

CHROMOSOMOVÉ ABERACE U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

- Molekulárně cytogenetická analýza
plasmatických buněk

Zuzana Zemanová¹, Lenka Pavlišťová¹, Jana Tajtlová¹,
Ivan Špička², Evžen Gregora³, Kyra Michalová¹

¹Centrum nádorové cytogenetiky ÚKBLD, VFN 1.LF UK, Praha

²I. interní klinika VFN a 1.LF UK, Praha

³Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha



IGA MZ ČR NR 8183-4

KLONÁLNÍ CHROMOSOMOVÉ ABERACE U MNOHOČETNÉHO MYELOMU (MM).

Klasické G-pruhovací techniky → patologický nález až 40% nemocných

Cca 60% případů → klasické **cytogenetické vyšetření** **neinformativní** → v kultivaci pouze hematopoetické buňky s normálním karyotypem.

Interfázická FISH (I-FISH) → patologický nález až u 90% nemocných

Molekulárně-cytogenetická analýza plasmatických buněk (imunofluorescenční značení, separace)

KLONÁLNÍ CHROMOSOMOVÉ ABERACE U MNOHOČETNÉHO MYELOMU (MM).

- ✓ početní chromosomové odchylky
- ✓ strukturní přestavby
- ✓ složité komplexní změny karyotypu

Numerické změny u MM- aneuploidie:

➔ Vyskytují se asi u 2/3 pacientů

Modální počet chromosomů je jeden z nejdůležitějších prognostických faktorů u nově diagnostikovaných pacientů s MM.

Hypodiploidie - nejčastěji monosomie 8 (případně částečná ztráta 8p21), 13, 14 a X; chybět může i kterýkoliv další chromosom

- špatná prognóza

Hyperdiploidie - trisomie 3, 5, 7, 9, 11, 15 a 19

- lepší prognóza

Strukturní přestavby u MM- translokace:

➔ nejčastěji zahrnují *IgH* lokus v oblasti 14q32; méně často *IgL* lokus v oblasti 22q11

t(11;14)(11q13;14q32) - 13-20% nemocných; příznivá prognóza

t(4;14)(p16;q32) - 10-13% nemocných

t(14;16)(q32;q23) - 5% nemocných

t(6;14)(p21;q32) - 5% nemocných

} nepříznivá prognóza

Další časté partnerské chromosomové oblasti: 1p13, 1q21, 3p11, 6p25, 7q11, 7q32, 8q24, 11q13, 11q23, 12q24, 13q22, 16q24, 18q21, 21q22, 22q11, atd. - nepříznivá prognóza

Obvykle kryptické přestavby - nelze je detekovat klasickou metodou

Strukturní přestavby u MM - delece:

del(13)(q14)

38-54% nově diagnostikovaných pacientů s MM při I-FISH

významný prognostický ukazatel → horší až střední prognóza

Různý rozsah delece, často rozsáhlá ztráta v oblasti 13q14-13qter → pravděpodobně inaktivace kandidátního tumor-supresorového genu

U většiny nemocných (až 90%) pravděpodobně dochází ke ztrátám celého chromosomu 13 (monosomie 13).

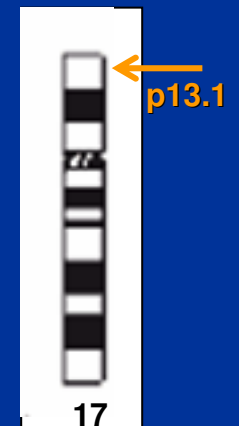


delece genu p53 (17p13)

asi 10% nemocných s MM

špatná prognóza onemocnění

časná klonální evoluce; může být detekována i při dg, ale nález vždy svědčí o progresi patologického klonu.



Strukturní přestavby u MM - amplifikace:

amplifikace genu *CKS1B* v oblasti 1q21

asi 30% nemocných s MM

kratší OS a EFS → špatná prognóza onemocnění

duplikace x amplifikace

↑ index amp(1)(q21) ↓ prognóza

Další popisované chromosomové aberace u MM:

přestavby *c-myc* genu (asi u 15% nemocných s MM)

přestavby 11q13

monosomie 8 nebo delece 8p21

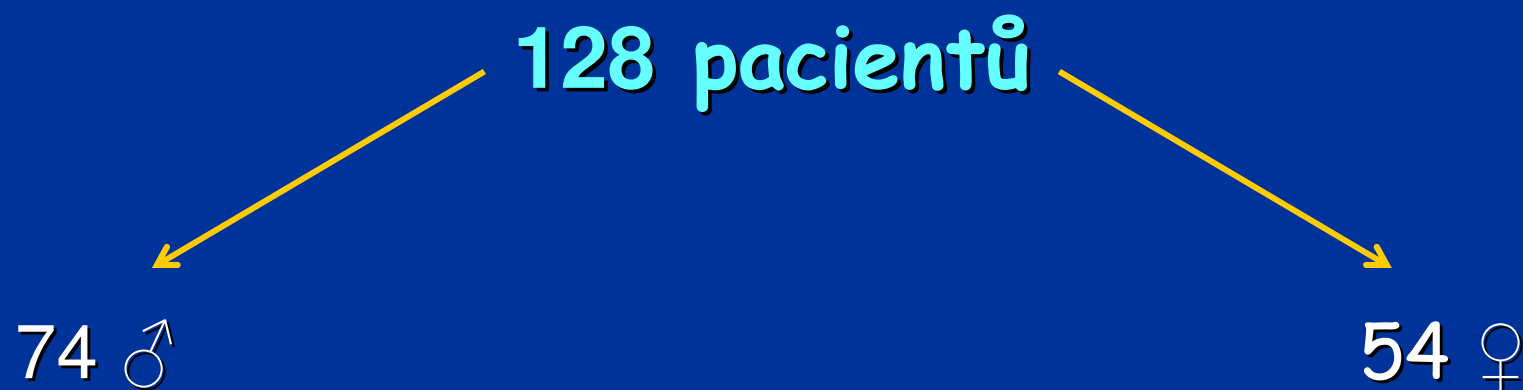
přestavby 1p, *atd.*

- ✓ Frekvence těchto aberací relativně nízká → prognostický význam není zcela jasný.
- ✓ Často se jedná o sekundární změny vznikající v pozdějších stádiích onemocnění během progresu patologického klonu.

METODY

- ✓ Klasická cytogenetická analýza
- ✓ Fluorescenční in situ hybridizace (I-FISH)
 - imunofluorescenční značení plasmatických buněk → monoklonální protilátky AMCA Anti-Human kappa chain nebo AMCA Anti-Human lambda chain (VECTOR Laboratories™)
 - DNA sondy: Abbott VYSIS™
 - detekce přestaveb *IgH* genu → t(11;14)(q13;q32)
t(4;14)(p16;q32)
 - detekce aberací 13q14
 - detekce amplifikací 1q21 (*CKS1B*)
- ✓ mFISH: 24XCyte color kit (MetaSystems™)

SOUBOR NEMOCNÝCH S MM



průměrný věk: 58,9 let

rozmezí: 27-89 let

CMG 2002: 42 nemocných
jiné: 86 nemocných

Isotyp	
kappa	67
lambda	49
kappa/lambda	1
neurčený	11

Klinické parametry

	věk	% PB	albumin	β_2 microglobulin	hemoglobin	LD
N platné	128	109	97	83	98	91
N nedefinováno	1	20	32	46	31	38
průměr	58,89	22,681	35,273	5,496	100,703	6,877
medián	59,00	18,600	34,700	3,440	100,500	5,800
sm.odchylka	10,579	20,31296	7,663	6,856	28,027	3,303
minimum	27	,00	14,00	1,39	10,70	2,60
maximum	89	94,00	50,80	50,26	154,00	18,60

PB - plasmatické buňky, LD - laktát dehydrogenáza

Pearson χ^2 test, nonparametric Mann-Whitney rank-sum test, Kaplan Meier test, Mantel-Cox test

KONVENČNÍ CYTOGENETICKÁ ANALÝZA:

Celkem vyšetřeno: 128

Úspěšné vyšetření 116x (90,6%):

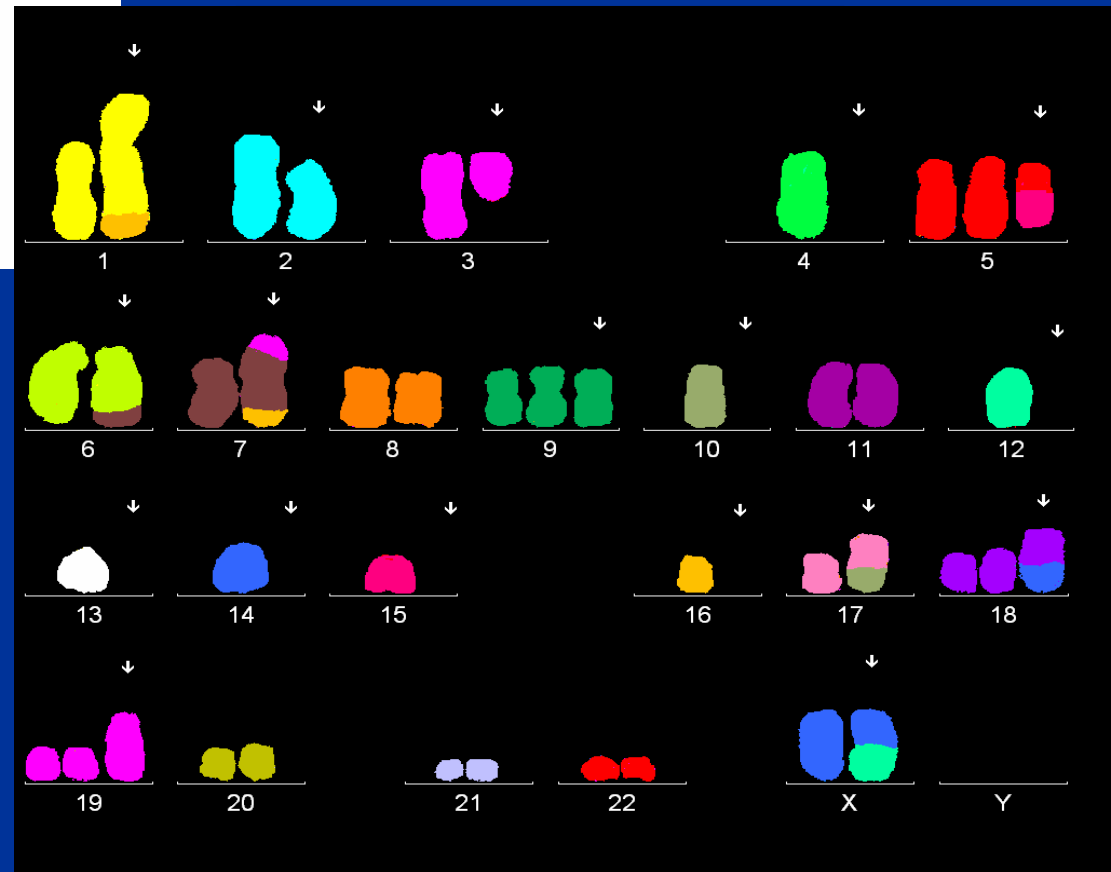
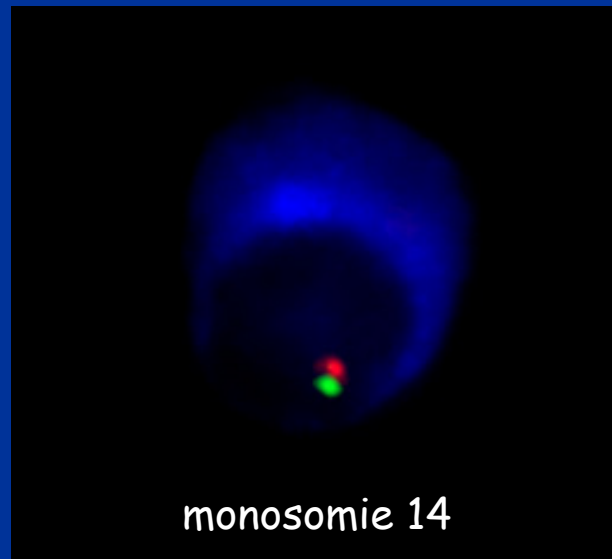
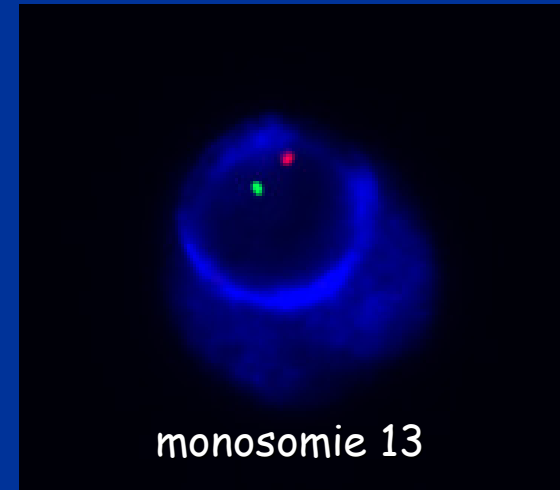
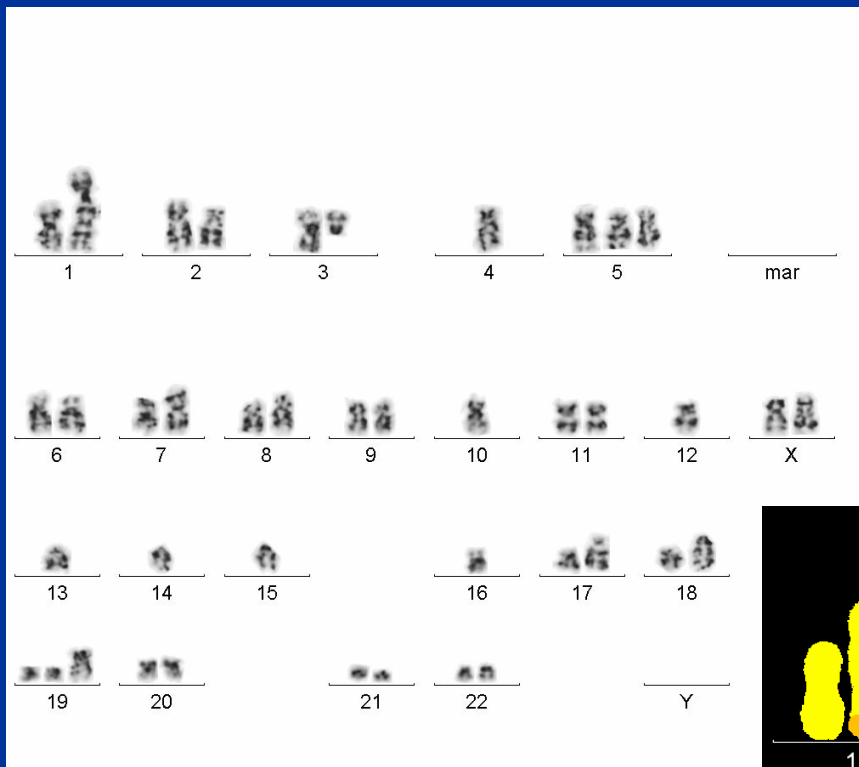
- normální nález u 87 nemocných (75,0%)
- patologický nález u 29 nemocných (25,0%)

Chromosomové aberace:

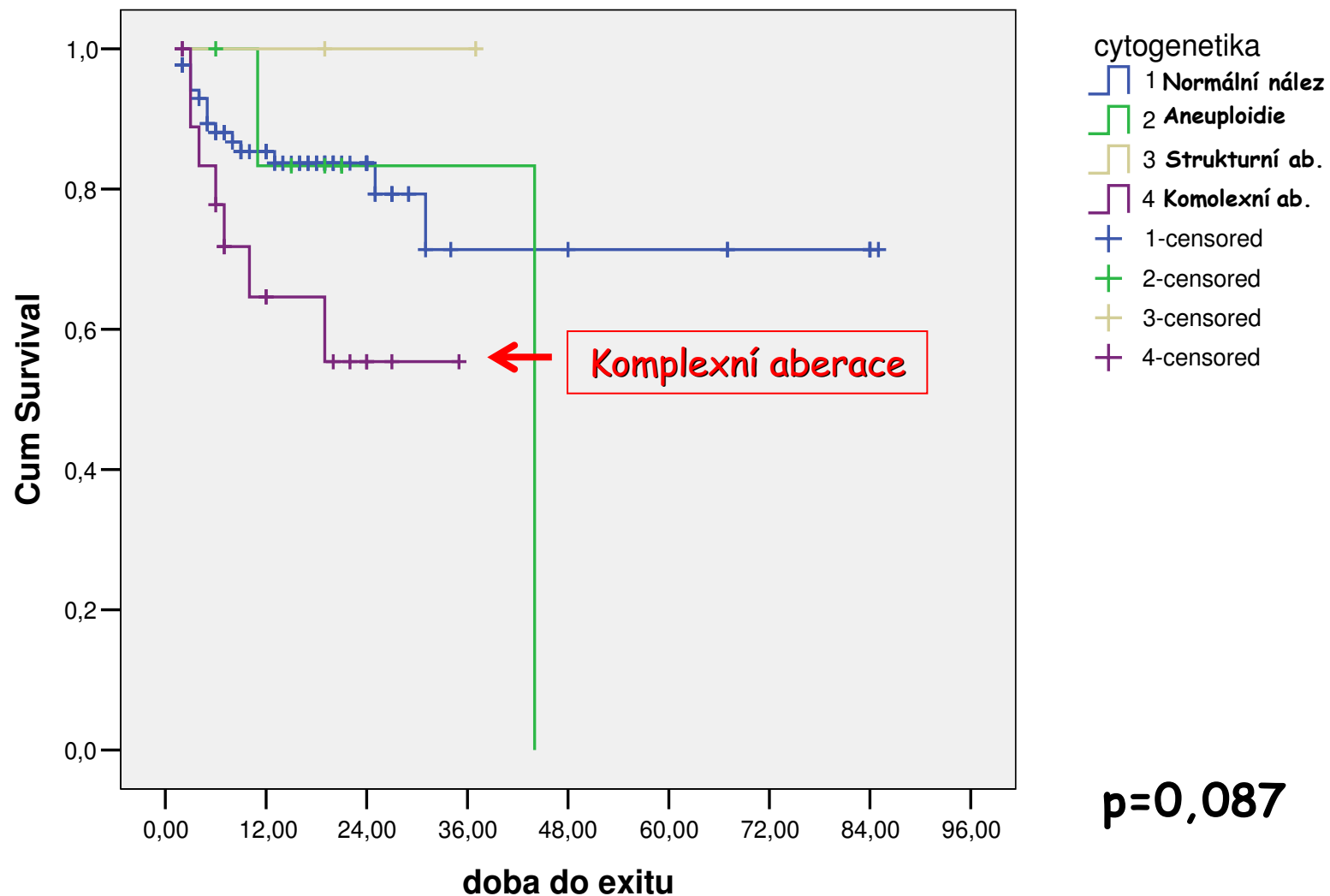
strukturní nebo komplexní přestavby: 22x

Aneuploidie: 7x

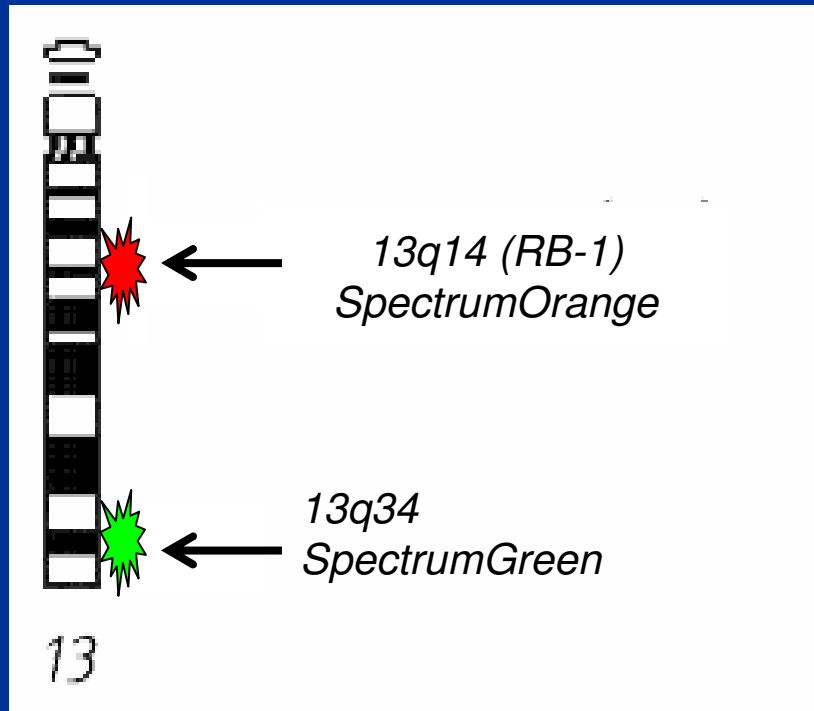
Neúspěšné vyšetření (0 mitos / nehodnotitelné): 12x (9,4%)



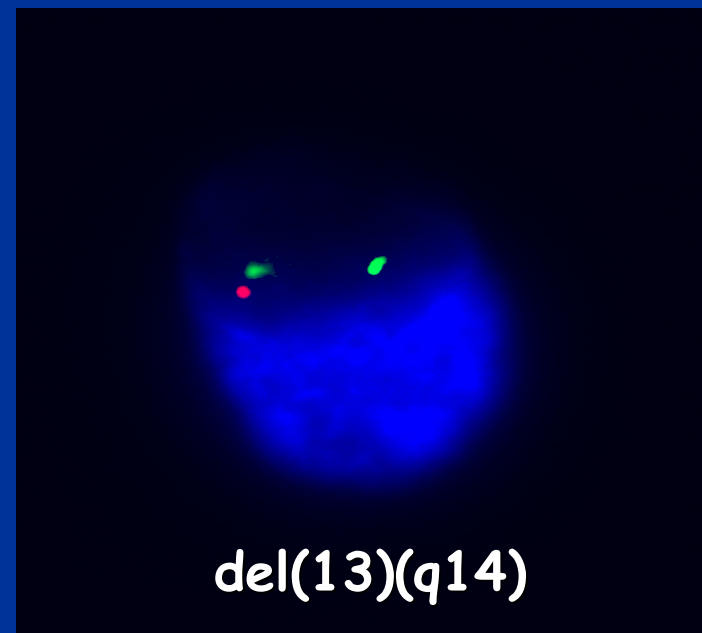
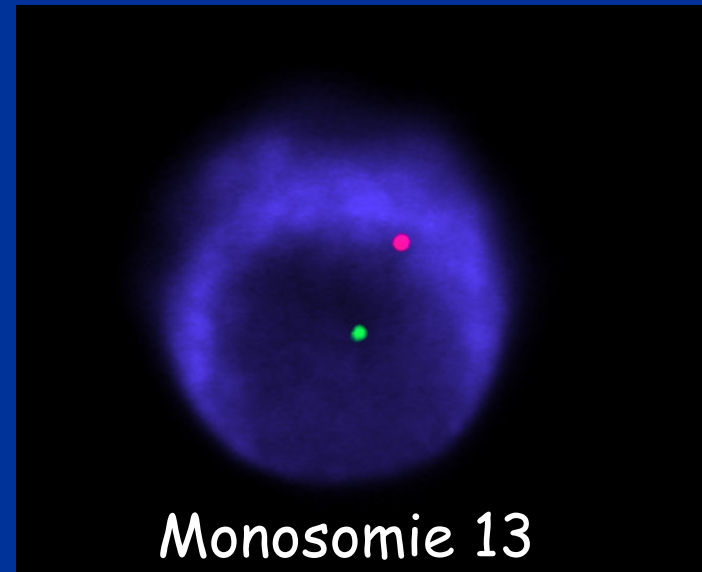
Cytogenetické nálezy - analýza OS



del(13)(q14) / monosomie 13



LSI 13q14(RB-1)/13q34
ABBOTT-VYSIS™



I-FISH: 13q14/13q34

Celkem vyšetřeno: 128 pacientů

Prokázaná aberace 13q: 84 pacientů (65,6%)

Normální nález: 44 pacientů

del(13)(q14): 14x

Monosomie 13: 51x (60,7%)

del(13)(q14)/monosomie 13: 10x

Jiný nález: 9x

abrace 13q14 - klinické stadium

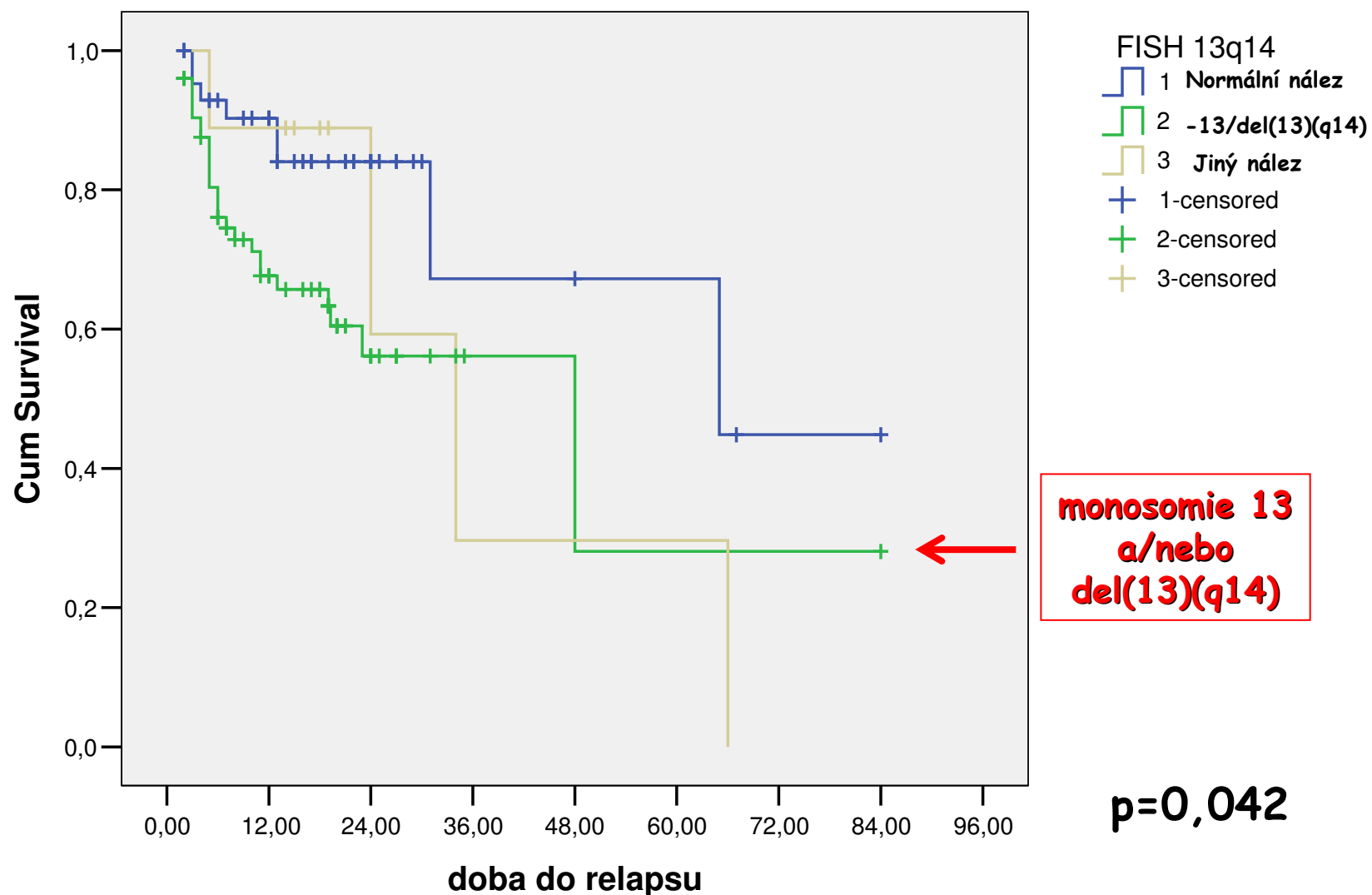
abrace 13q14		I/A	II/A	III/A	I/B	II/B	III/B	celkem
	negativní	12	4	11	0	1	4	32
	pozitivní	7	4	28	1	2	17	59
	jiné	2	1	1	0	0	6	10
	celkem	21	9	40	1	3	27	101

Systém Durie-Salmona

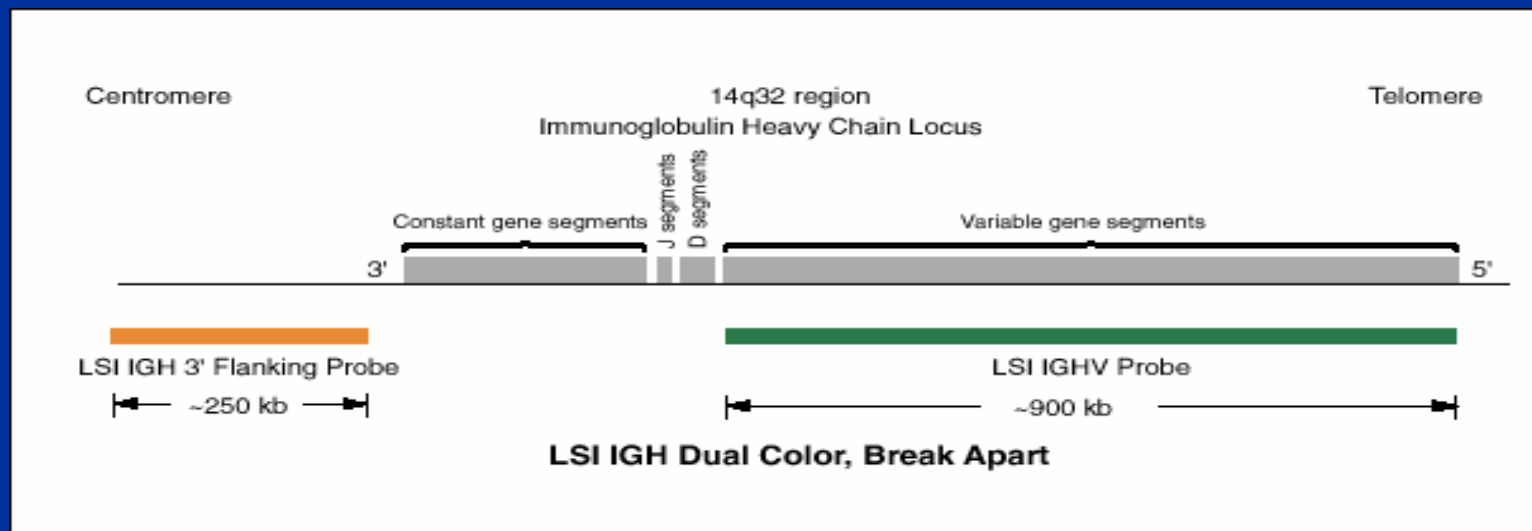
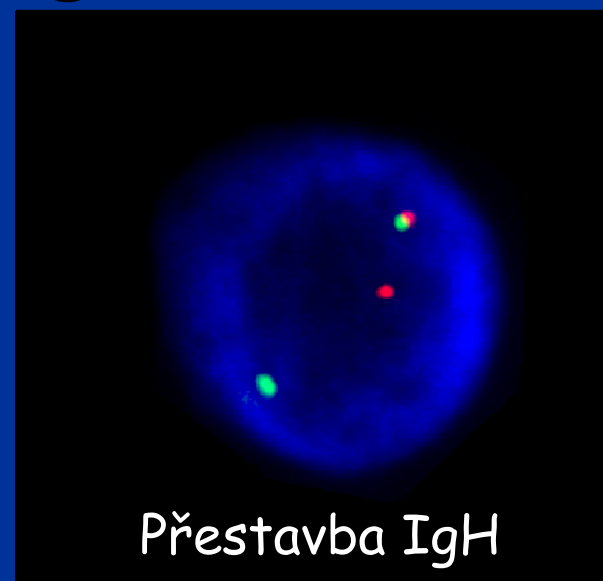
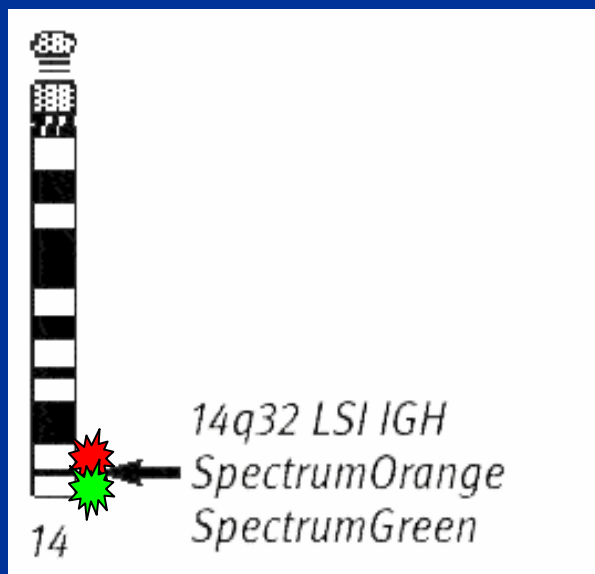
Mezinárodní prognostický index - ISS

abrace 13q14		I	II	III	celkem
	negativní	13	10	1	24
	pozitivní	15	15	17	47
	jiné	1	0	1	2
	celkem	29	25	19	73

aberrace 13q14 - analýza EFS



Detekce aberací IgH genu



LSI IgH Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
ABBOTT-VYSIS™

I-FISH - aberace IgH genu

Celkem vyšetřeno: 118 pacientů

Prokázaná aberace IgH: 82 pacientů (69,5%)

translokace IgH genu 33x

delece IgH genu (různé varianty) 28x

kombinovaný nále: přestavba/delece IgH 9x

jiný nále 12x

Translokace IgH genu

Translokace celkem prokázána u 42 nemocných

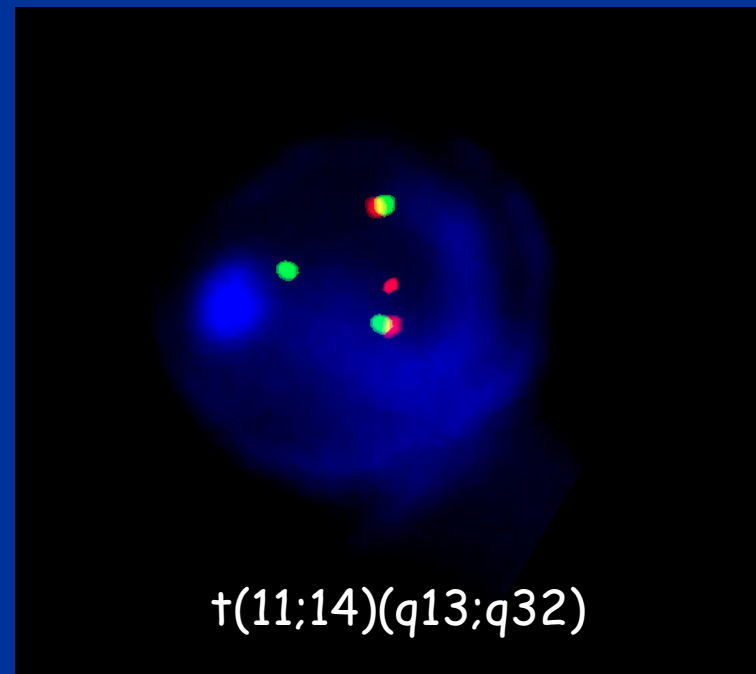
Samostatná translokace IgH genu 33x

Kombinovaný nálezn (translokace/delece IgH) 9x

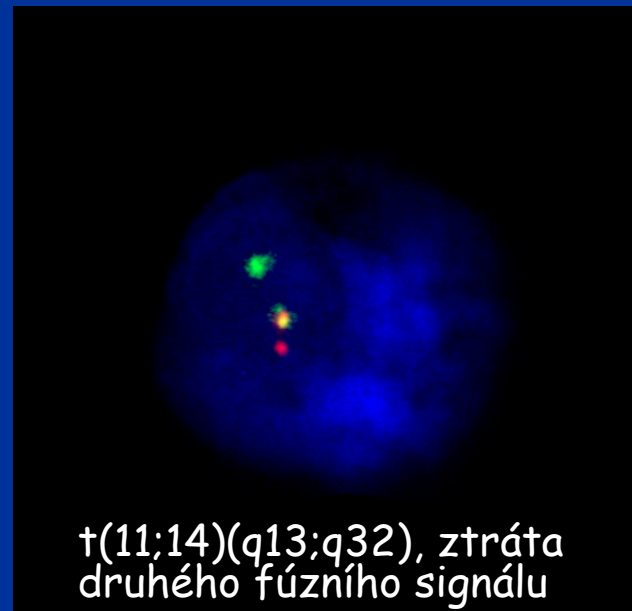
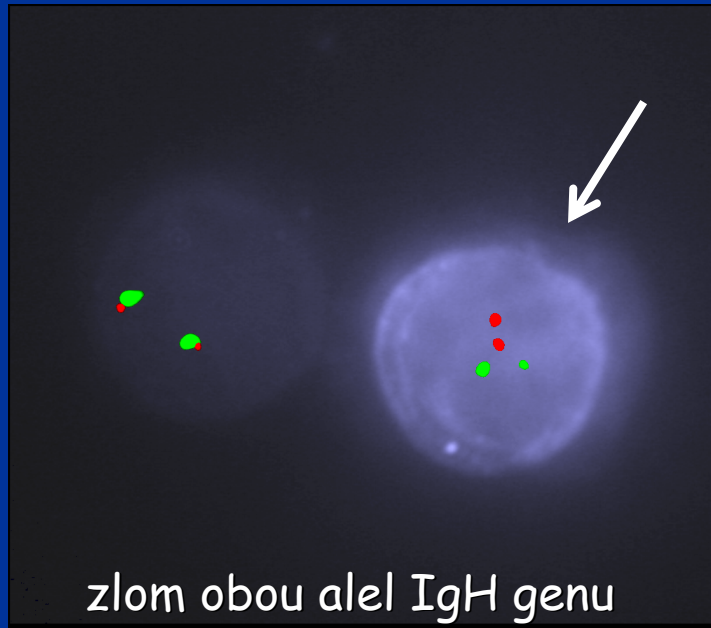
t(11;14)(q13;q32) 14x

t(4;14)(p16;q32) 4x

ostatní 24x



Různé varianty přestaveb IgH genu

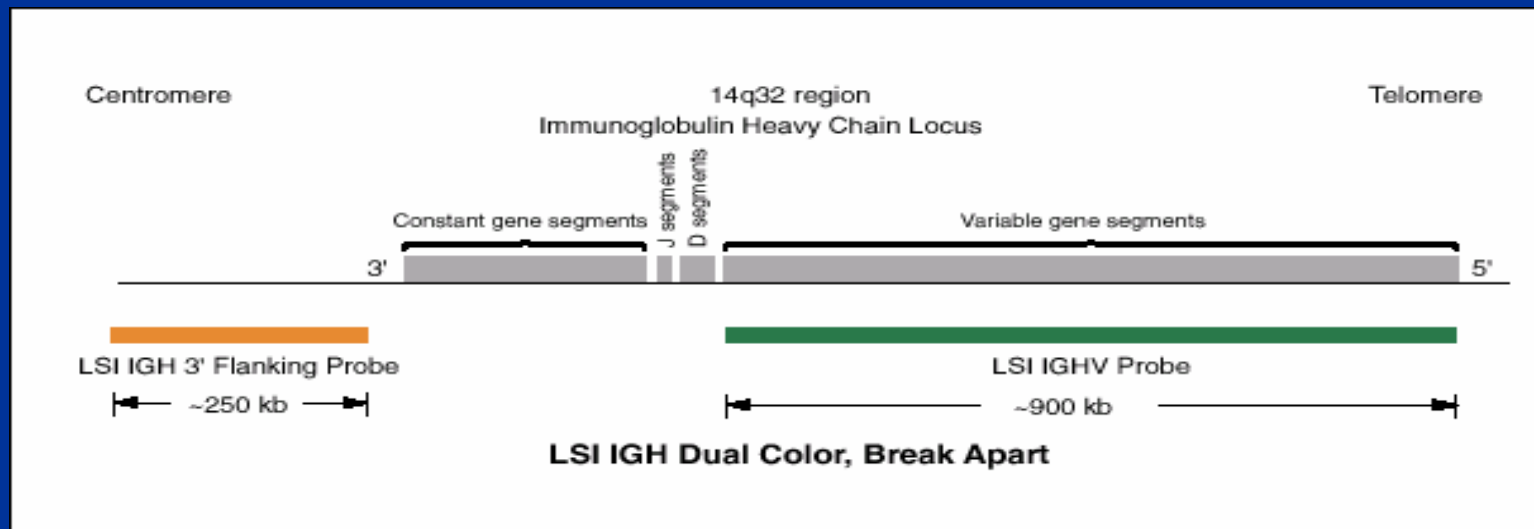
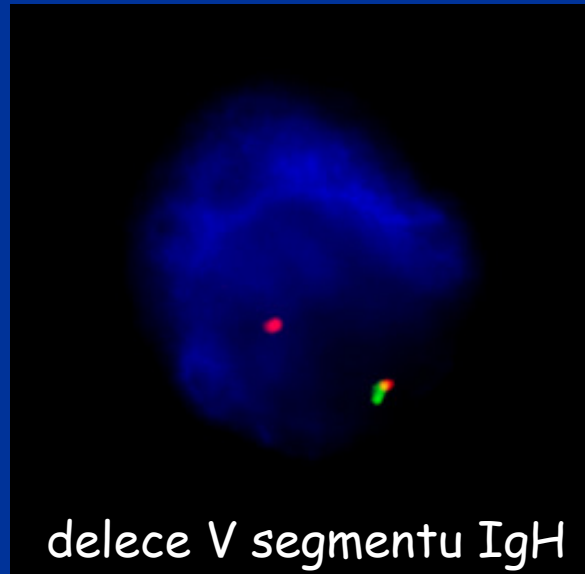


Delece IgH genu

Delece IgH genu celkem prokázána u 37
nemocných

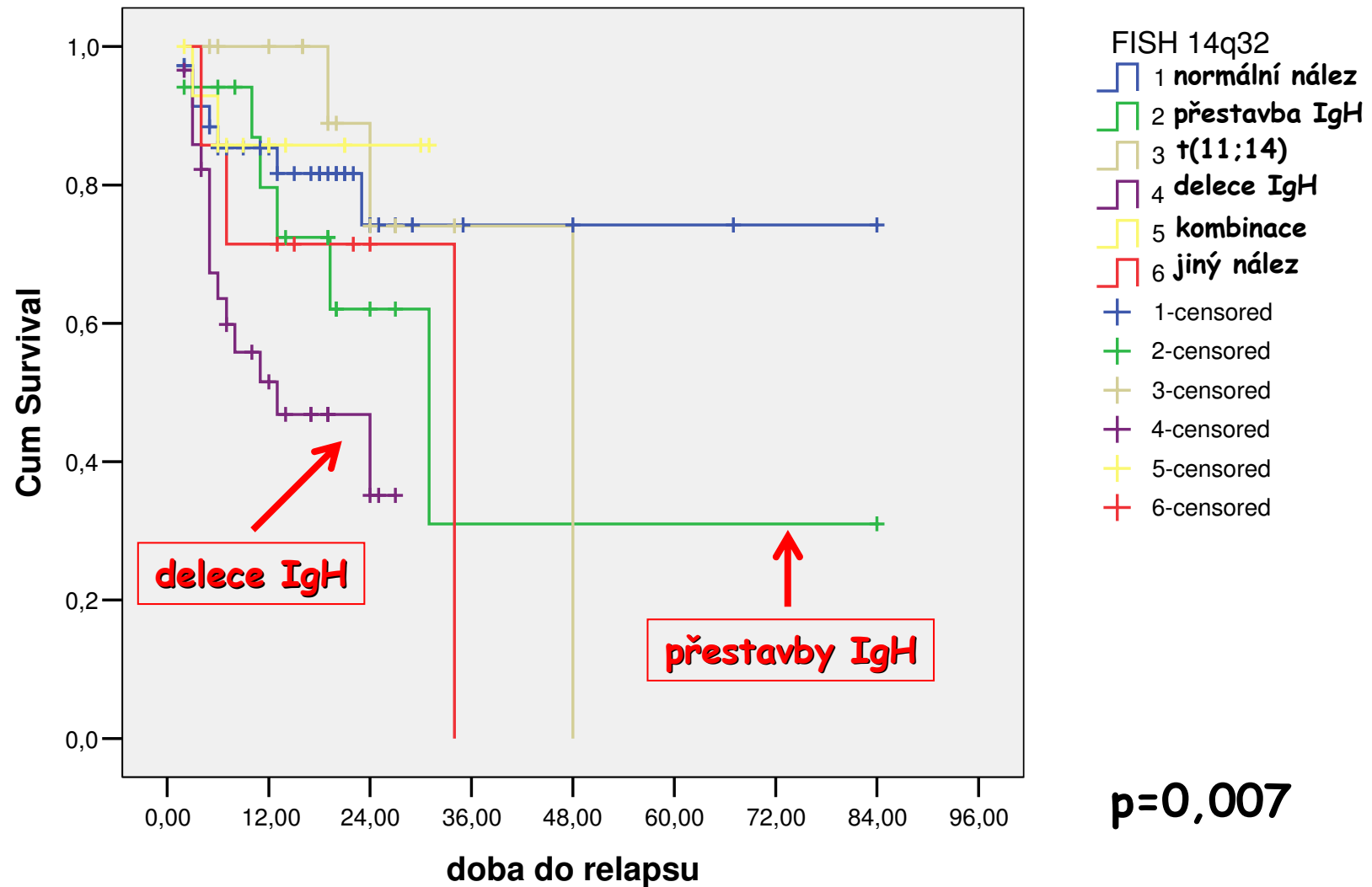
-IgH (delece 14q32/monosomie 14)	11x
delece V segmentu IgH genu	16x
delece 3' konce IgH genu	1x
kombinovaný nález: přestavba/delece IgH	9x

Různé varianty delecí IgH genu



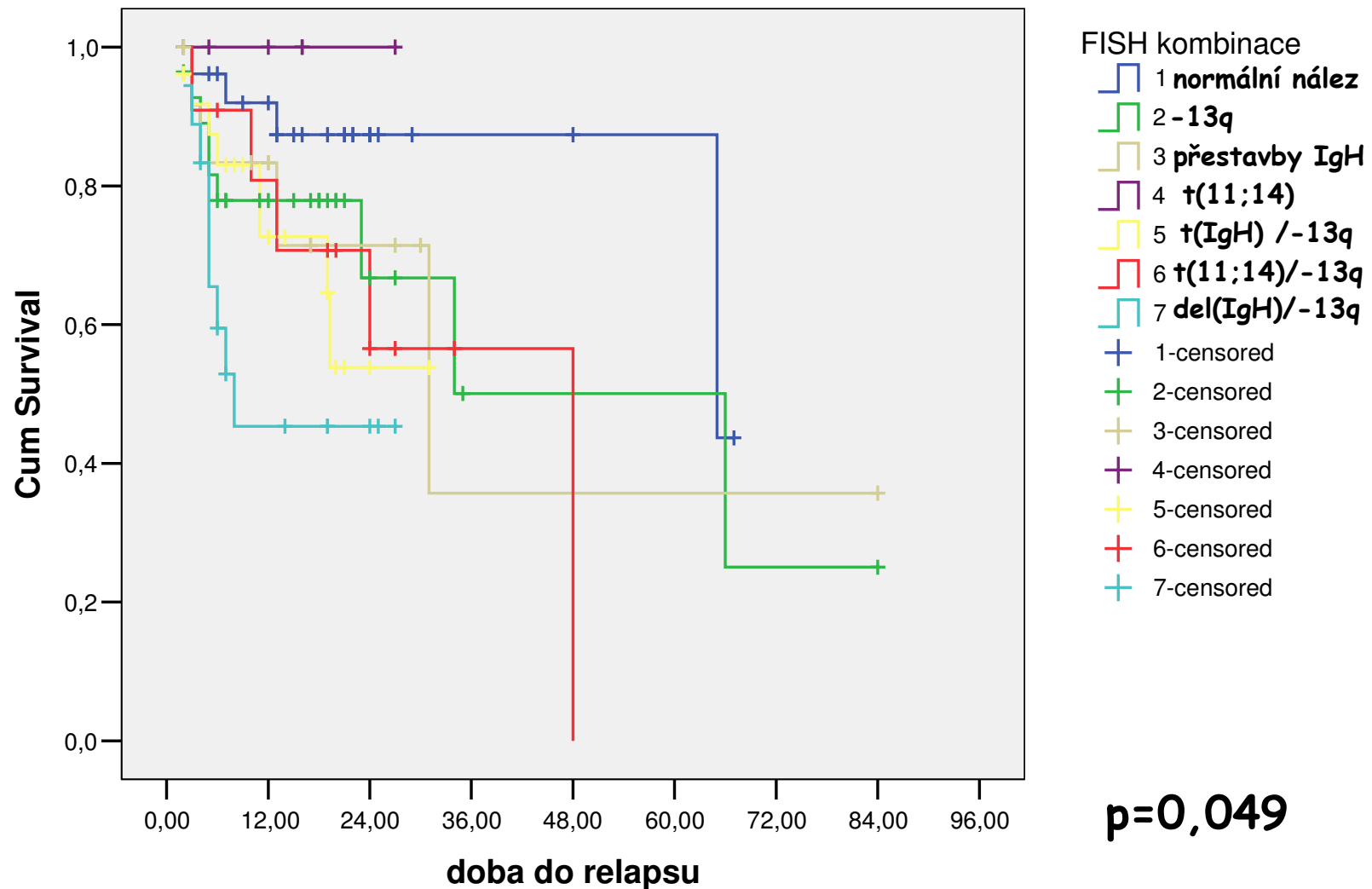
LSI IgH Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
ABBOTT-VYSIS™

aberrance IgH - analýza EFS



Analýza EFS

- kombinované aberace 13q a IgH



ZÁVĚRY

- ✓ Metodou konvenční cytogenetické analýzy jsme detekovali chromosomové aberace celkem u **25%** nemocných s MM
- ✓ Metodou I-FISH jsme prokázali přítomnost chromosomových aberací u **82,8%** nemocných s MM.
- ✓ **Aberace 13q** byly detekovány celkem u **65,6%** nemocných; statistická analýza potvrdila souvislost s pokročilým stadiem onemocnění a kratší dobou přežití do relapsu ($p=0,042$).
- ✓ **Aberace IgH genu** byly prokázány celkem u **69,5%** nemocných; kromě translokací byly detekovány **různé varianty delecí IgH genu**; statistická analýza potvrdila u nemocných s aberacemi IgH genu (translokace/delece) kratší dobou přežití do relapsu ($p=0,007$).

SPOLUPRACOVNÍCI:

Centrum nádorové cytogenetiky ÚKBLD, VFN a 1. LF UK Praha

Libuše Babická
Lucie Houšková
Libuše Matuchová
Jitka Němcová
Ivana Vlčková
Libuše Folberová
Hana Grmelová
Kateřina Vítovská
Kateřina Jetelová

Cytogenetická laboratoř ÚHKT

Jana Březinová
Šárka Ransdorfová
Jela Melicherčíková
Dana Konvalinková
Lucie Voráčková
Jana Limberská



1. interní klinika VFN a 1. LF UK: R. Zounar

FN Královské Vinohrady

KlinLab s.r.o.: A. Smolíková, M. Chrz

Klaudiánova nemocnice Mladá Boleslav: J. Obernauerová

Nemocnice Liberec: L. Walterová