;8(4):246-248. doi:10.3816/CLM.2008.n.033
39. Lynch HT, Ferrara K, Barlogie B, et al. Familial Myeloma : Study of a Unique Family. 2009;359(2):152-157. doi:10.1056/NEJMoa0708704.Familial
40. Jain M, Ascensao J, Schechter GP. Familial myeloma and monoclonal gammopathy: A report of eight African American families. *Am J Hematol*. 2009;84(1):34-38. doi:10.1002/ajh.21325
41. Effery J, Truewing PS, Atricia P, et al. *THE RISK OF CANCER ASSOCIATED WITH SPECIFIC MUTATIONS OF BRCA1 AND BRCA2 AMONG ASHKENAZI JEWS A BSTRACT Background Carriers of Germ-Line Mutations In*. Vol 336.; 1401. <http://www.nhgri>.
42. Sobol,H.,Vey,N.,Sauvan,R.,Philip,N.,Noguchi,T. and Eisinger F. Re : Familial Multiple Myeloma : a family study and review of the literature. 2002;94(6):461-462.
43. Rossi M, Pellegrini C, Cardelli L, Ciciarelli V, Nardo L Di, Fargnoli MC. *Dermatology*

Practical & Conceptual Familial Melanoma : Diagnostic and Management Implications. *Dermatol Pr Concept*. 2019;9(1):10-16.

44. Dilworth D, Liu L, Stewart AK, Berenson JR, Lassam N, Hogg D. Germline CDKN2A mutation implicated in predisposition to multiple myeloma. *Blood*. 2000;95(5):1869-1871. doi:10.1182/blood.v95.5.1869.005k09_1869_1871
45. Kristinsson SY, Björkholm M, Goldin LR, et al. Patterns of hematologic malignancies and solid tumors among 37,838 first-degree relatives of 13,896 patients with multiple myeloma in Sweden. doi:10.1002/ijc.24514
46. Altieri A, Chen B, Bermejo JL, Castro F, Hemminki K. Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006;42(11):1661-1670. doi:10.1016/j.ejca.2005.11.033
47. NJ C, TL W, LA C-A. Familial Myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359(16):1734-1735. doi:10.1056/NEJMc081677
48. Frank C, Sundquist J, Hemminki A, Hemminki K. Risk of other Cancers in Families with Melanoma: Novel Familial Links. *Sci Rep*. 2017;7(February):1-7. doi:10.1038/srep42601
49. Frank C, Sundquist J, Hemminki A, Hemminki K. Familial Associations Between Prostate Cancer and Other Cancers. *Eur Urol*. 2017;71(2):162-165. doi:10.1016/j.eururo.2016.07.031
50. Hemminki K, Chen B. Familial association of colorectal adenocarcinoma with cancers at other sites. *Eur J Cancer*. 2004;40(16):2480-2487. doi:10.1016/j.ejca.2004.07.016
51. Kristinsson SY, Björkholm M, Goldin LR, McMaster ML, Turesson I, Landgren O. Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia patients: A population-based study in Sweden. *Blood*. 2008;112(8):3052-3056. doi:10.1182/blood-2008-06-162768
52. Schinasi LH, Brown EE, Camp NJ, et al. Multiple myeloma and family history of lymphohaematopoietic cancers: Results from the International Multiple Myeloma Consortium. *Br J Haematol*. 2016;175(1):87-101. doi:10.1111/bjh.14199

53. Sud A, Chattopadhyay S, Thomsen H, et al. *Analysis of 153 115 Patients with Hematological Malignancies Refines the Spectrum of Familial Risk.*; 2019. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/134/12/960/1223438/bloodbld2019001362.pdf>
54. Tveden Gundersen M, Lund T, Moeller HEH, Abildgaard N. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. *Springer*. Published online 1912. doi:10.1007/s11912-019-0754-x
55. Biostatistics AD. *Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance A Bs Tr Ac T*. www.nejm.org
56. Obert R, Yle AK, Herneau EMT, et al. A LONG-TERM STUDY OF PROGNOSIS IN MONOCLONAL GAMMOPATHY OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE A BSTRACT *Background A Monoclonal Gammopathy of Unde*. Vol 564.; 2002. www.nejm.org
57. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):335-348. doi:10.1038/nrc3257
58. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-e548. doi:10.1016/S1470-2045(14)70442-5
59. Kaushansky K., Lichtman M., Prchal J., Levi M., Burns L. LDC. *Williams Hematology, 9th Edition*. 9th ed. Mc Graw Hill Education; 2016. doi:10.1038/npg.els.0006094
60. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1):21-33. doi:10.4065/78.1.21
61. Горанов С. Г-МВ. Патогенетичните взаимоотношения между костните и бъбречните увреждания при пациенти с мултиплен миелом са тип Circulus vitiosus. *Клинична и трансфузионна хематология*. 2011;XLVII(1-2):23-32.
62. Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007;138(5):563-579. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06705.x
63. Kwaan HC. Hyperviscosity in plasma cell dyscrasias. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013;55(1):75-83. doi:10.3233/CH-131691

64. Sirohi B, Powles R, Kulkarni S, et al. Comparison of new patients with bence-jones, igg and iga myeloma receiving sequential therapy: The need to regard these immunologic subtypes as separate disease entities with specific prognostic criteria. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(1):29-37. doi:10.1038/sj.bmt.1703093
65. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3(1):1-20. doi:10.1038/nrdp.2017.46
66. Durie BGM, Salmon SE. A CLINICAL STAGING SYSTEM FOR MULTIPLE MYELOMA Correlation of Measured Myeloma Cell Mass with Presenting Clinical Features, Response to Treatment, and Survival.
67. Collins CD. Multiple myeloma. *Cancer Imaging.* 2010;10(1):20-31. doi:10.1102/1470-7330.2010.0013
68. Durie BGM. The role of anatomic and functional staging in myeloma: Description of Durie/Salmon plus staging system. *Eur J Cancer.* 2006;42(11):1539-1543. doi:10.1016/j.ejca.2005.11.037
69. Greipp PR, Miguel JS, Dune BGM, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005;23(15):3412-3420. doi:10.1200/JCO.2005.04.242
70. Горанова-Маринова В., Георгиев П., Сотирова К., Спасов Е., Христова И., Димитрова М., Сапунарова К., Гръкланов В. Бабачева В. ГС. Сравнителен анализ на стадийните системи на Durie & Salmon и международната стадийна система (ISS) при пациенти с мултиплен миелом. *Клинична и трансфузионна хематология.* 2011;XLVII(1-2):33-37.
71. Treatment Guidelines — mSMART. Accessed April 5, 2021. <https://www.msmaart.org/mm-treatment-guidelines>
72. Binder M, Rajkumar S V., Ketterling RP, et al. Occurrence and prognostic significance of cytogenetic evolution in patients with multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2016;6(February):1-6. doi:10.1038/bcj.2016.15
73. Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: Current technology and future prospects. *Chromosoma.* 2005;114(4):286-294. doi:10.1007/s00412-005-0002-z
74. Gabrea A, Martelli ML, Qi Y, et al. Secondary genomic rearrangements involving

immunoglobulin or MYC loci show similar prevalences in hyperdiploid and nonhyperdiploid myeloma tumors. *Genes Chromosom Cancer*. 2008;47(7):573-590. doi:10.1002/gcc.20563

75. Герчева Л. ЛР. Биомаркери и персонализиран подход при диагностиката и лечението на множествения миелом. *Хематология*. 2020;LVI(1-2):18-25.
76. Ansell SM, Kyle RA, Reeder CB, et al. Diagnosis and management of waldenström macroglobulinemia: Mayo stratification of macroglobulinemia and risk-adapted therapy (mSMART) guidelines. *Mayo Clin Proc*. 2010;85(9):824-833. doi:10.4065/mcp.2010.0304
77. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: Evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):175-187. doi:10.1038/nrc746
78. Barwick BG, Gupta VA, Vertino PM, Boise LH. Cell of origin and genetic alterations in the pathogenesis of multiple myeloma. *Front Immunol*. 2019;10(MAY). doi:10.3389/fimmu.2019.01121
79. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6333-6338. doi:10.1200/JCO.2005.05.021
80. Kumar SK, Rajkumar SV. The multiple myelomas - Current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(7):409-421. doi:10.1038/s41571-018-0018-y
81. Leif Bergsagel P, Michael Kuehl W. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001;20(40 REV. ISS. 4):5611-5622. doi:10.1038/sj.onc.1204641
82. Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, et al. Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): A report on 13 cases. *Br J Haematol*. 1998;101(2):296-301. doi:10.1046/j.1365-2141.1998.00700.x
83. Shaughnessy J, Gabrea A, Qi Y, et al. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(1):217-223. doi:10.1182/blood.V98.1.217
84. Moreau P, Facon T, Leleu X, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the

- prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 2002;100(5):1579-1583. doi:10.1182/blood-2002-03-0749
85. Hebraud B, Magrangeas F, Cleyne A, et al. Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: The IFM experience. *Blood*. 2015;125(13):2095-2100. doi:10.1182/blood-2014-07-587964
86. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. In: *Cancer Research*. Vol 64. American Association for Cancer Research; 2004:1546-1558. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2876
87. Jenner MW, Leone PE, Walker BA, et al. Abnormalities of 16q in Multiple Myeloma Are Associated with Poor Prognosis: 500K Gene Mapping and Expression Correlations Identify Two Potential Tumor Suppressor Genes, WWOX and CYLD. *Blood*. 2006;108(11):110-110. doi:10.1182/blood.v108.11.110.110
88. Sawyer JR, Tricot G, Lukacs JL, et al. Genomic instability in multiple myeloma: Evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q. *Genes, Chromosom Cancer*. 2005;42(1):95-106. doi:10.1002/gcc.20109
89. Boersma-Vreugdenhil G, ... JK-B journal of, 2004 undefined. The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MAFB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint. *Wiley Online Libr*. 2004;126(3):355-363. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05050.x
90. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006;108(6):2020-2028. doi:10.1182/blood-2005-11-013458
91. Sonoki T, Harder L, Horsman DE, et al. Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood*. 2001;98(9):2837-2844. doi:10.1182/blood.V98.9.2837
92. Cho SY, Lim G, Oh SH, et al. Primary plasma cell leukemia associated with t(6;14)(p21;q32) and IGH rearrangement: A case study and review of the literature. *Ann Clin Lab Sci*. 2011;41(3):277-281.
93. Walker B, Wardell C, Murison A, ... EB-N, 2015 undefined. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple

myeloma. *nature.com*. Accessed March 3, 2021.

<https://www.nature.com/articles/ncomms7997>

94. S Y, N N, S I, et al. Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma. *Leukemia*. 1999;13(May):1812-1816.
95. Avet-Loiseau H, Blood FG-, Journal T, 2001 undefined. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *ashpublications.org*. Accessed March 3, 2021.
<https://ashpublications.org/blood/article/98/10/3082/52990>
96. Pettersson BM, Jernberg-Wiklund H, Larsson L, Sundstrom C, Tsujimoto Y, Nilsson K. *Expression of the Bcl-2 Gene in Human Multiple Myeloma Cell Lines and Normal Plasma Cells*. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/79/2/495/606064/495.pdf>
97. García-Aranda M, Pérez-Ruiz E, Redondo M. Bcl-2 inhibition to overcome resistance to chemo-and immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
doi:10.3390/ijms19123950
98. Boyd KD, Pawlyn C, Morgan GJ, Davies FE. Understanding the molecular biology of myeloma and its therapeutic implications. *Expert Rev Hematol*. 2012;5(6):603-617.
doi:10.1586/ehm.12.51
99. Pawlyn C, Melchor L, Murison A, et al. Coexistent hyperdiploidy does not abrogate poor prognosis in myeloma with adverse cytogenetics and may precede IGH translocations. *Blood*. 2015;125(5):831-840. doi:10.1182/blood-2014-07-584268
100. Chretien ML, Corre J, Lauwers-Cances V, et al. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: Which trisomies really matter? *Blood*. 2015;126(25):2713-2719. doi:10.1182/blood-2015-06-650242
101. Jekarl DW, Min CK, Kwon A, et al. Impact of genetic abnormalities on the prognoses and clinical parameters of patients with multiple myeloma. *Ann Lab Med*. 2013;33(4):248-254. doi:10.3343/alm.2013.33.4.248
102. Sawyer JR, Tian E, Shaughnessy JD, et al. Hyperhaploidy is a novel high-risk cytogenetic subgroup in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(3):637-644.
doi:10.1038/leu.2016.253
103. Harrison CJ. Cytogenetics and Molecular Genetics of a Cutaneous Lymphoblastic L

Eukemia.

104. Ashby C, Tytarenko RG, Wang Y, et al. Poor overall survival in hyperhaploid multiple myeloma is defined by double-hit bi-allelic inactivation of TP53. *Oncotarget*. 2019;10(7):732-737. doi:10.18632/oncotarget.26589
105. Peterson JF, Rowsey RA, Marcou CA, et al. Hyperhaploid plasma cell myeloma characterized by poor outcome and monosomy 17 with frequently co-occurring TP53 mutations. *Blood Cancer J*. 2019;9(3). doi:10.1038/s41408-019-0182-z
106. Bergsagel PL, Chesi M. V. Molecular classification and risk stratification of myeloma. *Hematol Oncol*. 2013;31(Supp. 1):38-41. doi:10.1002/hon.2065
107. Van Wier S, Braggio E, Baker A, et al. Hypodiploid multiple myeloma is characterized by more aggressive molecular markers than non-hyperdiploid multiple myeloma. *Haematologica*. 2013;98(10):1586-1592. doi:10.3324/haematol.2012.081083
108. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: The experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*. 2007;109(8):3489-3495. doi:10.1182/blood-2006-08-040410
109. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(7):2229-2238. doi:10.1182/blood.V98.7.2229
110. Walker B, Mavrommatis K, Wardell C, Blood TA-, 2018 undefined. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *ashpublications.org*. Accessed March 3, 2021. <https://ashpublications.org/blood/article-abstract/132/6/587/39419>
111. Binder M, Rajkumar S V., Ketterling RP, et al. Prognostic implications of abnormalities of chromosome 13 and the presence of multiple cytogenetic high-risk abnormalities in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2017;7(9). doi:10.1038/bcj.2017.83
112. Yamamoto K, Hamaguchi H, ... KN-C genetics and, 1998 undefined. A variant Burkitt-type translocation (8; 22)(q24; q11) in multiple myeloma: Report of a new case and review of the literature. *Elsevier*. Accessed March 3, 2021.

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165460897004585?casa_token=SoHKbHDq3tUAAAAA:yXeNh37-XmqjG_0IRD5TS7f6AhBHlihhW-mlxEsUoHvJ7bxPn7Udl5P-JsqcyDILA6fj0vedg58

113. Mroczek S, Chlebowska J, Kuliński TM, et al. The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C acts as an onco-suppressor in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2017;8(1). doi:10.1038/s41467-017-00578-5
114. Walker BA, Wardell CP, Brioli A, et al. Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J.* 2014;4:191. doi:10.1038/bcj.2014.13
115. Hassan H, Szalat R. Genetic predictors of mortality in patients with multiple myeloma. *Appl Clin Genet.* 2021;14:241-254. doi:10.2147/TACG.S262866
116. Multiple myeloma with variant type translocation, t(8;22)(q24;q11.2). The Japanese journal of clinical hematology. Published 2009. Accessed March 20, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19225226/>
117. Qazilbash MH, Saliba RM, Ahmed B, et al. Deletion of the Short Arm of Chromosome 1 (del 1p) is a Strong Predictor of Poor Outcome in Myeloma Patients Undergoing an Autotransplant. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(9):1066-1072. doi:10.1016/j.bbmt.2007.05.014
118. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood.* 2010;116(15):56-65. doi:10.1182/blood-2010-04-279596
119. Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet.* 2012;13(3):189-203. doi:10.1038/nrg3123
120. Sawyer JR. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genet.* 2011;204(1):3-12. doi:10.1016/j.cancergencyto.2010.11.002
121. Fonseca R, Van Wier SA, Chng WJ, et al. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia.* 2006;20(11):2034-2040. doi:10.1038/sj.leu.2404403
122. Shaughnessy J. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band

- 1q21 is associated with reduced levels of p27 Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology*. 2005;10(SUPPL. 1):117-126.
doi:10.1080/10245330512331390140
123. Avet-Loiseau H, Attal M, Campion L, et al. Long-term analysis of the ifm 99 trials for myeloma: Cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival. *J Clin Oncol*. 2012;30(16):1949-1952.
doi:10.1200/JCO.2011.36.5726
124. Multiple myeloma patients with CKS1B gene amplification have a shorter progression-free survival post-autologous stem cell transplantation.
doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06325.x
125. Bock F, Lu G, Srour SA, et al. Outcome of Patients with Multiple Myeloma and CKS1B Gene Amplification after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(12):2159-2164.
doi:10.1016/j.bbmt.2016.09.003
126. Hanamura I. Gain/amplification of chromosome arm 1q21 in multiple myeloma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2):1-16. doi:10.3390/cancers13020256
127. Shah GL, Landau H, Londono D, et al. Gain of chromosome 1q portends worse prognosis in multiple myeloma despite novel agent-based induction regimens and autologous transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(8):1823-1831.
doi:10.1080/10428194.2016.1260126
128. Marchesini M, Ogoti Y, Fiorini E, et al. ILF2 Is a Regulator of RNA Splicing and DNA Damage Response in 1q21-Amplified Multiple Myeloma. *Cancer Cell*. 2017;32(1):88-100.e6. doi:10.1016/j.ccell.2017.05.011
129. Boyd KD, Pawlyn C, Morgan GJ, Davies FE. Understanding the molecular biology of myeloma and its therapeutic implications. *Expert Rev Hematol*. 2012;5(6):603-617.
doi:10.1586/ehm.12.51
130. Hebraud B, Leleu X, Lauwers-Cances V, et al. Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. *Leukemia*. 2014;28:675-679. doi:10.1038/leu.2013.225
131. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, et al. Prognostic significance of copy-number

alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009;27(27):4585-4590.

doi:10.1200/JCO.2008.20.6136

132. Chng WJ, Gertz MA, Chung TH, et al. Correlation between array-comparative genomic hybridization-defined genomic gains and losses and survival: Identification of 1p31-32 deletion as a prognostic factor in myeloma. *Leukemia*. 2010;24(4):833-842. doi:10.1038/leu.2010.21
133. 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. *Clin Cancer Res*. 2011;17(24):7776-7784. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1791
134. Talley PJ, Chantry AD, Buckle CH. Genetics in myeloma: Genetic technologies and their application to screening approaches in myeloma. *Br Med Bull*. 2015;113(1):15-30. doi:10.1093/bmb/ldu041
135. Thanendrarajan S, Tian E, Qu P, et al. The level of deletion 17p and bi-allelic inactivation of TP53 has a significant impact on clinical outcome in multiple myeloma. *Haematologica*. 2017;102(9):364-367. doi:10.3324/haematol.2017.168872
136. Chin M, Sive JI, Allen C, et al. Prevalence and timing of TP53 mutations in del(17p) myeloma and effect on survival. *Blood Cancer J*. 2017;7(9):e610. doi:10.1038/bcj.2017.76
137. Shah V, Sherborne A, Ellis S, et al. Molecular Characterisation of TP53 Aberrations in 1,777 Myeloma Trial Patients. *Blood*. 2017;130(Supplement 1):4331-4331. doi:10.1182/blood.V130.Suppl_1.4331.4331
138. Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. Published online 2007. doi:10.1038/sj.leu.2404524
139. Lodé L, Eveillard M, Trichet V, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*. 2010;95(11):1973-1976. doi:10.3324/haematol.2010.023697
140. Schultheis B, Krämer A, Willer A, Hegenbart U, Goldschmidt H, Hehlmann R. *Analysis of P73 and P53 Gene Deletions in Multiple Myeloma*. Vol 13.; 1999. <http://www.stockton-press.co.uk/leu>

141. Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05199.x
142. Heuck CJ, Mehta J, Bhagat T, et al. Myeloma Is Characterized by Stage-Specific Alterations in DNA Methylation That Occur Early during Myelomagenesis. *J Immunol.* 2013;190(6):2966-2975. doi:10.4049/jimmunol.1202493
143. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: Results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol.* 2015;33(33):3911-3920. doi:10.1200/JCO.2014.59.1503
144. Egan JB, Shi CX, Tembe W, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood.* 2012;120(5):1060-1066. doi:10.1182/blood-2012-01-405977
145. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature.* 2011;471(7339):467-472. doi:10.1038/nature09837
146. Kumar SK, Callander NS, Alsina M, et al. Multiple Myeloma, version 3.2018: Featured updates to the NCCN guidelines. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw.* 2018;16(1):11-20. doi:10.6004/jnccn.2018.0002
147. Генова М., Балацено Г. Предиктивни биомаркери при плазмоклетъчен миелом. *Предиктивни Биомаркери в Онкологията.* II. ; 2017:107-111. <https://conference.more-darzas.com/documents/предиктивни-биомаркери-хематология/>
148. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *Br J Haematol.* 2011;154(1):32-75. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08573.x
149. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, et al. Report from the European myeloma network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 2012;97(8):1272-1277. doi:10.3324/haematol.2011.056176
150. Луканов Р., Герчева Л.. Геномен профил на мултиплиения миелом. *Хематология.* 2021;LVII(1-2):3-9.

151. Gupta N, Sharma A, Sharma A. Emerging biomarkers in Multiple Myeloma: A review. *Clin Chim Acta*. 2020;503(December 2019):45-53. doi:10.1016/j.cca.2019.12.026
152. Edelman GM, Gaily JA. *THE NATURE OF BENCE-JONES PROTEINS CHEMICAL SIMILARITIES TO POLYPEPTIDE CHAINS OF MYELOMA GLOBULINS AND NORMAL γ -GLOBULINS*. <http://rupress.org/jem/article-pdf/116/2/207/1391684/207.pdf>
153. Rathore R, Coward RA, Woywodt A. What's in a name? Bence Jones protein. *Clin Kidney J*. 2012;5(5):478-483. doi:10.1093/ckj/sfs127
154. Dingli D, Kyle RA, Rajkumar SV, et al. Immunoglobulin free light chains and solitary plasmacytoma of bone. *Blood*. 2006;108(6):1979-1983. doi:10.1182/blood-2006-04-015784
155. Walker RC, Brown TL, Jones-Jackson LB, De Blanche L, Bartel T. Imaging of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *J Nucl Med*. 2012;53(7):1091-1101. doi:10.2967/jnumed.111.098830
156. Derlin T, Bannas P. Imaging of multiple myeloma: Current concepts. *World J Orthop*. 2014;5(3):272-282. doi:10.5312/wjo.v5.i3.272
157. Baur-Melnyk A, Buhmann S, Dürr HR, Reiser M. Role of MRI for the diagnosis and prognosis of multiple myeloma. *Eur J Radiol*. 2005;55(1):56-63. doi:10.1016/j.ejrad.2005.01.017
158. Nosàs-Garcia S, Moehler T, Wasser K, et al. Dynamic contrast-enhanced MRI for assessing the disease activity of multiple myeloma: A comparative study with histology and clinical markers. *J Magn Reson Imaging*. 2005;22(1):154-162. doi:10.1002/jmri.20349
159. Zamagni E, Patriarca F, Nanni C, et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood*. 2011;118(23):5989-5995. doi:10.1182/blood-2011-06-361386
160. Bailly C, Leforestier R, Jamet B, et al. Pet imaging for initial staging and therapy assessment in multiple myeloma patients. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2). doi:10.3390/ijms18020445

161. Zamagni E, Nanni C, Patriarca F, et al. A prospective comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging and whole-body planar radiographs in the assessment of bone disease in newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica*. 2007;92(1):50-55. doi:10.3324/haematol.10554
162. Micheva I., Dimitrova S., Rangelova S., Chaushev B. GL. THE ROLE OF 18F-FDG PET/CT IN THE INITIAL DIAGNOSIS AND STAGING OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA. *HemaSphere*. 2019;3(3):979.
163. Bredella MA, Steinbach L, Caputo G, Segall G, Hawkins R, Bredella MA. *Musculoskeletal Imaging Bredella et Al. Use of FDG PET in Assessing Multiple Myeloma Value of FDG PET in the Assessment of Patients with Multiple Myeloma*. www.ajronline.org
164. Lu YY, Chen JH, Lin WY, et al. FDG PET or PET/CT for detecting intramedullary and extramedullary lesions in multiple myeloma: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nucl Med*. 2012;37(9):833-837. doi:10.1097/RLU.0b013e31825b2071
165. Weng WW, Dong MJ, Zhang J, et al. A systematic review of MRI, scintigraphy, FDG-PET and PET/CT for diagnosis of multiple myeloma related bone disease - Which is best? *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(22):9879-9884. doi:10.7314/APJCP.2014.15.22.9879
166. Deng S, Zhang B, Zhou Y, et al. The Role of 18F-FDG PET/CT in Multiple Myeloma Staging according to IMPeTUs: Comparison of the Durie-Salmon Plus and Other Staging Systems. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/4198673
167. Schmidmaier R, Mörsdorf K, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G. Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo. *Int J Biol Markers*. 2006;21(4):218-222. doi:10.5301/JBM.2008.1098
168. Gupta N, Khan R, Kumar R, Kumar L, Sharma A. Versican and its associated molecules: Potential diagnostic markers for multiple myeloma. *Clin Chim Acta*. 2015;442:119-124. doi:10.1016/j.cca.2015.01.012
169. Hope C, Ollar SJ, Heninger E, et al. TPL2 kinase regulates the inflammatory milieu of the myeloma niche. *Blood*. 2014;123(21):3305-3315. doi:10.1182/blood-2014-02-

554071

170. Hope C, Foulcer S, Jagodinsky J, et al. Immunoregulatory roles of versican proteolysis in the myeloma microenvironment. *Blood*. 2016;128(5):680-685. doi:10.1182/blood-2016-03-705780
171. Khan R, Sharma M, Kumar L, Husain SA, Sharma A. Interrelationship and expression profiling of cyclooxygenase and angiogenic factors in Indian patients with multiple myeloma. *Ann Hematol*. 2013;92(1):101-109. doi:10.1007/s00277-012-1572-5
172. Saretzki G. *Telomeres, Telomerase and Ageing*. Vol 90.; 2018. doi:10.1007/978-981-13-2835-0_9
173. Kumar R, Khan R, Gupta N, et al. Identifying the biomarker potential of telomerase activity and shelterin complex molecule, telomeric repeat binding factor 2 (TERF2), in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(7):1677-1689. doi:10.1080/10428194.2017.1387915
174. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Garcés JJ, et al. Next generation flow for minimally-invasive blood characterization of MGUS and multiple myeloma at diagnosis based on circulating tumor plasma cells (CTPC). *Blood Cancer J*. 2018;8:117. doi:10.1038/s41408-018-0153-9
175. Li J, Wang N, Tesfaluul N, Gao X, Liu S, Yue B. Prognostic value of circulating plasma cells in patients with multiple myeloma: A metaanalysis. *PLoS One*. 2017;12(7). doi:10.1371/journal.pone.0181447
176. Gonsalves WI, Rajkumar S V, Gupta V, et al. Quantification of clonal circulating plasma cells in newly diagnosed multiple myeloma: implications for redefining high-risk myeloma. *Leukemia*. 2014;28:2060-2065. doi:10.1038/leu.2014.98
177. Campo C, da Silva Filho MI, Weinhold N, et al. Bortezomib-induced peripheral neuropathy: A genome-wide association study on multiple myeloma patients. *Hematol Oncol*. 2018;36(1):232-237. doi:10.1002/hon.2391
178. Aa F. The Association of GSTT1, GSTM1, and TNF- α Polymorphisms With the Risk and Outcome in Multiple Myeloma. *Front Oncol*. 2019;9:1056. doi:10.3389/fonc.2019.01056

179. Poi MJ, Li J, 1# JAJ, et al. A Single Nucleotide Polymorphism in SLC7A5 Was Associated With Clinical Response in Multiple Myeloma Patients. doi:10.21873/anticancerres.13080
180. Sharma A, Khan R, Joshi S, Kumar L, Sharma M. Dysregulation in T helper 1/T helper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(5):920-927. doi:10.3109/10428191003699563
181. Kibata K, Ito T, Inaba M, et al. The immunomodulatory-drug, lenalidomide, sustains and enhances interferon- α production by human plasmacytoid dendritic cells. *J Blood Med*. 2019;10:217-226. doi:10.2147/JBM.S206459
182. Tan J, Chen S, Huang J, et al. Increased exhausted CD8 + T cells with programmed death-1, T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing-3 phenotype in patients with multiple myeloma. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018;14(5):e266-e274. doi:10.1111/ajco.13033
183. Zhang X, Liu L, Zhou S, et al. Plasma soluble programmed death ligand 1 levels predict clinical response in peripheral T-cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 2019;37(3):270-276. doi:10.1002/hon.2636
184. ISCN – Interpretation & communication of human cytogenomic nomenclature. Accessed June 16, 2021. <https://iscn.karger.com/>
185. Lim JH, Seo EJ, Park CJ, et al. Cytogenetic classification in Korean multiple myeloma patients: Prognostic significance of hyperdiploidy with 47-50 chromosomes and the number of structural abnormalities. *Eur J Haematol*. 2014;92(4):313-320. doi:10.1111/ejh.12257
186. Jenner MW, Leone PE, Walker BA, et al. Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9):3291-3300. doi:10.1182/blood-2007-02-075069
187. Gutierrez NC, Hernandez JM, Garcia JL, et al. Correlation between cytogenetic abnormalities and disease characteristics in multiple myeloma: Monosomy of chromosome 13 and structural abnormalities of 11q are associated with a high percentage of S-phase plasma cells. *Haematologica*. 2000;85(11):1146-1152.

188. Segges P, Braggio E, Minnicelli C, Hassan R, Zalcberg IR, Maiolino A. Genetic aberrations in multiple myeloma characterized by clg-FISH: A Brazilian context. *Brazilian J Med Biol Res.* 2016;49(5):1-5. doi:10.1590/1414-431X20155034
189. Shin SY, Eom HS, Sohn JY, et al. Prognostic Implications of Monosomies in Patients With Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2017;17(3):159-164.e2. doi:10.1016/j.clml.2016.12.001
190. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood.* 2011;117(18):4701-4705. doi:10.1182/blood-2010-10-299529
191. Saxe D, Seo EJ, Bergeron MB, Han JY. Recent advances in cytogenetic characterization of multiple myeloma. *Int J Lab Hematol.* 2019;41(1):5-14. doi:10.1111/ijlh.12882
192. Hebraud B, Magrangeas F, Cleyden A, et al. Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: the IFM experience. *Blood.* 2015;125(13):2095. doi:10.1182/BLOOD-2014-07-587964
193. Seong C, Delasalle K, Hayes K, et al. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1998;101(1):189-194. doi:10.1046/j.1365-2141.1998.00657.x
194. 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(2):380-390. doi:10.1182/blood.v66.2.380.380
195. Lai JL, Zandecki M, Mary JY, et al. Improved cytogenetics in multiple myeloma: A study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood.* 1995;85(9):2490-2497. doi:10.1182/blood.v85.9.2490.bloodjournal8592490
196. Calasanz MJ, Cigudosa JC, Odero MD, et al. Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: Primary breakpoints and clinical correlations. *Genes Chromosom Cancer.* 1997;18(2):84-93. doi:10.1002/(SICI)1098-2264(199702)18:2<84::AID-GCC2>3.0.CO;2-X
197. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B. Cytogenetic findings in 200

- patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995;82(1):41-49.
doi:10.1016/0165-4608(94)00284-I
198. Suzuki K. Chromosome findings in multiple myeloma. *Japanese J Clin Med.* 1995;53(3):568-573. Accessed February 25, 2022.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7699887/>
199. Stella F, Pedrazzini E, Rodríguez A, et al. New Recurrent Chromosome Alterations in Patients with Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia. *Cytogenet Genome Res.* 2011;134(4):249-259. doi:10.1159/000329479
200. Lee JW, Lee JK, Hong YJ, Hong S II, Chang YH. Correlation of chromosomal aberrations with prognostic markers in multiple myeloma patients- A single institution study. *Korean J Lab Med.* 2008;28(6):413-418. doi:10.3343/kjlm.2008.28.6.413
201. Duru AD, Sutlu T, Wallblom A, et al. Deletion of chromosomal region 8p21 confers resistance to bortezomib and is associated with upregulated decoy TRAIL receptor expression in patients with multiple myeloma. *PLoS One.* 2015;10(9):1-16.
doi:10.1371/journal.pone.0138248
202. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S, et al. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia.* 2003;17(2):427-436. doi:10.1038/sj.leu.2402797
203. Spina P, Coro I, De Donno A, et al. Oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization approach in hematologic malignancies with normal/failed conventional cytogenetics and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(2):120-127.
doi:10.1097/PAI.000000000000159
204. Kjeldsen E. Oligo-based high-resolution aCGH analysis enhances routine cytogenetic diagnostics in haematological malignancies. *Cancer Genomics and Proteomics.* 2015;12(6):301-338.
205. Kjeldsen E. Identification of prognostically relevant chromosomal abnormalities in routine diagnostics of multiple myeloma using genomic profiling. *Cancer Genomics and Proteomics.* 2016;13(2):91-128.
206. Wang N, Tesfaluul N, Li J, Gao X, Liu S, Yue B. Enrichment of circulating myeloma

cells by immunomagnetic beads combined with flow cytometry for monitoring minimal residual disease and relapse in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2019;98(12):2769-2780. doi:10.1007/s00277-019-03833-5