

SOUHRNNÉ PRÁCE • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

Molekulárně cytogenetická analýza plazmatických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem

Balcárková J.¹, Procházková K.¹, Ščudla V.², Holzerová M.¹, Bačovský J.², Zemanová M.², Pospíšilová H.¹, Hanzlíková J.¹, Kropáčková J.¹, Prekopová I.¹, Pika T.², Minařík J.², Indrák K.¹, Jarošová M.¹

¹Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

²III. interní klinika FN a LF UP Olomouc

Souhrn

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné B-buněčné onemocnění charakterizované proliferací a akumulací klonálně změněných plazmatických (myelomových) buněk především v kostní dřeni. Přesto, že příčiny vzniku a vývoje MM nejsou zcela jasné, genetické studie ukázaly, že chromozomové aberace hrají v patogenezi a prognóze pacientů s MM klíčovou roli. Práce ukazuje výsledky cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy souboru 100 pacientů s MM. Pomocí klasického cytogenetického vyšetření byly odhaleny změny u 23 (23 %) pacientů, z toho u 8 pacientů byl nalezen komplexní karyotyp. Doplnění klasické cytogenetiky metodou FICTION odhalilo genetické změny u 97 (97 %) pacientů. Nejčastěji byla pozorována delece *RBI* genu nalezená u 53 (53 %) pacientů, translokace zahrnující *IgH* gen byla zjištěna u 30 (30 %) pacientů a trizomie byly prokázány u 25 (25 %) pacientů. Trizomie postihovaly nejčastěji chromozomy 15 a 9. Cytogenetická a molekulárně cytogenetická analýza souboru 100 pacientů s MM potvrdila vysoký výskyt chromozomových změn a jejich vztah k vyšším stádiím onemocnění. Prognostický význam jednotlivých genetických změn pro celkové přežití zatím nelze hodnotit vzhledem ke krátké době sledování souboru, ale byla prokázána nepříznivá prognóza pacientů s komplexním karyotypem.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, metoda FICTION, delece *RBI* genu, přestavby *IgH* genu, trizomie

Summary

Balcárková J., Procházková K., Ščudla V., Holzerová M., Bačovský J., Zemanová M., Pospíšilová H., Hanzlíková J., Kropáčková J., Prekopová I., Pika T., Minařík J., Indrák K., Jarošová M.: Molecular cytogenic analysis of plasma cells in patients with multiple myeloma

Multiple myeloma (MM) is a B-cell neoplasia characterized by the proliferation and accumulation of clonal plasma cells (myeloma cells) in bone marrow. Although the cause of the origin and development of MM are not well understood, genetic studies revealed that chromosomal aberrations play central role in pathogenesis and prognosis of patients with MM. We present the results of conventional cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of 100 patients with MM. Using conventional cytogenetics chromosomal changes were detected in 23 (23 %) patients, in 8 patients complex karyotype was found. Using FICTION method cytogenetic changes were identified in 97 (97 %) patients. Deletion of *RBI* gene was the most common aberration detected in 53 (53 %) patients, translocations involving *IgH* gene were identified in 25 (25 %) patients. The most common trisomy involved chromosomes 15 and 9. Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of 100 patient with MM confirmed high frequency of chromosomal abnormalities in advanced stages of the disease. Prognostic relevance of particular chromosomal abnormalities for overall survival cannot be evaluated due to short time of follow-up. In our study, the presence of complex karyotype was associated with a significantly shorter overall survival rate.

Key words: multiple myeloma, FICTION, *RBI* deletion, *IgH* rearrangement, trisomy

Trans. Hemat. dnes, 13, 2007, No. 4, p. 176–182.

Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné onemocnění zralých B-lymfocytů charakterizované akumulací neoplasticky transformovaných plazmatických (myelomových) buněk s převahou v kostní dřeni. Proliferace a akumulace myelomových buněk v kostní dřeni je provázána produkcí monoklonálních imunoglobulinů a mnoha cytokinů, které se podílejí na velké variabilitě onemocnění. V současné době zůstává MM nemocí se širokým spektrem klinických příznaků, odlišných léčebných odpovědí a s různou délkou celkového přežití pacientů.

Plazmatické buňky jsou buňky imunitního systému, které produkují značné množství protilátek. Diferencují se z B lymfocytů, které v germinálním centru podstupují modifikaci DNA imunoglobulinových genů (*Ig*) cestou somatické hypermutace, antigenové selekce a rekombinací v genech pro těžké řetězce imunoglobulinů (*IgH*). Buňky postgerminálního centra pak mohou tvořit plazmoblasty, které mají dokončenou somatickou hypermutaci a *IgH* rekombinaci ještě před migrací do kostní dřene, kde stromální buňky umožňují terminální diferenciaci do dlouho žijících plazmatických buněk (1).

Akumulace transformovaných plazmoblastů a plazmatických buněk na mnoha místech kostní dřene necharakte-

rizuje jen MM, ale také monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS), která je považována za benigní onemocnění, ale může transformovat do MM (2). U více než jedné třetiny pacientů dochází k rozvoji MM z MGUS (3).

Téměř u všech pacientů s MM jsou dnes pozorovány chromozomální abnormality, přestože klasická cytogenetická analýza bývá málokdy úspěšná vzhledem k nízkému počtu myelomových buněk v kostní dřeni, jejich nízké mitotické aktivitě a mikroskopicky nehodnotitelné morfologii chromozomů v metafázích. Úspěšná klasická cytogenetická analýza karyotypu bývá spojena s agresivním průběhem nebo pokročilejším stadiem onemocnění a je pozorována až u 40 % pacientů (4, 5).

Pokrok ve studiu chromozomových změn přinesl rozvoj molekulárně cytogenetických metod, zejména fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a její kombinace s metodou imunofluorescenční detekce lehkých řetězců monoklonálních imunoglobulinů v cytoplasmě myelomových buněk, kterou označujeme jako metodu FICTION (6). Kombinace těchto metod umožňuje cílenou detekci chromozomových změn v myelomových buňkách (6, 7).

Na základě recentních poznatků, získaných z cytogenetických a molekulárně genetických studií včetně studií exprese genů čipovými technologiemi, se dnes předpokládá existence dvou hlavních patogenetických cest vývoje tohoto onemocnění: jedna je spojena s hyperdiploidií, druhá je charakterizována translokacemi zahrnujícími gen pro těžký řetězec imunoglobulinu (*IgH*). Hyperdiploidie se vyskytují asi u 50 % pacientů s MM a jsou nejčastěji spojeny s trizomiemi chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21, přičemž nebývá pozorována trizomie chromozomu 13 (8). U hyperdiploidních pacientů se méně často vyskytují *IgH* translokace a delecce *RBI* genu nebo monozomie chromozomu 13. Trizomie stejných chromozomů se vyskytují i u premaligní MGUS (9).

Translokace zahrnující *IgH* gen se vyskytují až u 60 % pacientů, přičemž partnerské geny v translokacích nejsou náhodné a zahrnují lokusy: 11q13 (gen pro *cyklin D1*) v 15 %, 4p16 (geny pro *receptor fibroblastového růstového faktoru 3-FGFR3* a *Multiple Myeloma Set Domain-MMSET*) v 15 %, 16q23 (gen pro *c-maf*) v 5 % a 6p21 (gen pro *cyklin D3*) ve 3 % (10). Tyto translokace jsou většinou způsobeny chybami při VDJ rekombinaci (vytvoření jedinečné kombinace subgenů je jedním ze zdrojů variability protilátek) během vyžívání B buněk v germinálních centrech a vedou k deregulované expresi partnerského genu tím, že partnerský gen je přemístěn do blízkosti zesilovačů transkripce *IgH* genu (10, 11, 12). Obecně jsou translokace zahrnující *IgH* lokus na chromozomu 14q32 považovány za nepříznivý prognostický faktor (13). Výjimkou je t(11;14)(q13;q32), která je v poslední době považována za změnu spojenou s příznivou prognózou, zejména u pacientů léčených vysokodávkovanou chemoterapií (14). Delecce *RBI* genu vyskytující se až u 63 % nemocných (15), bývá spojena se středně příznivou prognózou, pokud se vyskytuje samostatně, výskyt další chromozomové změny, zejména translokace zahrnujících *IgH* gen, prognózu zhoršuje (14, 16). Hyperdiploidní vari-

anta MM bývá spojena s příznivější prognózou a delší dobou přežití (6).

Cílem předložené práce bylo určit:

1. frekvenci a typ chromozomových změn metodou klasické cytogenetické analýzy a metodou FICTION
2. vztah mezi námi nalezenými změnami, klinickým stadiem onemocnění a délkou přežívání pacientů s jednotlivými typy změn.

Materiál a metody

Soubor pacientů

Analýzovaný soubor tvořilo 100 pacientů z období let 2003 až 2006, kteří byli sledováni na III. interní klinice FN a LF UP v Olomouci a cytogeneticky vyšetřeni v cytogenetické laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci. Do souboru byli zařazeni jen pacienti s nově diagnostikovaným onemocněním a jednalo se o 58 mužů a 42 žen ve věku od 44 do 82 let s mediánem věku 61 let. Klinická stadia byla stanovena podle Durie a Salmona. U všech pacientů byla vyšetřena kostní dřeň. U pacientů v klinickém stadiu I bylo v kostní dřeni nalezeno 1,2–16 % plazmatických buněk (medián 8 %), u pacientů ve stadiu II 4,4 – 58 % (medián 22 %), u pacientů ve stadiu III 3,6–82 % (medián 31,3 %). Charakteristika souboru pacientů je uvedena v tabulce 1.

Tab. 1. Klinická charakteristika souboru 100 pacientů s MM.

Počet pacientů	100
Ženy	42 (42 %)
Muži	58 (58 %)
IgG	61 (61 %)
IgA	26 (26 %)
BJ	10 (10 %)
Nesekreční	2 (2 %)
IgM	1 (1 %)
Typ lehkého řetězce M-Ig	Kappa 65 (65 %) Lambda 35 (35 %)
Věk (roky)	Medián 61 Rozptyl 44–82
Stadium (Durie-Salmon)	I. 14 (14 %) II. 40 (40 %) III. 46 (46 %)

Materiál

Odebrané 2 ml kostní dřene do RPMI media s 20 % inaktivního bovinního fetálního séra byly rozděleny na 2 poloviny: pro přímé zpracování a pro 24hodinovou kultivaci při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO₂. Kultury byly dále zpracovány podle standardních cytogenetických postupů (17).

Klasická cytogenetická analýza

Bylo hodnoceno nejméně 20 metafází, z toho 10 karyotypováno. Chromozomy byly hodnoceny podle kritérií ISCN 2005 (18). Za abnormální klon byl označen nálezkou dvou a více metafází se stejnou strukturní abnormalitou nebo se stejnými nadpočetnými chromozomy a nálezkou tří

a více metafází s delecí nebo chyběním stejného chromozomu.

Metoda FICTION

Buněčná suspenze kostní dřeně fixovaná v metanol: octové kyselině (3:1) byla převedena do fixace 96% etanolu následujícím postupem. Suspenze byla centrifugována, supernatant byl odstraněn, pelet byl převrstven 96% etanolem a následně fixován 15 minut při pokojové teplotě. Suspenze buněk byla znovu centrifugována a byl zopakován postup fixace. Takto upravené suspenze buněk byly nakapány na skla, která byla následně obarvena za účelem rozlišení populace klonálních plazmatických buněk pomocí protilátky proti lehkým řetězcům monoklonálního imunoglobulinu (anti-human kappa nebo lambda chain) konjugované s 7-amino-4-metalkumarin-3-octovou kyselinou (AMCA) (Vector Laboratories Burlingame, CA). Fluorescenční signál byl zesílen protilátkou (anti-goat) konjugovanou s AMCA (Vector Laboratories Burlingame, CA). Preparáty byly následně omyty v PBS pufru (fosfátový balancovaný roztok) a dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou (70 %, 80 %, 90 %, 96 % etanol) (4, 7).

Pro vyšetření metodou FISH byly použity centromerické a genové sondy (Abbot-Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA). Pro určení delecí v oblasti 13q14, kde je lokalizován *RB1* gen, byla použita sonda LSI D13S25 SO (SO = sonda značená fluorochromem SpectrumOrange). Přestavby *IgH* genu byly vyšetřeny sondou LSI *IgH* Dual Color, Break Apart Rearrangement a po zjištění přestavby byly pro identifikaci partnerských genů použity následující sondy: LSI *IgH/CCND1* Dual Color Dual fusion, *IgH/FGFR3* Dual Color Dual Fusion, LSI *IgH/MAF* Dual Color Dual Fusion. K určení nejčastějších trisomií byly použity centromerické sondy: Cep 7 SO, Cep 9 SG, (SG = sonda značená fluorochromem SpectrumGreen), Cep 11 SG, Cep 15(satelit III) SG a Cep 17 SG.

Hybridizace byla provedena podle návodu výrobce sondy a preparáty byly hybridizovány při 37 °C přes noc. Po omytí skel v sérii mycích roztoků byla suchá skla zamontována do roztoku Antifade (QBiogene, MP Bio-medicals, CA) a následně hodnocena pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného příslušnými fluorescenčními filtry a CCD kamerou a analyzována pomocí softwaru ISIS (MetaSystems Althusheim, Německo). U každého pacienta bylo hodnoceno 50 imunofluorescenčně značených plazmatických buněk. Hraniční hodnota pozitivita použitých sond (cut-off level) byla stanovena na 20 %.

Metoda mnohobarevné FISH (M-FISH)

Metoda M-FISH (18) byla použita pro přesné určení chromozomových změn u nemocných s komplexním karyotypem. Preparáty byly hybridizovány 72 hodin s kitem 24X Cyt DNA Probe (MetaSystems Althusheim, Německo) podle návodu výrobce.

Cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření

byla prováděna na základě vyšetřovacího algoritmu, uvedeného na obrázku 1.

Výsledky

Klasická cytogenetická analýza

Klasickou cytogenetickou analýzou pomocí G-pruhování byly odhaleny změny u 23 pacientů (23 %). Hyperdiploidie a polyploidie byly nalezeny u 4 pacientů, komplexní přestavby u 8 pacientů a u 11 pacientů byly zjištěny jiné změny v karyotypu, nejčastěji se jednalo o ztrátu části nebo celého chromozomu. Výsledky klasické cytogenetické analýzy pacientů s komplexními přestavbami jsou uvedeny v tabulce 2. Změny v karyotypu byly nalezeny pouze u pacientů ve stadiu II a III. Normální karyotyp byl nalezen u 48 pacientů (48 %). U 29 pacientů (29 %) nebyla klasická cytogenetická analýza úspěšná. Hodnocení prognostického významu ukázalo nepříznivou prognózu pacientů s komplexním karyotypem, jejichž medián přežívání je 9,5 měsíce. Graf 1 zobrazuje statisticky významný rozdíl v celkovém přežívání souboru pacientů s normálním a komplexním karyotypem.

Metoda M-FISH

Výsledky metody M-FISH u pacientů s komplexním karyotypem jsou uvedeny v tabulce 2.

Metoda FICTION

Delece *RB1* genu (13q14)

Delece 13q14 byla nalezena u 53 pacientů (53 %). U 18 pacientů byla nalezena tato delece jako samostatná změna. U 16 pacientů byla nalezena delece *RB1* genu společně s parciální delecí nebo delecí celé jedné kopie *IgH* genu. Pacienti s delecemi těchto genů byli ve všech stadiích: ve stadiu III – 7 pacientů, ve stadiu II – 5 a ve stadiu I – 4 pacienti.

U 19 pacientů byla nalezena delece *RB1* genu společně s přestavbou nebo s přestavbou a dalšími změnami v *IgH* genu. Podrobněji se o této skupině pacientů zmíníme v části věnované popisu změn v *IgH* genu.

Procentuálně byla delece *RB1* genu zastoupena v myelomových buňkách v rozmezí 20–100 % (medián 83 %).

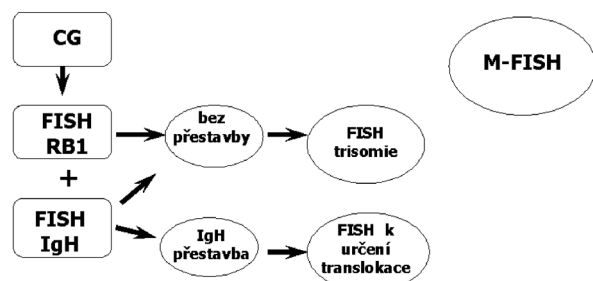
Změny *IgH* genu (14q32)

Změny v *IgH* genu byly zjištěny u 53 pacientů (53 %). U 18 pacientů byly zjištěny pouze změny v *IgH* genu a u 35 pacientů byly změny v *IgH* genu nalezeny současně s delecí *RB1* genu. Přestavba *IgH* genu byla zjištěna u 30 pacientů. U některých pacientů byly nalezeny i další změny v tomto genu, které jsou uvedeny v tabulce 3. Procentuálně byla delece *IgH* genu zastoupena v myelomových buňkách v rozmezí 20–100 % (medián 83 %).

Pacienti s přestavbou *IgH* genu byli dále vyšetřováni s cílem identifikovat partnerský gen zahrnutý do translokace. U 13 pacientů byla zjištěna t(11;14), t(4;14) byla nalezena u 12 a t(14;16) u 4 pacientů. U 1 pacienta se nepodařilo partnerský gen určit. Mezi pacienty s t(11;14)

Tab. 2. Výsledky klasické cytogenetické analýzy a metody M-FISH u pacientů s komplexním karyotypem.

	Klasická cytogenetika-karyotyp	M-FISH karyotyp
1.	49-51,XX,+der(1),-2,+3,+9,?der(11), +2-4mar[cp3]/52,X,-X,+der(1),+1p,-2,+3,?+7,+9, -11,-13,-14,+15,+21,+4mar[cp3]/46,XX[2]	49,XX,der(2)t(1;2)(q?12;q?32),+3,+7,+der(9)t(9;19)(p?13;q?13),+15, der(18)t(1;18)(q?12;q?22),+der(19)t(9;19)(p?13;q?13),-22[3]/52,X,-X, der(2)t(1;2)(q?12;q?32),+3,+7,+der(9)t(9;19)(p?13;q?13),+15,+15,der(18) t(1;18)(q?12;q?22),+der(19)t(9;19)(p?13;q?13),+21[2]/46,XX[2]
2.	47,XY,+mar[2]/57-58,XY,+2,+6,+7,-8,-11,14,+15, -16,+18,+19,+19,+22+2-3mar[cp3]/46,XY[23]	neprovedena
3.	43-46,XX,-13,-14,+1-3mar [cp6] / 46,XX[2]	44,XX,der(7)t(1;7)(?;q?22),-13,-14[3]
4.	68-82,XY,komplex.přestavby, 3-5mar[cp9]/46,XY[13]	70,XY,+X,+1,+2,+3,+4,+5,+6,+7,+8,+9,+10,+11,+12,+15,+15,+16,+17,+17, der(18)t(1;18)(q?12;q?22),der(18)t(1;18)(q?12;q?22)t(18;19)(p?;q?), +der(18)t(1;18)(q?12;q?22)t(18;19)(p?;q?),+20,+21[3]/46,XY[2]
5.	53-55,+15,+16,+18,+20,+21,+22, +1-3M[3]/46,XY[12]	neprovedena
6.	55-58,XX,komplex.přestavby,+mar[cp11]/60-120 [6]/46,XX[14]	neprovedena
7.	46-55,XX, + 3-4mar[cp4]/46,XX[4]	neprovedena
8.	54-55,XX,der(3),+der(3),+5,+6,+7,+8+9, -10,?+der(11),+der(14),+der(16),+17, -18[7]/46,XX[13]	55,XX,der(3)t(3;X)(q?26;q?),+der(3)t(3;X), (q?26;q?),+5,+6,+7,+9,+11,+15,der(16)t(4;16)(?;q?),+17,der(18)t(11;18) (q?22;p?11),+19[3]/46,XX[4]

Základní vyšetření Identifikace změn Složitější přestavby**Obr. 1.** Schéma postupu vyšetření kostní dřeně u pacientů s MM.**Vysvětlivky k obrázku 1**

CG - klasická cytogenetická analýza,

FISH - fluorescenční in situ hybridizace

M-FISH - Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace

byli 4 pacienti, u kterých jsme tuto translokaci nalezli společně s delecí *RB1* genu. Tito pacienti byli ve stadiích I–III dle Durie-Salmona. Pacienti s t(4;14) byli převážně ve vyšším stadiu choroby (stadium II – 3 pacienti a stadium III – 8 pacientů a 1 pacient byl ve stadiu I). U 9 ze 12 pacientů byla tato translokace nalezena současně s delecí *RB1* genu. U 4 pacientů byla nalezena t(14; 16). Tito pacienti byli ve stadiích III (3 pacienti) a II (1 pacient). U všech byla t(14; 16) nalezena společně s delecí *RB1* genu.

U 10 nemocných byly zjištěny parciální delecce *IgH* genu (3' konce u 7 a 5' konce u 3 pacientů). U 7 pacientů byla zjištěna parciální delecce *IgH* genu v kombinaci s delecí *RB1* genu. Tito pacienti již nebyli dále vyšetřováni.

Parciální delecce byla zjištěna u pacientů ve všech stadiích MM.

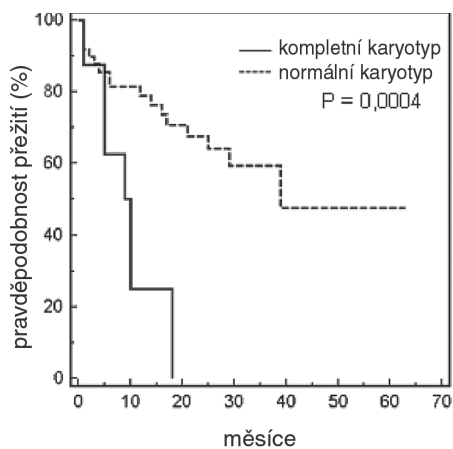
Početní změny *IgH* genu byly nalezeny u 12 pacientů (12 %). U 10 pacientů byla zjištěna delecce celé jedné kopie *IgH* genu a ve 2 případech byl naopak prokázán výskyt 3 kopií *IgH* genu. U 9 z 10 pacientů s delecí celé jedné kopie *IgH* genu byla současně nalezena také delecce *RB1* genu. Početní změny *IgH* genu byly nalezeny u pacientů ve všech stadiích MM.

Trisomie

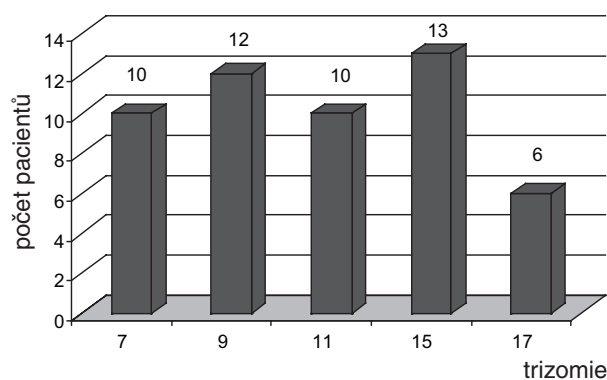
U 28 (28 %) pacientů jsme nenalezli delecce *RB1* genu ani změny v *IgH* genu. Tyto pacienty a další 2 pacienty se 3 kopiemi *IgH* genu jsme dále vyšetřovali na přítomnost trizomií chromozomů 7, 9, 11, 15 a 17. Alespoň jeden trizomický chromozom jsme nalezli u 25 pacientů. Nejčastěji byly nalezeny trisomie chromozomů 15 a 9, méně často trisomie chromozomů 7, 11 a 17. Nejvíce pacientů mělo trisomii dvou chromozomů. Zastoupení jednotlivých trizomií je vyobrazeno v grafu 2 a 3. U 2 pacientů byla nalezena monozomie jednoho z vyšetřovaných chromozomů (chromozom 15, resp. 17). U 3 pacientů nebyla nalezena trisomie žádného chromozomu

Tab. 3. Výsledky metody FISH se specifickou LSI IGH sondou.

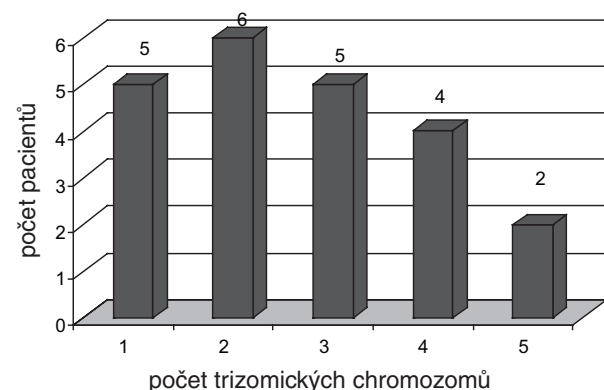
Typ změny v IgH genu	Počet pacientů
Přestavba	20
Přestavba + parciální delecce	1
Přestavba + parciální duplikace	3
Přestavba + početní změny	3
Přestavba obou alel	3



Graf 1. Kaplan-Mayerova křivka přežívání pacientů s normálním a komplexním karyotypem.



Graf 2. Zastoupení nejčastějších trizomií chromozomů v souboru 100 pacientů s MM.



Graf 3. Zastoupení počtu chromozomů s trizomií v souboru 100 pacientů s MM.

a u těchto pacientů se nepodařilo prokázat ani výskyt žádné jiné z vyšetřovaných změn. Z těchto pacientů byli 2 ve stadiu III a 1 ve stadiu II.

Hodnocení chromozomových změn a klinických dat

Nalezené chromozomové změny jsme hodnotili z hlediska stadia onemocnění a typu secernovaného M-Ig. Výsledky ukázaly, že nejvíce změn bylo nalezeno u nemocných ve vyšších stadiích, kdy byly odhaleny i chromozomové změny pomocí klasické cytogenetické analýzy. U pacientů ve stadiu II byly nalezeny změny

Tab. 4. Zastoupení studovaných chromozomových změn v jednotlivých stadiích onemocnění MM.

Stadia nemoci (Durie a Salmon)	I. (n = 14)	II. (n = 35)	III. (n = 46)
G-pruhování-změny	0	10	14
Delece RB 1	0	12	7
Změna v IgH	4	3	9
RB1+IgH	6	12	18
TRISOMIE	4	10	9
MONOSOMIE	0	1	1
BEZE ZMĚN	0	1	2

u 34 (94 %) ze 36 pacientů. U pacientů ve stadiu III byly nalezeny změny u 44 (96 %) ze 46 pacientů. Výsledky ve vztahu ke stadiu choroby jsou shrnuty v tabulce 4. Zastoupení změn podle typu secernovaného M-Ig bylo rovnoměrné. Změny byly nalezeny i u pacienta s IgM typem M-Ig a u pacientů s B-J proteinem a nesekreční formou MM. U pacientů s IgG proteinem byly změny prokázány u 58 (97 %) z 60 pacientů a u jedinců s IgA proteinem byly změny nalezeny u 24 (96 %) z 25 pacientů.

Prognostický význam jednotlivých genetických změn pro celkové přežití zatím hodnotit nelze, vzhledem ke krátké době sledování souboru. Jednoznačně byl potvrzen vysoce prognosticky nepříznivý význam nálezu komplexního karyotypu.

Diskuse

Cytogenetická a molekulárně cytogenetická analýza souboru 100 pacientů s MM odhalila u 97 % nemocných výskyt chromozomových změn. Výsledky uvedené v této práci jsou shodné s výsledky dalších autorů, kteří se věnují studiu chromozomových změn u nemocných s MM (6, 10, 19).

Klasickou cytogenetickou analýzou byly změny nalezeny u 23 % pacientů. Literatura uvádí, že klasickou cytogenetickou analýzou je možné detekovat změny v karyotypu u 30–50 % pacientů s MM (14). Debes-Marun et al. (6) dokonce uvádí úspěšnost klasické cytogenetické analýzy u pacientů s MM ještě nižší a to v rozmezí od 18 do 35 %.

MM patří do skupiny lymfoproliferativních nemocí, u kterých je velmi obtížné získat dostatečný počet kvalitních metafází pro cytogenetickou analýzu pomocí G-pruhování. Pomocí G-pruhování jsou nejvíce detekovatelné aneuploidie, z translokací zahrnujících *IgH* lokus je možné rozpoznat pouze t(11;14). Ostatní translokace jsou pomocí klasické cytogenetické analýzy nepoznatelné především proto, že zahrnují telomerické oblasti obou partnerských chromozomů (20, 21).

K přesnější analýze cytogenetických změn u pacientů s MM jsme použili FISH v kombinaci s imunofluorescenčním značením myelomových buněk (FICTION). Touto metodou jsme analyzovali výskyt nejčastějších chromozomových změn jen v myelomových buňkách (delece *RBI* genu, změny v *IgH* genu a trizomie).

Delece *RBI* genu jako samostatná změna byla pozorována u 18 % nemocných, celkově byla metodou FICTION určena delece *RBI* v 53 % případů. Tyto nálezy jsou ve shodě s nálezy dalších autorů, kteří určili tuto deleci u 42 % (22) a 38 % pacientů (19). Byl ale pozorován i vyšší výskyt této chromozomové změny, např. nález delece *RBI* genu u 63 % pacientů (14). Delece *RBI* genu je spojena se středně příznivou prognózou, pokud se vyskytuje samostatně, výskyt další chromozomové změny, zejména translokací zahrnujících *IgH* gen prognózu zhoršuje (15, 16).

Literatura uvádí, že delece *RBI* genu má středně příznivý prognostický význam, pokud se vyskytuje jako samostatná změna. Naopak, nález další změny zhoršuje prognózu pacientů (14, 16). V našem souboru žije 12 z 18 pacientů, u kterých byla nalezena pouze delece *RBI* genu a pouze polovina pacientů (8/16), u kterých byla nalezena delece *RBI* genu společně s delecí *IgH* genu.

Protože metoda FICTION dovoluje určit změny přímo v plazmatických buňkách, využili jsme ji i k hodnocení procentuálního zastoupení delece *RBI* genu v myelomových buňkách. To se pohybovalo v rozmezí mezi 20–100 % s mediánem 83 %. Podobné výsledky hodnocení zastoupení delece *RBI* genu v myelomových buňkách uvádí i další autoři (22) a to v rozmezí 34–99 % (medián 82 %).

Další chromozomové změny, které byly cílem našich analýz, byly změny *IgH* genu. Nejčastější změnou jsou chromozomové translokace, které vedou k deregulaci partnerského genu přemístěného do blízkosti zesilovačů transkripce (11). Do translokace s *IgH* lokusem vstupuje řada partnerských chromozomů, avšak u MM mezi nejvíce zastoupené partnerské geny patří: *CCND1* (11q13), *FGFR3* a *MMSET* (4p16), *C-MAF* (16q23) a *CCND3* (6p21) (22). Obecně jsou tyto translokace zahrnující *IgH* gen považovány za nepříznivý prognostický faktor (13). Výjimku tvoří t(11;14)(q13;q32), která je v poslední době spojována s příznivou prognózou především u pacientů léčených vysokodávkovanou chemoterapií (15, 16). Translokace t(11;14), jejíž výsledkem je fúze genů *IgH/CCND1* byla v našem souboru nalezena u 13 (13 %) pacientů, z toho u 4 pacientů v kombinaci s delecí *RBI* genu. Spojení t(11;14) s delecí *RBI* je v literatuře udáváno jako málo časté. Uvádí se, že mezi pacienty s delecí nebo monozomií chromozomu 13 je 19 % pacientů s t(11;14) (9). Z 13 pacientů, u kterých byla prokázána t(11;14), žije v době analýzy souboru 10 pacientů. Mezi pacienty s t(11;14) byli 4 pacienti, kteří měli t(11;14) dohromady s delecí *RBI* genu, všichni tito pacienti žijí.

Druhou nejčastější translokací je t(4;14), která byla potvrzena lokus specifickou sondou u 12 (12 %) pacientů, u 9 (9 %) pacientů byla také zjištěna přítomnost delece *RBI* genu. Koexistence t(4;14) a delece *RBI* genu se uvádí téměř u všech pacientů s t(4;14) (3), což souhlasí s nálezem v našem souboru. Dále jsme potvrdili nepříznivou prognózu této translokace: v našem souboru žije jen polovina z 12 pacientů. Poslední studovaná translokace t(14;16) byla nalezena u 4 (4 %) nemocných, ve

všech případech s koexistencí delece *RBI* genu. Tento nález potvrzuje i studie dalších autorů (7). Výsledky výskytu posledních dvou translokací v našem souboru jsou ve shodě s dalšími pracemi (16), které potvrdily výskyt těchto translokací vždy společně s delecí *RBI* genu. U 1 (1 %) pacienta se nám nepodařilo určit partnerský gen zahrnutý v *IgH* translokaci, avšak přestavba *IgH* genu metodou FICTION byla nalezena.

U *IgH* genu jsme neidentifikovali jen přestavby tohoto genu, ale i různě rozsáhlé delece a početní změny. Parciální delece 5' konce *IgH* genu byla zjištěna u 3 (3 %) pacientů. Obecně je tato delece považována za fyziologický jev, který může vzniknout během přeskupování subgenů. Parciální delece 3' konce byla nalezena v 7 (7 %) případech. Význam této delece je stále nejasný (24).

U pacientů, u nichž byl nalezen pouze jeden signál pro *IgH* gen se může jednat o monozomii chromozomu 14. Tato změna byla nalezena u 10 (10 %) pacientů. Často bývá monozomie chromozomu 14 spojena s monozomií chromozomu 13. Obě monozomie pak bývají asociovány s hypodiploidním MM. Hypodiploidní MM je spojován s monozomiemi více chromozomů a také s kratší dobou přežití. Uvádí se až 28 % četnost monozomie chromozomu 14 (6). V našem souboru se u všech pacientů vyskytovala delece celé jedné kopie *IgH* genu vždy s delecí *RBI* genu, z čehož můžeme usuzovat i možný výskyt monozomie obou chromozomů.

U 2 (2 %) pacientů byly nalezeny 3 kopie *IgH* genu, což může znamenat i trizomii chromozomu 14, jejíž 3 % četnost je uváděna v literatuře (6).

Pacienti, u kterých nebyla nalezena změna v *IgH* genu ani delece *RBI* a další 2 pacienti se 3 kopiemi *IgH* genu, byli dále vyšetřováni na přítomnost trizomií chromozomů 7, 9, 11, 15 a 17. Tyto chromozomy jsou v literatuře nejčastěji považovány za trizomické (9, 23). Jejich trizomie jsou spojovány s hyperdiploidní variantou MM, která je charakterizována množstvím trizomií a nízkým výskytem *IgH* translokací a delecí *RBI* genu (6, 10). Trizomie jsme našli u 25 (25 %) pacientů, což je mírně nižší výskyt než v jiných studiích. Další autoři uvádí nález trizomií u 31 % (6) a 39 % pacientů (25). Byl však také pozorován výskyt trizomií téměř u poloviny pacientů (23).

Cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření souboru 100 nemocných s MM potvrdilo vysoký výskyt chromozomových změn nalezených u 97 % pacientů. V souboru pacientů byl pozorován vysoký výskyt chromozomových změn zejména ve vyšších stadiích onemocnění. Prognostický význam jednotlivých genetických změn pro celkové přežití zatím nelze hodnotit vzhledem ke krátké době sledování souboru. Jednoznačně byl potvrzen vysoce prognosticky nepříznivý význam komplexního karyotypu.

Výsledky naší cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy souboru 100 pacientů stále více naznačují, že cytogenetické abnormality u MM by mohly sloužit k bližší charakterizaci jednotlivých subtypů MM a mohly by být využity i při rozhodování o volbě vhod-

ného léčebného postupu zejména při využití nových léků s biologickým účinkem jako je bortezomib nebo talidomid. Pro takové využití jsou nutné další komplexní studie, které by ukázaly jak klinický význam sledování významných prognostických faktorů (26, 27), tak nejnovější data cytogenetických a molekulárně cytogenetických studií, včetně výsledků analýz čipovými technologiemi.

Práce je podporována grantem NR-8183-4,
MSM 6198959205

Literatura

- Kuehl M, Bergsagel PL. Multiple myeloma. Evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews* 2002; 2: 175–187.
- Kyle AR, Therneau TM, Rajkumar V, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *NEJM* 2002; 346: 564–569.
- Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features and clinical presentation. *Blood* 2002; 99: 2185–2191.
- Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S, et al. Chromosome abnormalities clustering and its implication for pathogenesis and prognosis in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 427–36.
- Ho PJ, Campbell LJ, Gibson J, Brown R, Joshua D. The biology and cytogenetics of multiple myeloma. *Rev Clin Exp Hematol* 2002; 63: 276–300.
- Ahmann GJ, Jalal SM, Juneau AL, et al. A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 101: 7–11.
- Fonseca R, Bailey RJ, Ahman GJ, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002; 100: 1417–1424.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6333–6338.
- Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken E. The recurrent IgH translocation associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 2003; 102: 2562–2567.
- Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl MW, Anderson KC. Advantages in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004; 104: 607–615.
- Janssen JW, Vaandrager JW, Heuser T, et al. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, *myeov*, and *cyclin D1* in a subset of multiple myeloma cell lines with t(1114)(q13q32). *Blood* 2000; 95: 2691–2698.
- Shaugnessy Jr 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: 217–223.
- Smadja NV, Bastard Ch, Brigaudeau Ch, et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98: 2229–2238.
- Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biological implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101: 4569–4575.
- Nilsson T, Hoglund M, Turesson I, et al. High frequencies of chromosomal aberrations in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance in direct chromosomal preparation. *Br J Haematol* 2004; 126: 487–494.
- Dewald G, Therneau T, Larson D, et al. Relationship of patients survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase cells at diagnosis of myeloma. *Blood* 2005; 106: 3553–3558.
- Jarsova M, Holzerova M, Mihal V, et al. Complex karyotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: cytogenetic and molecular cytogenetic study of 21 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 145: 161–168.
- Shaffer LG, Tommerup N, Karger S. ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel 2005.
- Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum β_2 microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001; 97: 1566–15.
- Finelli P, Fabris S, Zagano S, et al. Detection of t(414)(p16.3q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by double color fluorescent in situ hybridization. *Blood* 1999; 94: 724–732.
- Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, et al. Frequent dysregulation of *c-maf* protooncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998; 91: 4457–4463.
- Avet-Loiseau H, Daviet A, Saunier S, et al. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol* 2000; 111: 1116–1117.
- Bergsagel P, Kuehl M, Zhan F, et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005; 106: 296–303.
- Wlodarska I, Matthews EV, Pospisilova H, et al. Telomeric *IgH* losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic V_H recombination events. *J Mol Diagnostics* 2007; 9: 47–54.
- Nilsson T, Lenhoff S, Rylander L. A pooled analysis of karyotypic patterns, breakpoints and imbalances in 783 cytogenetically abnormal multiple myelomas reveals frequently involved chromosome segments as well as significant age- and sex-related differences. *Br J Haematol* 2003; 120: 960–969.
- Ščudla V, Adam Z. pohled na diagnostiku a prognostické faktory u mnohočetného myelomu. *Transfúze a hematologie dnes*, 2005; 11(Suppl 2): 24–26.
- Ščudla V, Pika T, Budíková M, Ordeltová M, Minařík J, Zemanová M, Bačovský J, Srovnalík K. Česká myelomová skupina. Příspěvek k hodnocení vztahu angiogenních cytokinů a vybraných biologických ukazatelů k prognostickým faktorům mnohočetného myelomu. *Čas Lék čes* 2006; 45: 929–935.

Mgr. Jana Balcárková
Hemato-onkologická klinika LF a FN Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: j.balcarkova@seznam.cz