

# Význam a současné možnosti diagnostiky cytogenetických změn u mnohočetného myelomu

P. Kuglík<sup>1</sup>, H. Filková<sup>2</sup>, A. Oltová<sup>2</sup>, R. Hájek<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra genetiky a molekulární biologie Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty MU, Brno, vedoucí katedry prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

<sup>2</sup> Oddělení lékařské genetiky, FN Brno, pracoviště dětské medicíny Černá Pole, vedoucí oddělení prim. MUDr. Renata Gaillyová

<sup>3</sup> Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bobunice, přednosta prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

**Souhrn:** Mnohočetný myelom je zhoubné onemocnění způsobené maligní transformací B-buňky, její klonální proliferací a akumulací vzniklé populace myelomových buněk v kostní dřeni. Tyto buňky se vyznačují značnou genetickou nestabilitou. Výskyt početních i strukturních chromozomových změn v myelomových buňkách je důležitým prognostickým faktorem, který ovlivňuje rozdělení pacientů do jednotlivých podskupin s odlišným průběhem onemocnění a má vliv na další léčebný postup. Práce shrnuje metodické přístupy a současné možnosti klasické i molekulární cytogenetiky při vyšetřování cytogenetických změn u mnohočetného myelomu. Jsou prezentovány nejčastější typy početních i strukturních chromozomových změn vyskytujících se v karyotypu nemocných s mnohočetným myelomem a jejich prognostický význam.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom – cytogenetika – FISH – chromozomové aberace – delece 13q14 – translokace t(4;14), t(11;14), t(14;16) – delece p53 – amplifikace 1q21

## The significance and current diagnostic options of cytogenetic changes in multiple myeloma

**Summary:** Multiple myeloma is a malignant disease caused by malign transformation of B-cells, their clonal proliferation and the accumulation of myeloma cells in the bone marrow. These cells are set apart by a pronounced genetic instability. Chromosomal abnormalities are probably the most important prognostic factors in myeloma which influence the division of the patients into individual sub-groups each with a different developmental process of the disease and thus a different approach during treatment. The study summarizes the methodological approaches and current options in classical and molecular cytogenetics during the examination of cytogenetic changes in multiple myeloma. It presents the most common types of numerical and structural chromosomal changes found in the karyotype of multiple myeloma patients, and their prognostic importance.

**Key words:** multiple myeloma – cytogenetics – FISH – chromosomal aberrations – deletion 13q14 – translocation t(4;14), t(11;14), t(14;16) – deletion p53 – amplification 1q21

## Cytogenetické vyšetření u pacientů s mnohočetným myelomem a jeho význam

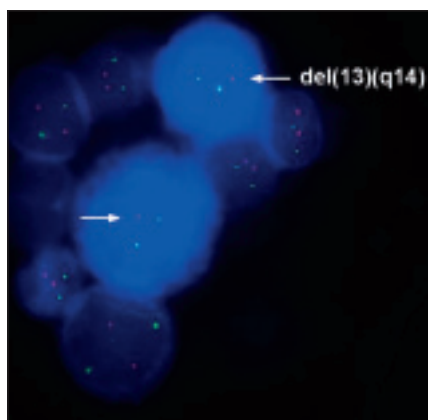
Obdobně jako u jiných hematologických malignit i u mnohočetného myelomu (MM) se často setkáváme se specifickými početními i strukturními abnormalitami chromozomů. Karyotypová nestabilita nádorových plazmatických buněk je časným rysem onemocnění, bývá přítomna i u pacientů s monoklonální gama-

patií nejasného významu (MGUS), tedy prekanceróze, která se může postupně vyvinout do MM. Dnes je známo, že téměř všichni nemocní s MM mají chromozomální abnormality. Vstupní cytogenetický nálezn je v posledních letech považován u nemocných s MM za rozhodující prognostický faktor. Zkušený lékař dokáže na základě hodnot věku,  $\beta$ -2 mikroglobulinu, albuminu a výsledku cytogenetického hodnocení pře-

dem odhadnout, zda má daný nemocný málo agresivní onemocnění s šancí na více než 5leté přežití, nebo naopak nebude dlouhodoběji úspěšné ani provedení autologní transplantace. Proto je nezbytné, aby toto vyšetření patřilo k základnímu vyšetření ve specializovaném centru.

## Metody cytogenetického vyšetření

K základním metodám cytogenetického vyšetření u MM patří kon-



**Obr. Ukázka maligní plazmatické buňky pacienta s MM značené pomocí imunofluorescenčního barvení cytoplazmatických imunoglobulinů (modrá barva) a hybridizované s LSI 13q14 (red)/13q34 (green) DNA sondou (Vysis-Abbott). Buňky vykazují delecí oblasti 13q14 na chromozomu 13 (jeden červený signál chybí).**

venční cytogenetická analýza prováděná na mitózách nádorových buněk pomocí G-pruhování chromozomů. Výchozím materiálem je krátkodobě (24 hod) kultivovaná kostní dřev. Cytogenetická diagnostika u MM je poměrně složitá vzhledem k ložiskovému charakteru onemocnění, nízké infiltraci kostní dřevě a proliferační aktivitě maligních plazmatických buněk. Klonální chromozomové aberace se podle literárních údajů vyskytují při konvenční cytogenetické analýze asi jen u 20–30 % nemocných s MM [6].

Značný pokrok v cytogenetice MM znamenal v posledních letech zavedení moderních molekulárně cytogenetických metod, zejména techniky fluorescenční hybridizace in situ (FISH), která využívá k detekci chromozomových změn specifické DNA sondy. Základem technik molekulární cytogenetiky je hybridizace in situ, která se aplikuje v různých metodických obměnách podle typu používaných DNA sond. Metody hybridizace in situ jsou založeny na schopnosti vazby jednořetězcové DNA s komplementárními úseky cílové DNA, která je fixovaná na mikroskopickém

preparátu. Od poloviny 80. let minulého století se nejčastěji používají DNA sondy značené fluorescenčním barvivem. Preparáty s navázanou sondou je pak možné pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu – početní i strukturální změny chromozomů můžeme odhalit na základě počtu a polohy jednotlivých fluorescenčních signálů, a to nejen na metafázních chromozomech, ale i v interfázních (nedělících se) jádrech. V současné době již existuje široké spektrum komerčně dodávaných specifických DNA sond, které jsou cíleně určeny pro vyšetřování chromozomových abnormalit u pacientů s MM.

Je třeba zdůraznit, že účinnost cytogenetického vyšetření MM výrazně zvyšují metody, které umožňují identifikovat maligní plazmatické buňky. K vyššímu záchytu chromozomových aberací u pacientů s MM se proto používá selektivní imunofluorescenční značení nádorových plazmatických buněk v kostní dřevě pomocí monoklonálních protilátek proti  $\lambda$ - a  $\kappa$ -řetězcům cytoplazmatických imunoglobulinů (cIg-FISH) [1], případně molekulárně cytogenetické vyšetření myelomových buněk získaných pomocí magneticky aktivované separace buněk (MACS) [3,9]. Pomocí těchto moderních metod bylo zjištěno, že až 90 % pacientů s MM má v plazmatických buňkách chromozomové abnormality, obvykle komplexního charakteru, které zahrnují početní i strukturální aberace.

### **Chromozomové změny u pacientů s MM a jejich prognostický význam**

Velmi častým nálezem u nemocných s MM jsou pouze početní odchylky chromozomů, tzv. aneuploidie, které se vyskytují asi u 2/3 pacientů [4,8]. Přibližně ve 40 % případů se jedná o tzv. hypodiploidii, to znamená, že v buňkách maligních klonů je přítomno méně než 46 chromozomů. Nejčastěji se vyskytuje monozomie chromozomů 13, 14, 16 a 22, ale chybět může i kterýkoliv další chromozom.

Ztráty chromozomů bývají často asociovány se strukturálními aberacemi (např. se změnami chromozomu 14 v oblasti 14q32). Nález hypodiploidie je podle literatury považován za důležitý prognostický faktor, který je provázen špatnou odpovědí na terapii a krátkým celkovým přežitím. Dalších přibližně 60 % pacientů s MM má hyperdiploidii, tj. klonální zmnožení jednoho či více chromozomů. Nejčastěji bývají zmnoženy chromozomy 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21. Podle údajů v literatuře bývá nález hyperdiploidního buněčného klonu obvykle spojen s lepší prognózou. Hyperdiploidie však mohou být rovněž asociovány s dalšími strukturálními aberacemi, velmi často například s abnormalitami úseku 13q, což má za následek zhoršení prognózy onemocnění.

Nejčastějšími strukturálními představami u MM jsou chromozomové translokace zahrnující lokus pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) na 14. chromozomu v oblasti 14q32, které jsou popisovány u 10–60 % nemocných při použití konvenční cytogenetické analýzy a až u 50–70 % nemocných při použití techniky FISH [5]. Obecně jsou považovány tyto přestavby za nepříznivý prognostický ukazatel, zatímco nemocní bez přestavby 14q32 (asi 25 % pacientů s MM) mají podle literárních údajů střední prognózu. K nejčastějším přestavbám zahrnujícím IgH lokus patří translokace  $t(11;14)(q13;q32)$ , která se vyskytuje u 13–20 % nemocných s MM. Podle některých autorů je provázena delším celkovým přežitím nemocných a na rozdíl od ostatních přestaveb 14q32 je považována spíše za příznivý prognostický ukazatel. Další specifickou strukturální aberací postihující IgH lokus je  $t(4;14)(p16;q32)$ , která je popisována u asi 10–20 % nemocných s MM. Tato translokace je obvykle provázena velmi agresivním průběhem onemocnění.

Nepříznivou prognózu pro nemocné znamená rovněž nález trans-

lokace t(14;16)(q32;q23), která se vyskytuje asi u 5 % případů s primárním MM a je spojena s kratším přežitím a agresivním průběhem onemocnění.

Za velmi důležitý prognostický faktor je považována delece dlouhých ramen chromozomu 13-del(13)(q), která se při klasickém cytogenetickém vyšetření objevuje u 15–20 % a při použití FISH až u 38–54 % nově diagnostikovaných pacientů s MM [4,7]. Většina autorů považuje aberaci za špatný prognostický ukazatel zejména v kombinaci s delecí 17p13 a t(4;14). Při ztrátách na 13q pravděpodobně dochází k inaktivaci kandidátního tumor-supresorového genu. Rozsah delece může být různý, u většiny nemocných (až 90 %) pravděpodobně dochází ke ztrátám celého 13. chromozomu (monozomie 13).

Asi u 10 % nemocných s MM se může vyskytovat delece tumor-supresorového genu p53 na 17. chromozomu v oblasti 17p13. Její nálezy je též spojován se špatnou prognózou onemocnění [2].

V poslední době se zaměřuje pozornost i na chromozomové abnormality v oblasti dlouhých ramen chromozomu 1 zvláště pak amplifikaci úseku 1q21 [4]. V této oblasti se nachází gen CKS1, který se podílí na ubiquitin-proteazomové kaskádě degradace proteinů regulujících buněčný cyklus. Zvýšená exprese genu CKS1 v myelomových buňkách ovlivňuje jejich proliferační aktivitu. U pacientů s amplifikací úseku 1q21 se předpokládá horší prognóza.

Výskytu specifických chromozomových změn u pacientů s MM a jejich vlivu na způsob léčby je přikládán v poslední době velký význam. Tak např. podle nejnovějších analýz se zdá, že translokace t(4;14) a t(14;16) definují skupinu pacientů vysokého rizika, při jejichž léčbě není efektivní autologní transplantace kostní dřevě a měli by být proto léčeni kombinacemi se zařazením nových léků.

Výčet chromozomových abnormalit, se kterými se můžeme setkat v karyotypu nemocných MM, není zdaleka úplný, některé další abnormality se vyskytují s menší četností a jejich význam je předmětem výzkumných studií. Z výše uvedeného přehledu však vyplývá, že výskyt specifických chromozomových změn v myelomových buňkách je důležitým faktorem, který ovlivňuje rozdělení pacientů do jednotlivých podskupin s odlišným průběhem onemocnění, má vliv na stanovení prognózy i dalšího léčebného postupu, a tvoří proto nezanedbatelnou součást diagnostiky MM.

V České republice je prováděna cytogenetická diagnostika MM ve specializovaných cytogenetických centrech (České Budějovice, Brno, Hradec Králové, Nový Jičín, Olomouc, Ostrava, Plzeň, Praha), na základě sjednocené standardizované metodiky, která vychází ze společného multicentrického výzkumného projektu. Tato strategie umožňuje úzkou koordinaci jednotlivých laboratoří při zavádění nových metod cytogenetických vyšetření a je v souladu s výzkumnými studiemi probíhajícími v rámci České myelomové skupiny. Hlavní důraz je kladen na požadavek vyšetřit u pacientů s MM všechny klíčové chromozomové aberace.

V roce 2005 proběhlo v Londýně pracovní setkání Evropské myelomové skupiny, na kterém byly přijaty společné závěry a doporučení týkající se sjednocení metodiky molekulárně cytogenetického vyšetřování pacientů s MM. Tyto poznatky jsou plně akceptovány i v rámci cytogenetiky MM v České republice.

Cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření tvoří nedílnou a důležitou součást diagnostických metod využívaných u pacientů s MM. Lze očekávat, že v souvislosti s rozvojem dalších genetických poznatků a stále větším využíváním nových typů léčiv u pacientů s MM bu-

de význam cytogenetických vyšetření i v budoucnu stále větší.

Podklady pro tento článek byly získány při řešení grantu MZ ČR č.NR 8183/4 a VZ MSM002162245

## Literatura

- Ahman G, Jalal S, Juneau A et al. A novel three-color, clone specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 101: 7–11.
- Chang H, Qi C, Reece D et al. p53 gene deletions detected by FISH is an adverse prognostic factor for patients with MM following autologous stem cell transplantation. *Brit J of Haematol* 2004; 207: 280–284.
- Fišerová A, Hájek R, Holubová V et al. Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma* 2002; 49: 300–306.
- Fonseca R, Barlogie B, Bataille R et al. Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. *Cancer Research* 2004; 64: 1546–1558.
- Fonseca R, Debes-Marun C, Picken E et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 2003; 102: 355–357.
- Jarošová M, Ščudla V, Indrák K et al. Cytogenetic study in multiple myeloma. *Vnitř Lék* 1990; 36: 1072–1080.
- Kuglík P, Filková H, Vranová V et al. Detection of chromosome 13 abnormalities and 14q32 translocations in multiple myeloma using simultaneous immunofluorescent labelling of malignant plasma cells and FISH. *Europ J Hum Genet* 2004; 12(Suppl): 170.
- Smadja N, Bastard C, Brigaudeau F et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98: 2229–2238.
- Smejkalová J, Vranová V, Kovářová L et al. Imunomagnetická separace buněk z kostní dřevě u pacientů s mnohočetným myelomem – stanovení delece 13q14 použitím interfázní FISH. *Klinická onkologie* 2005; 2: 59–63.

doc. RNDr. Petr Kuglík, CSc.  
www.sci.muni.cz  
e-mail: kugl@sci.muni.cz

Doručeno do redakce: 8. 9. 2006