Клиническая онкогематология. 2023;16(3):294–302

Clinical oncohematology. 2023;16(3):294–302

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Экспрессия генов семейства *WNT* у больных множественной миеломой с различным ответом на противоопухолевую терапию

Н.И. Енукашвили[1,2,3], Л.А. Белик[1,2,3], И.И. Кострома[1], Н.Ю. Семенова[1], В.А. Балашова[1], Д.В. Барам[1], С.В. Грицаев[1], С.С. Бессмельцев[1], С.В. Сидоркевич[1], И.С. Мартынкевич[1]

[1] ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024

[2] ФГБУН «Институт цитологии РАН», Тихорецкий пр-т, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

[3] Центр клеточных технологий «Покровский», Большой пр-т В.О., д. 85, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 1949106

РЕФЕРАТ

Цель. Сравнить уровни экспрессии генов семейства *WNT* в мезенхимальных стромальных клетках (МСК) гемопоэтической ниши костного мозга (КМ) у больных множественной миеломой (ММ) и здоровых доноров.

Материалы и методы. В исследование включено 12 пациентов с ММ после стандартной индукционной терапии на основе бортезомиба. Пациенты были в возрасте 49–71 год (медиана 61 год). Эффективность лечения оценивали в соответствии с критериями Международной группы по изучению ММ (IMWG). Выделены следующие группы пациентов: с полным и частичным ответом (ПЧО; 1-я группа, n = 9), с отсутствием ответа (2-я группа, n = 3). Кроме того, сформирована группа первичных больных (n = 2), не получавших лечения. Контрольная группа — здоровые доноры КМ (n = 3). Уровень экспрессии генов *WNT* и *CTNNB1* определяли методом ПЦР в реальном времени на выделенной кДНК из МСК.

Результаты. В группе из 2 первичных больных два гена (*WNT2B* и *WNT9B*) значительно различались по степени экспрессии. У пациентов, не ответивших на лечение (n = 3), экспрессия гена *WNT2B* не определялась, а гена *WNT15,* напротив, была повышена. В группе ПЧО (n = 9) содержание мРНК гена *WNT5A* повышалось после проведенного лечения, в то время как экспрессия гена *WNT3A* возвращалась к норме. Уровень транскрипции гена *WNT7B* не различался в группах сравнения и контроля. Выявлено значимое повышение уровня экспрессии гена *CTNNB1*, кодирующего β-катенин, в группе ПЧО.

Заключение. Обнаруженные различия в экспрессии генов *WNT2B, WNT9B* и *CTNNB1* в перспективе позволяют предположить возможное их использование в качестве прогностических молекулярных маркеров при ММ.

Expression of the *WNT* Family Genes in Multiple Myeloma Patients with Different Chemotherapy Response

NI Enukashvily[1,2,3], LA Belik[1,2,3], II Kostroma[1], NYu Semenova[1], VA Balashova[1], DV Baram[1], SV Gritsaev[1], SS Bessmeltsev[1], SV Sidorkevich[1], IS Martynkevich[1]

[1] Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, 16 2-ya Sovetskaya ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024

[2] Institute of Cytology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064

[3] Pokrovskii Cell Technology Center, 85 Bolshoi pr-t V.O., Saint Petersburg, Russian Federation, 1949106

ABSTRACT

Aim. To compare the expression levels of the *WNT* family genes in mesenchymal stromal cells (MSC) of the bone marrow (BM) hematopoietic niche in multiple myeloma (MM) patients *vs.* healthy donors.

Materials & Methods. The study enrolled 12 MM patients aged 49–71 years (the median age 61 years) after standard induction bortezomib therapy. The treatment efficacy was assessed in accordance with the criteria of International Myeloma Working Group (IMWG). Patients were stratified in groups with complete and partial response (CPR; group 1, n = 9) and no response (group 2, n = 3). Besides, a group of primary untreated patients was formed (n = 2). The control group included healthy donors of BM (n = 3). The levels of the *WNT* and *CTNNB1* gene expression were assessed by real-time PCR on cDNA isolated from MSC.

Results. In the group of 2 primary patients, two genes (*WNT2B* and *WNT9B*) considerably differed in the degree of expression. In non-responders (n = 3), the *WNT2B* expression could not be determined, whereas the *WNT15* expression appeared to be increased. In group CPR (n = 9), mRNA level of the *WNT5A* gene increased after therapy, whereas the *WNT3A* gene expression returned to the normal level. The *WNT7B* gene transcription level did not differ in the control and comparison groups. In group CPR, a significant expression increase in the β-catenin-coding *CTNNB1* gene was detected.

Conclusion. The differences identified in the expression of the *WNT2B, WNT9B,* and *CTNNB1* genes suggest the possibility of their use as prognostic molecular markers in MM.

© 2023 практическая медицина

Ключевые слова: множественная миелома, сигнальный путь WNT, гемопоэтическая ниша, мезенхимальные стромальные клетки, прогностические маркеры.

Keywords: multiple myeloma, WNT signaling pathway, hematopoietic niche, mesenchymal stromal cells, prognostic markers.

Получено: 5 января 2023 г.
Принято в печать: 27 мая 2023 г.

Received: January 5, 2023
Accepted: May 27, 2023

Для переписки: Натэлла Иосифовна Енукашвили, канд. биол. наук, ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024; тел.: +7(965)085-93-25; e-mail: natellae@gmail.com

For correspondence: Natella Iosifovna Enukashvily, PhD in Biology, 16 2-ya Sovetskaya ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024; Tel.: +7(965)085-93-25; e-mail: natellae@gmail.com

Для цитирования: Енукашвили Н.И., Белик Л.А., Кострома И.И. и др. Экспрессия генов семейства WNT у больных множественной миеломой с различным ответом на противоопухолевую терапию. Клиническая онкогематология. 2023;16(3):294–302.

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-3-294-302

For citation: Enukashvily NI, Belik LA, Kostroma II, et al. Expression of the WNT Family Genes in Multiple Myeloma Patients with Different Chemotherapy Response. Clinical oncohematology. 2023;16(3):294–302. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-3-294-302

ВВЕДЕНИЕ

Множественная миелома (ММ) относится к злокачественным В-клеточным лимфоидным опухолям. Морфологическим субстратом ММ являются плазматические клетки, продуцирующие моноклональный иммуноглобулин. Частота новых зарегистрированных случаев ММ в России ежегодно составляет приблизительно 1,9 на 100 000 населения. До настоящего времени ММ признается неизлечимым заболеванием и служит причиной смерти более 10 000 человек в год [1].

Жизнеспособность опухолевых клеток при ММ поддерживается в т. ч. за счет взаимодействия с элементами гемопоэтической ниши (ГН), образующими микроокружение опухоли [2]. Важной частью костного мозга (КМ) является его строма, состоящая из компонентов межклеточного матрикса и различных типов клеток, не относящихся к форменным элементам крови. Клетки стромы КМ не участвуют в гемопоэзе. Они выполняют роль микроокружения для гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), дающих начало всем типам клеток крови [3]. К компонентам ГН относятся остеобласты, остеокласты, клетки эндотелия, мезенхимальные стромальные клетки (МСК) и др. МСК являются ключевым, важнейшим компонентом ГН в норме и участвуют в обновлении стромы КМ и гемопоэзе, регулируя дифференцировку ГСК [4]. При онкогематологических заболеваниях в ГН наблюдаются изменения всех ее элементов. Так, МСК приобретают опухоль-ассоциированный фенотип, что способствует росту опухоли и развитию ее лекарственной устойчивости [2]. Показано, что изменения в ГН сохраняются даже после лечения ММ, хотя степень их выраженности различная у пациентов с разным ответом на противоопухолевую терапию [5].

Характерным изменением в МСК опухолевой ГН является изменение работы сигнального каскада WNT, одного из основных путей регуляции баланса остеобластогенеза/остеокластогенеза и, как следствие, процессов формирования/резорбции костной ткани. Поражение костей скелета и черепа характерно для ММ. Оно наблюдается у 80 % больных с впервые диагностированной ММ [6]. Повреждения костей происходят из-за нарушения баланса процессов деструкции и восстановления в костной ткани. Известно, что ремоделирование костной ткани представлено совокупностью двух последовательных процессов: локального разрушения кости и последующего восстановления. Сигнальный путь WNT, включающий в себя собственно белки семейства WNT, их рецепторные молекулы, белки, активируемые этими рецепторами, и т. д., осуществляет важную роль в регуляции этих процессов [7]. Семейство белков WNT — это группа секретируемых гликопротеинов, кодируемых 19 генами *WNT*, расположенными в разных аутосомах. При подавлении WNT-каскада снижается функциональная активность остеобластов и активируется остеокластогенез [8, 9].

В норме сигнальный путь WNT регулирует баланс между остеобластами и остеокластами, благодаря чему интенсивность резорбции костной ткани не превышает скорости ее формирования. Однако при ММ этот баланс нарушается. Клетки ММ выделяют в микроокружение антагонисты WNT, в результате чего сигналы лигандов WNT не передаются, нарушается деятельность остеобластов, а процесс формирования кости замедляется. При этом активация остеокластов становится причиной литических процессов и приводит к резорбции костной ткани [10]. При остеолизисе выделяются факторы роста, способствующие выживанию и росту клеток ММ.

МСК в здоровой ГН секретируют лиганды WNT, в т. ч. WNT2, WNT4, WNT5A, WNT11 и WNT16 [11]. Остеобласты секретируют WNT5A, а остеокласты — WNT10B для взаимной регуляции [12, 13]. Лиганды WNT выделяют и другие клетки микроокружения. При секреции опухолью антагонистов WNT вероятно, что МСК опухолевой ГН будут отвечать на их воздействие изменением активности сигнального каскада WNT. Поскольку опухолевая ГН при ММ (как и любая опухолевая ниша) проявляет устойчивость к противоопухолевой терапии [2, 14, 15], она сохраняется в период ремиссии и способствует развитию рецидивов заболевания. Можно предположить, что изменения

регуляторных процессов остеогенеза, характерные для ММ, сохраняются в период ремиссии у некоторых пациентов, в т. ч. за счет нарушений работы каскада WNT в МСК опухолевой ГН.

Цель исследования — сравнить уровни экспрессии генов семейства *WNT* в МСК ГН у больных ММ после противоопухолевой терапии и у здоровых доноров КМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоэтика

Все образцы КМ получены от больных ММ и здоровых доноров. Забор образцов осуществляли согласно стандартам, установленным приказом Минздрава РФ от 11 августа 2017 г. № 517n и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация: этические принципы медицинских исследований с участием человека, включая поправки, внесенные на 64-м заседании ВМА в Форталезе, Бразилия, октябрь 2013 г.). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (протокол № 6-2019 от 11.06.2019 г.). От каждого пациента, участвующего в исследовании, получено письменное информированное согласие.

Пациенты

В исследование включено 14 пациентов с ММ после стандартной индукционной терапии на основе бортезомиба, проведенной в соответствии со стандартами лечения ММ в РФ, включающей следующие схемы: бортезомиб и дексаметазон (VD); бортезомиб, циклофосфамид и дексаметазон (VCD); бортезомиб, леналидомид и дексаметазон (VRD) с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) (табл. 1). Пациенты были в возрасте 49–71 год (медиана 61 год). Эффективность лечения оценивали по критериям Международной группы по изучению ММ (IMWG).

Больные были разделены на три группы. Первую группу (пациенты с полным или частичным ответом — ПЧО) составили 9 больных с одним из следующих вариантов ответа на лечение: полный ответ (ПО), очень хороший частичный ответ (охЧО) и частичный ответ (ЧО). Во 2-ю группу включено 3 больных, не ответивших на лечение (НО). Кроме того, была сформирована 3-я группа из 2 первичных больных (ПБ) с установленным диагнозом ММ, но не получавших терапии. Контрольную группу составили здоровые доноры (ЗД) КМ.

Клеточные культуры и линии

Образцы аспирата КМ от больных ММ и ЗД получали путем стернальной пункции гребня подвздошной кости, объем пробы 1–6 мл. Полученные образцы аспирата КМ разводили физиологическим раствором в соотношении 1:3. Мононуклеарные клетки выделяли по стандартному протоколу в градиенте плотности Ficoll-Paque (ρ = 1,077 г/см^3; «ПанЭко», Россия). Разбавленный образец КМ (7,5 мл) наслаивали на 7,5 мл Ficoll-Paque и центрифугировали в течение 40 мин при скорости 400 g. Фракцию мононуклеарных клеток собирали, разбавляли PBS в соотношении 1:10 и центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 200 g для удаления фиколла и тромбоцитов. Затем клетки помещали в специальные флаконы и культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Thermofisher, США) с добавлением 10 % Advanced Stem Cell Supplement (HyClone, США), а также 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США). Клетки инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 и 7 % O_2 (условия так называемой физиологической гипоксии — культивирование клеток при концен-

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование (*n* = 14)

№ образца аспирата КМ	Тип М-протеина	Инфильтрация ПК КМ по данным гистологии (трепанобиоптата), %	Число ПК в миелограмме, %	Площадь микрососудов в КМ по данным гистологии (трепанобиоптата), %	Терапия	Тип ответа на терапию
1	Нет секреции	10	6,0	7,2	VCD 4 курса	ЧО
2	IgGκ	10	3,0	8,9	VCD 6 курсов, аутоТГСК	ПО
3	IgAκ	5	2,4	10,2	VCD 5 курсов	ЧО
4	IgGλ	1–2	1,0	7,4	VCD 5 курсов, аутоТГСК	ПО
5	IgGκ	3	3,6	8,5	VRD 2 курса + KRd 2 курса, аутоТГСК	охЧО
6	IgGλ	30	2,2	11,7	VCD 3 курса, аутоТГСК	охЧО
7	IgGκ	1–2	1,4	10,6	VCD 5 курсов, аутоТГСК	ЧО
8	IgGκ	1–2	2,6	8,6	CV 6 курсов	ПО
9	IgGλ	1–2	2,8	9,2	VRD 1 курс, аутоТГСК	охЧО
10	IgGκ	50	47,0	13,0	VD 6 курсов, аутоТГСК	Нет ответа
11	IgAκ	50	14,4	12,5	VCD 3 курса, аутоТГСК	Нет ответа
12	IgGλ	90	82,4	11,4	VCD 2 курса	Нет ответа
13	IgGκ	Нет данных	2,4	Нет данных	Не проводилась	—
14	IgA	90	66,0	9,3	Не проводилась	—

аутоТГСК — трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток; КМ — костный мозг; охЧО — очень хороший частичный ответ; ПК — плазматические клетки; ПО — полный ответ; ЧО — частичный ответ.

Таблица 2. Праймеры для обнаружения кДНК генов семейства *WNT* методом ПЦР в режиме реального времени

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
WNT3	5'-GGAGAAGCGGAAGGAAAAATG-3'	5'-GCACGTCGTAGATGCGAATACA-3'
WNT3A	5'-CCTGCACTCCATCCAGCTACA-3'	5'-GACCTCTCTTCCTACCTTTCCCTTA-3'
WNT5A	5'-GAAATGCGTGTTGGGTTGAA-3'	5'-ATGCCCTCTCCACAAAGTGAA-3'
WNT5B	5'-CTGCCTTTCCAGCGAGAATT-3'	5'-AGGTCAAATGGCCCCCTTT-3'
WNT7B	5'-CCCGGCAAGTTCTCTTTCTTC-3'	5'-GGCGTAGCTTTTCTGTGTCCAT-3'
WNT8B	5'-TCCCAGAAAAACTGAGGAAACTG-3'	5'-AACCTCTGCCTCTAGGAACCAA-3'
WNT10B	5'-CTTTTCAGCCCTTTGCTCTGAT-3'	5'-CCCCTAAAGCTGTTTCCAGGTA-3'
WNT2B (ранее *WNT13*)	5'-TGCCAAGGAGAAGAGGCTTAAG-3'	5'-GTGCGACCACAGCGGTTATT-3''
WNT9A (ранее *WNT14*)	5'-CTTAAGTACAGCAGCAAGTTCGTCAA-3'	5'-CCACGAGGTTGTTGTGGAAGT-3'
WNT9B (ранее *WNT15*)	5'-CAGGTGCTGAAACTGCGCTAT-3'	5'-GCCCAAGGCCTCATTGGT-3'
CTNNB1 (β-катенин)	5'-CTGCTGTTTTGTTCCGAATGTC-3'	5'-CCATTGGCTCTGTTCTGAAGAGA-3'
Референсный ген *GAPDH*	5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTT-3'	5'-TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC-3'

трации кислорода, соответствующей тканевой) [16]. Адгезия МСК к пластику происходила через 5–7 дней, неприкрепившиеся клетки удаляли. Среду меняли каждые 3 дня. При достижении плотности культуры 70–80 % клетки собирали с использованием растворов трипсина и версена (Gibco, США) и пересевали в соотношении 1:2–1:3. Для дальнейших экспериментов использовали МСК на 1–5 пассажах.

Олигонуклеотидные последовательности: зонды и праймеры

Праймеры для амплификации 10 генов семейства *WNT*, а также гена *CTNNB1* (β-катенина) [17] приведены в табл. 2.

Выделение РНК и получение кДНК

Суммарную РНК из МСК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия), содержащего фенол и гуанидин-изотиоцианат, согласно протоколу производителя. Затем осадок РНК высушивали и растворяли в РНК-буфере, входящем в состав набора «РИБО-сорб» («АмплиСенс», Россия). Дополнительную очистку полученной РНК от примесей ДНК осуществляли с помощью инкубирования с ДНКазой I и ЭДТА. Полученную РНК хранили при температуре –80 °С.

Для получения кДНК с выделенной РНК проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с обратной транскрипцией с использованием ревертазы (обратной транскриптазы) M-MuLV–RH (Biolabmix, Россия). К РНК-матрице добавляли олиго$(dT)_{16}$-праймеры и инкубировали в течение 2 мин при температуре 70 °С для расплавления вторичных структур. Затем добавляли буфер и ревертазу и инкубировали в течение 60 мин при температуре 42 °С. Реакцию завершали нагреванием до 70 °С в течение 10 мин. Полученную однонитевую кДНК затем использовали для проведения ПЦР в реальном времени.

ПЦР в режиме реального времени

ПЦР в реальном времени проводили с использованием системы CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США). Для приготовления проб использовали набор для количественной ПЦР (кПЦР) qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия).

При амплификации использовали следующий протокол: температура 95 °С в течение 5 мин, затем 40 циклов при температуре 95 °С в течение 10 с, 56 °С в течение 30 с и 72 °С в течение 20 с (3-этапный протокол). После завершения системы циклов в программу добавляли шаги для построения кривой плавления, позволяющей оценить соответствие продуктов амплификации ожидаемым.

Статистический анализ

Данные являются репрезентативными для трех или более независимых экспериментов. кПЦР проводили в двух биологических повторах. Для построения графиков и статистического анализа использовалась программа GraphPad Prism 8. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Для анализа результатов ПЦР в реальном времени использовали критерий Краскела—Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Белки семейства WNT играют ключевую роль в остеогенезе, эпителиально-мезенхимном переходе и других процессах, важных для развития опухоли. В ходе работы оценивали активность транскрипции генов, кодирующих белки этого семейства, у пациентов до и после лечения ММ. Несмотря на большое количество публикаций об активности генов *WNT* в опухолях различного происхождения, данные по ММ сравнительно немногочисленные.

Белки WNT3, WNT3A, WNT5A уже некоторое время изучаются как факторы стимуляции (WNT3) или, наоборот, подавления роста ММ (WNT3A, WNT5A) [18–21]. Однако, происходит ли нормализация уровня их экспрессии после проведенного лечения, неизвестно. Неясно также, затрагивают ли изменения не только сами опухолевые клетки, но и компоненты ГН, особенно МСК, играющие важную роль в регуляции WNT-каскада.

В настоящем исследовании обнаружены статистически значимые различия по уровню мРНК гена *WNT3* в группах ПБ-МСК (n = 2) и ЗД-МСК (n = 3) (рис. 1, *А*). Это свидетельствует о том, что активация гена при

ММ происходит не только в опухолевых клетках, но и в клетках микроокружения, по крайней мере в МСК. Уровень транскрипции гена у ПБ-МСК был повышен в сравнении с ЗД-МСК в среднем в 136 раз (минимум — в 49 раз, максимум — в 323 раза) ($p < 0,05$). У большинства пациентов, прошедших лечение, уровень транскрипции гена возвращался к норме, за исключением 1 пациента с ЧО, у которого уровень транскрипции оставался повышенным в 143 раза по сравнению с ЗД-МСК. Таким образом, повышенная экспрессия гена *WNT3* у ПБ может свидетельствовать об участии лиганда WNT3, экспрессирующегося при ММ. Однако проводимое лечение способствует нормализации активности гена *WNT3* в МСК. Для понимания клинической значимости сохранения повышенного уровня экспрессии *WNT3* у некоторых пациентов с ЧО необходимо продолжить исследования: увеличить количество подвергнутых анализу образцов и сопоставить их с данными анамнеза.

По существующим данным, клетки ММ секретируют ингибиторы WNT3A-канонического пути передачи сигнала, а стимуляция экспрессии гена *WNT3A* у лабораторных мышей восстанавливает остеобластогенез и замедляет развитие ММ [22]. Мы показали (рис. 1, *Б*), что у ПБ с ММ до начала лечения уровень мРНК гена *WNT3A* в МСК резко повышался (в 2–55 раз по сравнению с ЗД). Возможно, это проявление компенсаторных механизмов в ответ на повышенную секрецию ингибиторов каскада клетками ММ. После лечения, вне зависимости от его исхода, уровень экспрессии гена *WNT3A* возвращался к исходному и не отличался от такового у ЗД. Возможно, МСК ГН принимают участие в компенсаторных механизмах, а используемые методы лечения влияют на активность элементов WNT-каскада.

Существуют разнообразные данные о значении гена *WNT5A* при ММ. Ранее показано, что его экспрессия в МСК повышает их остеогенный дифференцировочный потенциал, который при ММ обычно нарушается [21]. При этом ген *WNT5A* экспрессируется в клетках КМ пациентов с ММ [20]. По нашим данным (рис. 1, *В*), уровень транскрипции повышается по сравнению с ЗД в 2–6 раз (4,0 ± 2,2) у пациентов до начала лечения ММ. Однако у пациентов, прошедших лечение, но не ответивших на него, экспрессия гена сопоставима с ее уровнем у ЗД. У большинства пациентов с ПЧО уровень экспрессии гена был очень высоким: количество мРНК превышало контрольный показатель в 4–50 раз (42,6 ± 12,0). Таким образом, по нашим данным, количество мРНК гена *WNT5A* увеличивается после проведенного лечения, в то время как экспрессия *WNT3A* возвращается к норме. Такое изменение баланса двух генов семейства *WNT*, являющихся одними из основных регуляторов остеогенеза при ММ, свидетельствует о сложных процессах, протекающих в ГН в ответ на сигналы клеток ММ и нарушение остеогенеза.

Белок WNT5B по структуре и функциям близок к WNT5A [23]. Однако о его роли в развитии ММ данных пока нет. Тем не менее известно, что отклонения в его работе вызывают заболевания, связанные с нарушениями в костной ткани. В проанализированных образцах (рис. 1, *Г*) повышение экспрессии гена в МСК наблюдалось только у 1 пациента с НО и 1 пациента с ЧО после лечения (11, 2 ± 1,2 и 27,2 ± 10,7 соответственно). У остальных пациентов уровень транскрипции гена *WNT5B* не отличался от такового у ЗД. Таким образом, несмотря на отмечаемое другими авторами сходство функций с WNT5A, при ММ, по-видимому, функции этих белков различаются.

О роли белка WNT7B в развитии ММ сообщается в исследовании 2021 г., в котором продемонстрировано, что усиление экспрессии гена *WNT7B* способствует росту опухоли [24]. Мы показали, что эти изменения не затрагивают МСК ГН. Уровень транскрипции гена *WNT7B* не различался между группами и у ЗД (рис. 1, *Д*).

Для лиганда WNT8B к настоящему времени нет данных об участии в развитии ММ. Однако этот белок вовлечен в развитие некоторых других видов рака, таких как рак желудка, молочной железы и др. [25]. В нашем исследовании (рис. 1, *Е*) у всех пациентов с ММ, как первичных, так и прошедших лечение, уровень транскрипционной активности гена в МСК резко возрастал (в 147–4123 раза) по сравнению с контрольной группой ЗД. Несмотря на то что уровень мРНК гена *WNT8B* и биологические функции транслируемого белка при ММ не исследованы, известно, что белок WNT8B регулирует опосредованный β-катенином переход МСК к миофибробластному фенотипу [26], который характерен для значительной части опухоль-ассоциированных фибробластов. Мы показали ранее, что МСК ГН совершают такой переход при сокультивировании с клетками ММ [5]. Миофибробласты играют ключевую роль в развитии фиброзов, поэтому активация гена *WNT8B* в МСК ГН как до, так и после лечения, вероятнее всего, связана с присутствием опухоль-ассоциированных фибробластов в ГН пациентов с ММ.

WNT10B — еще один представитель семейства белков WNT. Уровень мРНК и роль белка не исследованы при ММ. Однако известно, что этот белок вовлечен в процесс остеогенной дифференцировки [27–29]. Доказано, что белок экспрессируется в клетках стромы КМ. Считается, что он является неклеточным компонентом микроокружения ГСК и вовлечен в процесс дифференцировки В-клеток [30]. Уровень мРНК в МСК всех пациентов, прошедших лечение по поводу ММ, был выше, чем у ЗД, в 12–401 раз. Статистически значимых различий между группами с разным ответом на терапию не выявлено. Уровень мРНК в МСК пациентов с ПЧО и НО превышал контрольный у ЗД в 147 ± 121 и 212 ± 190 раз соответственно (рис. 1, *Ж*). Несмотря на значительный разброс значений, повышение уровня мРНК наблюдалось у всех пациентов, что говорит о возможной роли белка WNT10B в патогенезе ММ.

WNT2B (ранее WNT13) участвует в процессах дифференцировки моноцитов в макрофаги [31], что предполагает его роль в формировании ГН. В МСК мы не обнаружили мРНК гена *WNT2B* ни у одного из 3 пациентов группы НО (рис. 1, *З*). В то же время в группах ПБ и ПЧО уровень мРНК был повышен в 9,91–7054,78 раза по сравнению с ЗД. Возможно, такое повышение связано с развитием иммунного ответа. Дальнейшие исследования, по всей вероятности, дадут

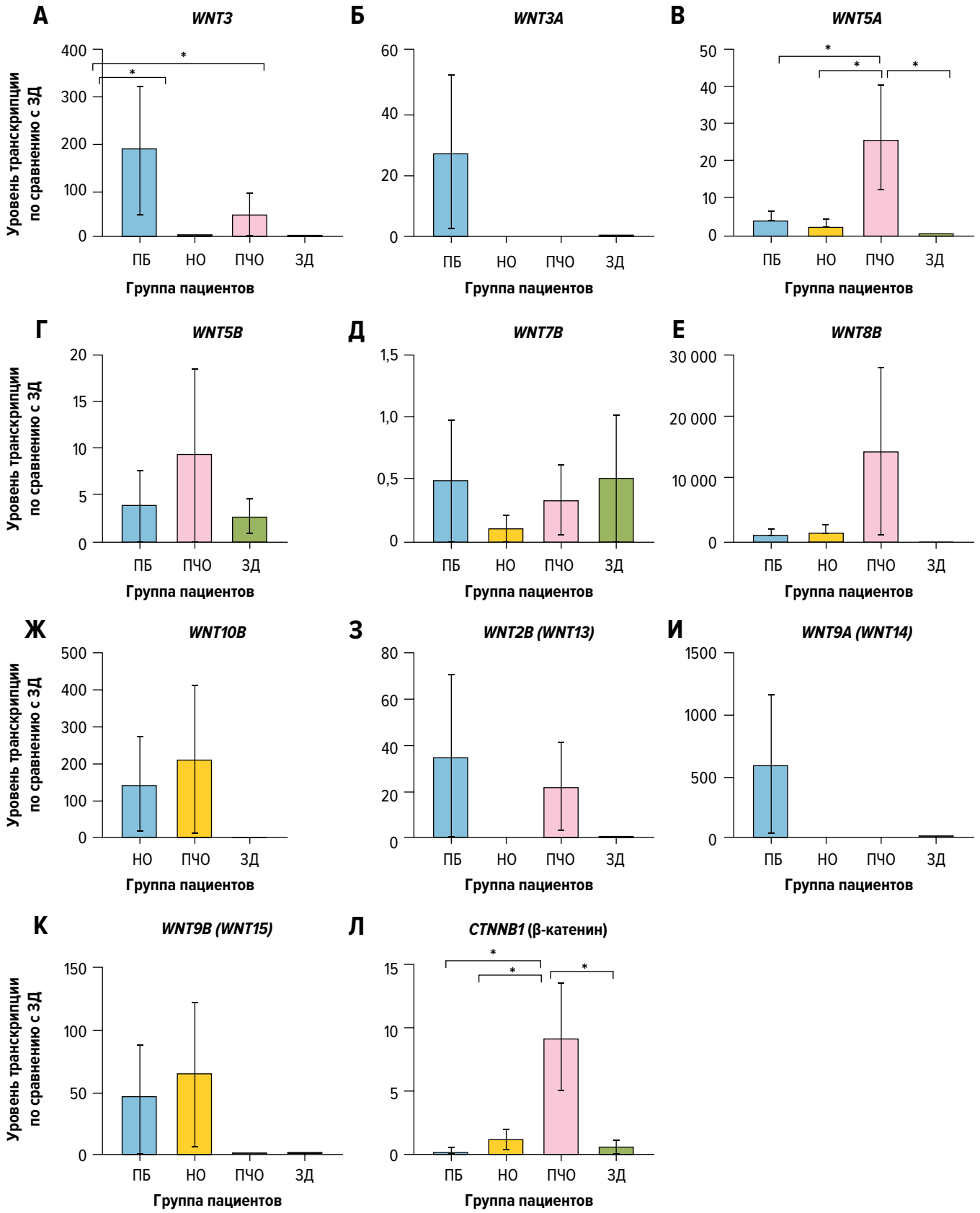

Рис. 1. Оценка методом кПЦР уровня экспрессии (*А–К*) генов *WNT* и (*Л*) гена *CTNNB1* (β-катенина) в культурах мезенхимальных стромальных клеток пациентов с ММ

ЗД — здоровые доноры; НО — не ответившие на лечение; ПБ — первичные больные; ПЧО — пациенты с полным или частичным ответом.
* $p < 0{,}05$.

Fig. 1. The qPCR assessment of expression level of (*A–K*) the *WNT* genes and (*Л*) the *CTNNB1* gene (β-catenin) in the mesenchymal stromal cell cultures in MM patients

ЗД — healthy donors; НО — non-responders; ПБ — primary patients; ПЧО — patients with complete or partial response.
* $p < 0.05$.

ответ на вопрос о значимости данного параметра в диагностике и прогнозировании результатов лечения. Также необходимо исследовать уровень мРНК, предшествующих различным изоформам этого белка.

По существующим данным, WNT9A (ранее WNT14) участвует в гемопоэзе [32]. Кроме того, он экспрессируется клетками различных типов рака человека, таких как рак желудка, поджелудочной железы, молочной железы [33]. В исследованных нами образцах МСК у ПБ уровень мРНК гена *WNT9A* был повышен по сравнению с пациентами после лечения и ЗД в 4,81–6072,85 раза (рис. 1, *И*). Значение такого повышения еще предстоит выяснить.

Для белка WNT9B (ранее WNT15) имеются данные о его участии при некоторых других видах рака, включая рак молочной железы [34], но не ММ. Мы обнаружили, что в МСК у 1 из 2 ПБ и у всех 3 пациентов группы НО уровень мРНК гена *WNT15* оказался повышенным в 4,7–189 раз по сравнению с пациентами, ответившими на терапию, и ЗД (рис. 1, *К*).

β-катенин — внутриклеточный посредник в каноническом пути WNT, передающий сигналы транскрипционным факторам, которые активируют экспрессию генов-мишеней. При ММ он регулируется в двух противоположных направлениях. В клетках микроокружения, в т. ч. в МСК, канонический путь подавляется, в то время как в опухолевых клетках он активируется и приводит к повышению их пролиферативной активности [35]. Для гена *CTNNB1*, кодирующего β-катенин, мы выявили статистически значимое повышение уровня экспрессии в группе пациентов с ММ, ответивших на терапию (рис. 1, *Л*).

Существенный разброс значений внутри групп обусловлен малым размером выборок и их разнородностью. Для повышения достоверности результатов в дальнейших исследованиях планируется расширить выборки, а наиболее разнородные из них разделить на отдельные группы в соответствии с анамнезом пациентов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что для взаимодействия с другими клетками микроокружения, а также для аутокринной передачи сигналов в МСК экспрессируется ряд лигандов WNT, в частности WNT2, WNT4, WNT5A, WNT11, WNT16 [11]. В основном в перечисленных процессах задействована активация WNT-сигнального пути, в основе которой лежит накопление в МСК белка β-катенина.

При ММ наблюдается аберрантная активность белков каскада WNT. Усиление WNT-сигналинга в клетках ММ способствует их пролиферации, а подавление сигналов WNT в микроокружении с помощью выделяемых опухолью антагонистов приводит к подавлению остеогенеза. Механизмы нарушения регуляции WNT-пути в последнее время активно изучаются. Одним из факторов, влияющих на WNT-активность, может быть уровень лигандов WNT, экспрессируемых в клетках как ММ, так и опухолевого микроокружения, в т. ч. МСК [36].

В связи с этим мы исследовали экспрессию генов *WNT* и *CTNNB1* (β-катенина) в ММ-МСК, чтобы выяснить, различается ли интенсивность транскрипции в МСК здоровой и опухолевой ГН КМ.

При исследовании уровней транскрипции генов семейства *WNT* мы обнаружили повышенную экспрессию гена *WNT3* в группе ПБ. В исследовании, выполненном под руководством Y. Niitsu, показано, что ген *WNT3* участвует в развитии лекарственной устойчивости клеток ММ, опосредованной их адгезией к стромальным клеткам КМ [18]. Воздействие белка WNT3 носит аутокринный характер: высокий уровень адгезии связан с гиперэкспрессией гена *WNT3* в опухолевых клетках. Однако в этом исследовании анализировали наличие мРНК только в клетках опухоли, но не в клетках ГН, поэтому неизвестно, оказывает ли такое же воздействие паракринная передача WNT3 клеткам ММ от МСК [18].

Мы также выявили повышение экспрессии *WNT5A* в группе ПЧО по отношению к остальным группам. WNT5A известен как лиганд, участвующий преимущественно в неканонической активации WNT-пути. Показано, что неканонический путь WNT5A/ROR2 поддерживает остеогенную дифференцировку МСК, нарушающуюся при ММ. Экспрессия гена *WNT5A* в МСК повышает их способность к дифференцировке в остеогенном направлении [21]. Показанная в нашем исследовании повышенная экспрессия *WNT5A* у пациентов из группы ПЧО по сравнению с ПБ и НО согласуется с этим утверждением. Однако сложно объяснить повышение мРНК гена *WNT5A* у пациентов с ПЧО по сравнению с ЗД. Можно предположить, что при успешном лечении ММ экспрессия *WNT5A* чрезмерно повышается для интенсивного восстановления костной ткани. Кроме того, считается, что ген *WNT5A* активно экспрессируется в КМ пациентов с ММ [20]. В исследовании группы, возглавляемой J. Tonon, выявлено, что гиперэкспрессия в клетках ММ рецептора ROR2, лигандом которого является WNT5A, приводит к формированию лекарственной устойчивости, опосредованной клеточной адгезией [37]. Таким образом, повышение транскрипции гена *WNT5A* у пациентов с ПЧО по сравнению с ЗД можно объяснить тем, что после противоопухолевой терапии в поврежденной ГН КМ идут более активные обменные процессы, связанные как с восстановлением костной ткани, так и с экспрессией сигнальных молекул и рецепторов самими опухолевыми клетками ММ. В здоровой ГН уровень белка WNT5A ниже, чем при ММ, т. к. баланс сигнальных путей остеогенеза не нарушен.

В проведенном нами исследовании показано, что у всех пациентов вне зависимости от исхода лечения повышается уровень транскрипции гена *WNT8B.* Известно, что этот ген играет существенную роль в дифференцировке МСК эпителия легких по миофибробластному пути и в развитии идиопатического фиброза [26] наряду с WNT10A и WNT7B [38]. У части пациентов с ММ наблюдается усиление фибротического компонента ГН, что связано с повышением митотической активности опухолевых плазматических клеток и их меньшей дифференцированностью [39]. МСК и фибробласты опухолевой ГН являются основными поставщиками внеклеточного матрикса при фиброзе. Однако для опухолевой ГН подобные

данные отсутствуют. В дальнейшем мы планируем проверить, влияет ли присутствие в среде лиганда WNT8B на состав и уровень экспрессии компонентов внеклеточного матрикса МСК и фибробластами ГН.

Канонический сигнальный путь WNT в норме регулирует важные процессы, однако при ММ он действует в противоположных направлениях. Канонический путь в КМ отвечает за баланс остеобластов и остеокластов, а выделяемые опухолевыми клетками ММ антагонисты WNT-белков ингибируют передачу сигнала и нарушают остеогенез. При этом аутокринные воздействия вызывают внутреннюю каноническую активацию WNT в клетках ММ, что способствует их пролиферации и клональной эволюции опухолевых клеток [35]. В настоящем исследовании экспрессия гена, кодирующего β-катенин, была повышена в ПЧО-МСК по сравнению как с ЗД-МСК, так и с ПБ/НО-МСК. Повышение мРНК гена *CTNNB1* относительно других групп больных ММ (ПБ и НО) можно интерпретировать как результат лечения, приведшего к возобновлению процессов остеогенеза, в которых β-катенин принимает участие. По аналогии с *WNT5A* можно предположить, что высокая экспрессия в группе охЧО относительно группы ЗД обусловлена ускорением процессов остеогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты дают основание предположить, что каскад, связанный с белками семейства WNT, разбалансирован у пациентов с ММ и в этом процессе важную роль играет состояние МСК, которые частично сохраняют опухоль-ассоциированный фенотип. Последнее также способствует развитию лекарственной устойчивости клеток ММ. Таким образом, согласно полученным данным, ГН у пациентов с ММ не восстанавливается полностью после проведенного лечения, в т. ч. на уровне механизмов сигналинга.

Из протестированных в нашем исследовании генов, кодирующих лиганды WNT, два гена (*WNT2B, WNT9B*) значительно отличались по своей экспрессии в группе ПБ. Ген *WNT2B* не был активирован в группе НО. Учитывая, что изоформы лиганда WNT2B вовлечены в процессы дифференцировки и поляризации макрофагов [31], возможно, что его высокий уровень связан с противоопухолевым ответом. Экспрессия гена *WNT15* (по новой классификации *WNT9B*), напротив, была повышена. Ранее показано, что в КМ у ЗД этот ген не транскрибируется. Кроме того, по группам пациентов была показана статистически значимая разница в уровнях транскрипции гена *CTNNB1*.

Результаты оценки уровня мРНК генов *WNT* в МСК опухолевой ГН при ММ позволяют сделать вывод о возможных перспективах определения мРНК генов *WNT2B, WNT9B* и *CTNNB1* в качестве молекулярно-генетических маркеров, позволяющих прогнозировать исход ММ.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования Российской Федерации (проект 15.БРК.21.0011, соглашение № 075-15-2021-1063) в части создания банка клеточных культур МСК пациентов с ММ.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Н.И. Енукашвили, Н.Ю. Семенова.
Сбор и обработка данных: Л.А. Белик, И.И. Кострома, В.А. Балашова.
Предоставление материалов исследования: Л.А. Белик, Н.И. Енукашвили.
Анализ и интерпретация данных: Н.Ю. Семенова, Н.И. Енукашвили, И.С. Мартынкевич.
Подготовка рукописи: все авторы.
Окончательное одобрение рукописи: все авторы.
Административная поддержка: С.С. Грицаев, И.С. Мартынкевич, С.С. Бессмельцев, С.В. Сидоркевич.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим сотрудников Центра клеточных технологий «Покровский» за помощь в культивировании клеток.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ругаль В.И., Бессмельцев С.С., Семенова Н.Ю. и др. Характеристика микроокружения костного мозга при множественной миеломе до и после терапии. Сибирский научный медицинский журнал. 2019;39(1):112–8.

[Rugal VI, Bessmeltsev SS, Semenova NYu, et al. Characteristics of bone marrow environment in multiple myeloma before and after treatment. Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal. 2019;39(1):112–8. (In Russ)]

2. Чубарь А.В., Енукашвили Н.И. Мезенхимные стромальные клетки: роль в формировании гематоонкологической ниши. Цитология. 2020;62(11):763–72. doi: 10.31857/S0041377120110024.

[Chubar AV, Enukashvily NI. Mesenchymal stem cells: role in the formation of hematooncological niche. Tsitologiya. 2020;62(11):763–72. doi: 10.31857/S0041377120110024. (In Russ)]

3. Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Ругаль В.И. Биология ниши гемопоэтических стволовых клеток. Клиническая онкогематология. 2014;7(4):501–11.

[Semenova NYu, Bessmeltsev SS, Rugal VI. Biology of Hematopoietic Stem Cell Niche. Klinicheskaya onkogematologiya. 2014;7(4):501–11. (In Russ)]

4. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, et al. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood Rev. 2006;20(3):161–71. doi: 10.1016/j.blre.2005.11.002.

5. Enukashvily NI, Semenova N, Chubar AV, et al. Pericentromeric non-coding DNA transcription is associated with niche impairment in patients with ineffective or partially effective multiple myeloma treatment. Int J Mol Sci. 2022;23(6):3359. doi: 10.3390/ijms23063359.

6. Бессмельцев С.С. Множественная миелома (патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз). Часть I. Клиническая онкогематология. 2013;6(3):237–57.

[Bessmeltsev SS. Multiple myeloma (pathogenesis, clinical features, diagnosis, differential diagnosis). Part I. Klinicheskaya onkogematologiya. 2013;6(3):237–57. (In Russ)]

7. Albers J, Keller J, Baranowsky A, et al. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. J Cell Biol. 2013;200(4):537–49. doi: 10.1083/jcb.201207142.

8. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. Dev Cell. 2005;8(5):751–64. doi: 10.1016/j.devcel.2005.02.017.

9. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, et al. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFκB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. J Cell Sci. 2006;119(7):1283–96. doi: 10.1242/jcs.02883.

10. Edwards CM, Zhuang J, Mundy GR. The pathogenesis of the bone disease of multiple myeloma. Bone. 2008;42(6):1007–13. doi: 10.1016/j.bone.2008.01.027.

11. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. Gene. 2009;433(1–2):1–7. doi: 10.1016/j.gene.2008.12.008.

12. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, et al. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. Nat Med. 2012;18(3):405–12. doi: 10.1038/nm.2653.

13. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, et al. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(52):20764–9. doi: 10.1073/pnas.0805133106.

14. Семенова Н.Ю., Чубарь А.В., Енукашвили Н.И. и др. Перестройка ключевых элементов стромального микроокружения костного мозга при множественной миеломе. Вестник гематологии. 2020;16(1):15–21.

[Semenova NYu, Chubar AV, Enukashvili NI, et al. Reconstruction of key elements of the stromal microenvironment of the bone marrow in multiple myeloma. Vestnik gematologii. 2020;16(1):15–21. (In Russ)]

15. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. Nat Rev Cancer. 2009;9(9):665–74. doi: 10.1038/nrc2714.

16. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. J Cell Physiol. 2009;219(2):271–5. doi: 10.1002/jcp.21690.

17. Nakamura Y, Nawata M, Wakitani S. Expression profiles and functional analyses of wnt-related genes in human joint disorders. Am J Pathol. 2005;167(1):97–105. doi: 10.1016/s0002-9440(10)62957-4.

18. Kobune M, Chiba H, Kato J, et al. Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. Mol Cancer Ther. 2007;6(6):1774–84. doi: 10.1158/1535-7163.mct-06-0684.

19. Qiang Y-W, Shaughnessy JD Jr, Yaccoby S. Wnt3a signaling within bone inhibits multiple myeloma bone disease and tumor growth. Blood. 2008;112(2):374–82. doi: 10.1182/blood-2007-10-120253.

20. Mahtouk K, Moreaux J, Hose D, et al. Growth factors in multiple myeloma: a comprehensive analysis of their expression in tumor cells and bone marrow environment using Affymetrix microarrays. BMC Cancer. 2010;10:198. doi: 10.1186/1471-2407-10-198.

21. Bolzoni M, Donofrio G, Storti P, et al. Myeloma cells inhibit non-canonical wnt co-receptor ror2 expression in human bone marrow osteoprogenitor cells: effect of wnt5a/ror2 pathway activation on the osteogenic differentiation impairment induced by myeloma cells. Leukemia. 2013;27(2):451–63. doi: 10.1038/leu.2012.190.

22. Qiang Y-W, Chen Y, Stephens O, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. Blood. 2008;112(1):196–207. doi: 10.1182/blood-2008-01-132134.

23. Suthon S, Perkins RS, Bryja V, et al. WNT5B in Physiology and Disease. Front Cell Dev Biol. 2021;9:667581. doi: 10.3389/fcell.2021.667581.

24. Song S, Fan G, Li Q, et al. IDH2 contributes to tumorigenesis and poor prognosis by regulating m6A RNA methylation in multiple myeloma. Oncogene. 2021;40(35):5393–402. doi: 10.1038/s41388-021-01939-7.

25. Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. Stem Cell Rev. 2007;3(1):30–8. doi: 10.1007/s12015-007-0006-6.

26. Shi C, Chen X, Yin W, et al. Wnt8b regulates myofibroblast differentiation of lung-resident mesenchymal stem cells via the activation of Wnt/β-catenin signaling in pulmonary fibrogenesis. Differentiation. 2022;125:35–44. doi: 10.1016/j.diff.2022.03.004.

27. Zmuda JM, Yerges LM, Kammerer CM, et al. Association analysis of WNT10B with bone mass and structure among individuals of African ancestry. J Bone Miner Res. 2009;24(3):437–47. doi: 10.1359/jbmr.081106.

28. Wend P, Wend K, Krum SA, Miranda-Carboni GA. The role of WNT10B in physiology and disease. Acta Physiol (Oxf). 2012;204(1):34–51. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02296.x.

29. Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. Int J Mol Sci. 2019;20(7):1694. doi: 10.3390/ijms20071694.

30. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, et al. Wnt Signaling Regulates B Lymphocyte Proliferation through a LEF-1 Dependent Mechanism. Immunity. 2000;13(1):15–24. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00004-2.

31. Bunaciu RP, Tang T, Mao CD. Differential expression of Wnt13 isoforms during leukemic cell differentiation. Oncol Rep. 2008;20(1):195–201. doi: 10.3892/or.20.1.195.

32. Richter J, Stanley EG, Ng ES, et al. WNT9A Is a Conserved Regulator of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Development. Genes (Basel). 2018;9(2):66. doi: 10.3390/genes9020066.

33. Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M. Expression of WNT14 and WNT14B mRNAs in human cancer, up-regulation of WNT14 by IFNγ and up-regulation of WNT14B by β-estradiol. Int J Oncol. 2001;19(6):1221–5. doi: 10.3892/ijo.19.6.1221.

34. Lu S, Yakirevich E, Yang D, et al. Wnt Family Member 9b (Wnt9b) Is a New Sensitive and Specific Marker for Breast Cancer. Am J Surg Pathol. 2021;45(12):1633–40. doi: 10.1097/pas.0000000000001784.

35. Spaan I, Raymakers RA, van de Stolpe A, Peperzak V. Wnt signaling in multiple myeloma: A central player in disease with therapeutic potential. J Hematol Oncol. 2018;11(1):1–18. doi: 10.1186/s13045-018-0615-3.

36. Van Andel H, Kocemba KA, Spaargaren M, Pals ST. Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanisms and targeting options. Leukemia. 2019;33(5):1063–75. doi: 10.1038/s41375-019-0404-1.

37. Frenquelli M, Caridi N, Antonini E, et al. The WNT receptor ROR2 drives the interaction of multiple myeloma cells with the microenvironment through AKT activation. Leukemia. 2020;34(1):257–70. doi: 10.1038/s41375-019-0486-9.

38. Chen X, Shi C, Cao H, et al. The hedgehog and Wnt/β-catenin system machinery mediate myofibroblast differentiation of LR-MSCs in pulmonary fibrogenesis. Cell Death Dis. 2018;9(6):639. doi: 10.1038/s41419-018-0692-9.

39. Subramanian R, Basu D, Dutta TK. Significance of bone marrow fibrosis in multiple myeloma. Pathology. 2007;39(5):512–5. doi: 10.1080/00313020701570038.